

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

**Der Einfluss humaner mesenchymaler Stammzellen
auf die Tumorprogression
muskelinvasiver Urothelkarzinom-Zelllinien**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lucie Marie Frerichs geb. Thives-Kurenbach

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Bernd Bittersohl

Zweitgutachterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Michèle J. Hoffmann

Für Sofia & Volker

Zusammenfassung

Humane mesenchymale Stammzellen (MSC) des Tumor-Mikromilieus (TMM) können nachweislich klinisch relevante progressive Eigenschaften maligner Tumore, wie das Wachstum, die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die Invasivität und die Sensibilität gegenüber Chemotherapien beeinflussen. Auch für das muskelinvasive Urothelkarzinom der Harnblase (UC) gehören Resistenzen gegenüber dem Zytostatikum Cisplatin zum klinischen Alltag und reduzieren die Überlebenswahrscheinlichkeit der betroffenen Patienten häufig dramatisch. Da der Einfluss von MSC des TMM auf die Tumorprogression des UC der Harnblase bis heute nur unzureichend erforscht ist, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dieser Thematik.

Um die Fragestellung zu untersuchen, ob MSC des TMM ein mögliches Ziel zukünftiger Therapiestrategien für das UC der Harnblase darstellen könnten, wurden die muskelinvasiven UC-Zelllinien (UCC) BFTC-905, UMUC-3 und VMCUB-1 mit MSC-konditioniertem Medium (KM) behandelt. Nach Abschluss der Behandlung wurde der Einfluss der parakrinen Signalmediatoren der MSC im KM auf aggressive Eigenschaften der UCC, wie die Proliferation und Cisplatinresistenz durch Messung der Zellviabilität untersucht. Daneben wurden im Anschluss an die Inkubation der UCC mit KM Veränderungen der migratorischen und invasiven Kapazität in funktionellen Versuchsansätzen bestimmt und um durchflusszytometrische Analysen relevanter Metastasierungsmarker (CD44, CXCR-4) ergänzt. Weitere Eigenschaften der UCC wie die Zelldifferenzierung (CK14), die EMT (Vimentin, E-Cadherin, ZEB-1, α -SMA) sowie die Apoptose (Bcl-2, Bcl-XL, Survivin) wurden mit Hilfe von Genexpressionsanalysen im Anschluss an die Kultivierung im KM eruiert. Relevante Ergebnisse der Genexpressionsanalysen wurden zusätzlich auf Protein- und immunzytochemischer Ebene beleuchtet. Ergänzend wurde der Einfluss des KM auf den Immunphänotyp (PD-L1, PD-L2) mittels durchflusszytometrischer Analysen verifiziert. Da MSC als wichtige TGF- β -Produzenten gelten und diese Zytokinfamilie nachweislich potente EMT-Induktoren darstellen, wurde die SMAD-abhängige Aktivität der TGF- β -Signaltransduktion der UCC nach der Inkubation mit KM analysiert (PAI-1, SMAD4).

Zusammengefasst demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Tumorprogressions-relevante Eigenschaften der untersuchten UCC durch parakrine Mediatoren im KM moduliert werden. Die Wirkung des KM fiel dabei Zelllinien-abhängig aus. Für die Zelllinie BFTC-905 führte die Behandlung mit KM zu einer Verstärkung aggressiver Charakteristika in Form einer erhöhten Zellmotilität, Invasivität, Cisplatinresistenz, metastatischen Kapazität und EMT-Induktion. Auch auf die Zelllinie UMUC-3 wirkte sich die Inkubation mit KM aggressivitätsfördernd durch Erhöhung der Cisplatinresistenz, der Proliferation, Migration und Invasivität aus. Die Zellen der UCC VMCUB-1 hingegen reagierten nur mit einer geringen Erhöhung der Cisplatinresistenz und wiesen nach der Kultivierung im KM eine zusätzliche Verstärkung epithelialer Eigenschaften im Sinne einer so genannten Mesenchymal-epithelialen Transition (MET) auf. Die Bedeutung der MET für die Tumorbilogie ist bis heute nicht abschließend geklärt, scheint aber mit einer verringerten Metastasierungs-fähigkeit assoziiert zu sein.

In Kongruenz zu den Beobachtungen dieser Arbeit, zeigte sich auch in der Literatur zum Einfluss von MSC auf andere Tumorentitäten sowie andere UCC eine ähnlich Tumor- und Zelllinien-abhängige Wirkung. Während für viele Tumorarten ein progressionsfördernder Effekt der MSC beschrieben wurde, existiert auch reichlich Evidenz für eine progressionshemmende Wirkung. Eine mögliche Erklärung für diese Diversität der Wirkung der MSC auf maligne Tumorzellen stellen gewebespezifische Unterschiede im Differenzierungspotential der isolierten MSC dar. Gleichzeitig scheint sich die Wirkung der MSC im Laufe des Tumorfortschritts durch die enge Interaktion mit den heterogenen Tumorzellen zu verändern. Um MSC als Ziel zukünftiger antikanzergener Therapiestrategien für das UC der Harnblase nutzen zu können, bedarf es daher weiterführender Untersuchungen, die insbesondere die direkte Interaktion zwischen UCC und MSC sowie die Koevolution dieser Zellen im TMM berücksichtigen sollten.

Summary

Human mesenchymal stem cells (MSCs) of the tumor micromilieu (TMM) have been shown to influence clinically relevant progressive tumor characteristics, such as growth, epithelial-mesenchymal transition (EMT), invasiveness and sensitivity to chemotherapies. For muscle-invasive urothelial carcinoma of the urinary bladder (UC), resistance to the chemotherapeutic agent cisplatin is also part of clinical routine and often dramatically reduces the survival probability of affected patients. Since the influence of MSC of TMM on tumor progression of UC of the urinary bladder has been insufficiently explored to date, the present work addresses this issue.

To answer the question, whether MSC of the TMM might represent a future therapeutical target, three muscle invasive urothelial carcinoma cell lines (UCC) BFTC-905, UMUC-3 and VMCUB-1 were treated with MSC-conditioned media (CM). Following the treatment, the influence of paracrine signal mediators of the CM on progressive properties of the UCC like proliferation or resistance against cisplatin were analysed by measuring the cell viability. Furthermore, the influence on the migratory and invasive capacity of the UCC were analysed by functional experimental approaches. Altered abundance of relevant markers of metastasis (CD44, CXCR-4) after incubation in CM were determined by flow cytometry analysis. Other progressive characteristics of the UCC like cell differentiation (CK14), EMT (Vimentin, E-Cadherin, ZEB-1, α -SMA) and apoptosis (Bcl-2, Bcl-XL, Survivin) were examined by gene expression analysis. Additionally, relevant results were verified on protein level. Further, the influence of the CM on the immunogenic phenotype (PD-L1, PD-L2) was determined by flow cytometric analysis. Since MSC represent important producers of TGF- β and this cytokine family seems to be a powerful inducer of EMT, the SMAD-dependent activity of the TGF- β -signaling was explored after UCC were cultivated in CM (PAI-1, SMAD4).

Altogether the results of the present work demonstrate that important progressive characteristics of the selected UCC were modulated by paracrine mediators of the CM. The effect of the CM in this context was cell line dependent. For the epithelial UCC BFTC-905 the CM promoted an aggressive phenotype of the tumor cells by increasing the cell mobility, invasiveness, resistance against cisplatin treatment and induction of EMT. Similarly, UMUC-3 cells showed an enhanced resistance against cisplatin, proliferation, migration and invasive capacity after incubation with CM. Interestingly, the cell line VMCUB-1 responded in a different way to the paracrine factors of the MSC; only a very limited increase of cisplatin resistance was observed and epithelial features of the cellular phenotype were rather enhanced, which is called a mesenchymal-to-epithelial transition (MET). Even though the meaning of the MET for the tumor biology is not completely understood, yet it seems to be associated with a reduced progression and metastasis of malignant tumors.

Concurring with results of this study, also data in literature on the impact of MSC on other tumor entities as well as other UCC showed a similar tumor and cell line dependent effect. While a progression-promoting effect of MSC has been described for many tumor types, abundant evidence also exists for a progression-inhibiting effect. Tissue-specific differences in the differentiation potential of isolated MSC represent a possible explanation for this diversity in the effect of MSC on tumor cells. At the same time, the effect of MSC seems to change during tumor progression due to the close interaction with heterogeneous tumor cells. Therefore, to use MSC as a target of future anticancer therapeutic strategies for UC, further studies are needed, which should particularly consider the direct interaction between UCC and MSC as well as the co-evolution of these cells in the TMM.

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|--------------------------------|---|-----------------------|---|
| 4-MU | 4-Methylumbelliferone | cDNA | Complementary DNA |
| 5J-ÜW | 5-Jahres-Überlebens- wahrscheinlichkeit | CK14 | Zytokeratin 14 |
| α-SMA | Alpha-smooth muscle actin | CM | Conditioned media |
| β-ME | 2-Mercaptoethanol | CO₂ | Kohlenstoffdioxid |
| Abb | Abbildung | CP | Cisplatin |
| AF | Antikörperfärbung | CSC | Cancer stem cells |
| ALDH1 | Aldehyde dehydrogenase 1 | CXCL | C-X-C motif chemokine ligand |
| APAF1 | Apoptotic peptidase activating factor 1 | CXCR | C-X-C motif chemokine receptor |
| APC | Allophycocyanin | CYTc | Cytochrome c |
| AT | Annealing temperature | D | Dauer |
| ATR | ATR serine/threonine kinase | DAPI | 4',6-Diamidino-2- phenylindol |
| AV | Ansatzvolumen | DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| B | Blank | DMSO | Dimethylsulfoxid |
| BAK | Bcl-2 killer 1 | DNA | Desoxyribonuklein- säure |
| BAX | Bcl-2 associated X | DNase | Desoxyribonuklease |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 | DPBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with Ca ²⁺ and Mg ²⁺ |
| Bfl-1 | Bcl-2 related protein A1 | ECM | Extrazelluläre Matrix |
| BID | BH3-interacting domain death agonist | EDTA | Ethylendiamin- tetraessigsäure |
| BIM | Bcl-2 interacting mediator of cell death | EGF | Epidermal growth factor |
| BSA | Bovine Serum Albumin Fraction V | ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| CA-MSC | Cancer associated-MSC | EMT | Epithelial-mesenchy- male Transition |
| CASP9 | Pro-Caspase 9 | EZH2 | Enhancer of zeste homolog 2 |
| CCL | CC-Chemokine-Ligand | | |
| CD | Cluster of differentiation | | |
| CD44s | CD44-standard isoforms | | |
| CD44v | CD44-variant isoforms | | |

| | | | |
|---------------|---|------------------------|--|
| FACS | Fluorescence Activated Cell Scanning | | biologischen Replikate |
| FCS | Hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum | NaCl | Natriumchlorid |
| FGF | Fibroblast growth factor | NOXA | Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat | ns | Nicht signifikant |
| Fw | Forward | p53 | Tumorsuppressor-protein p53 |
| g | G-Zahl, Beschleunigungsgröße (Zentrifuge) | P | Kulturpassage |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase | PAI-1 | Plasminogen activator inhibitor type 1 |
| HA | Hyaluronsäure | PBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Ca ²⁺ and Mg ²⁺ |
| HCL | Chlorwasserstoff/Hydrochlorid | PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| HGF | Hepatocyte growth factor | PDGF | Platelet-derived growth factor |
| HLA-DR | Humane leukocyte antigen DR | PD-L | Programmed cell death protein 1-ligand |
| HPC | Hämatopoetische Progenitor-Zelle | PD-R | PD-1-receptor |
| HRP | Horseradish-Peroxidase | pERK | Extracellular-signal-regulated kinase |
| IAP | Apoptose-Inhibitoren | PGE₂ | Prostaglandine E ₂ |
| IL | Interleukin | PI3K | Phosphatidylinositol-3-kinase |
| K | Proliferationskontrolle | PIN-1 | Peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerase-NIME-interacting 1 |
| KF | Kammerfaktor | PUMA | p53-upregulated modulator of apoptosis |
| KM | Konditioniertes Medium | qRT-PCR | Quantitative reverse transcription Real-Time-PCR |
| LD | Letale Dosis | R | Regressionsgerade |
| Mcl-1 | Myeloid cell leukemia 1 | | |
| MET | Mesenchymal-epitheliale Transition | | |
| MMP | Matrix-Metalloproteinasen | | |
| MOMP | Mitochondrial outer membrane permeabilization | | |
| mRNA | Messenger Ribonukleinsäure | | |
| MSC | Humane mesenchymale Stammzellen | | |
| MTA1 | Metastasis-associated protein 1 | | |
| n | Anzahl der KM-Gesamtpools/ | | |

| | | | |
|------------------|---|-----------------------|------------------------------------|
| ROS | Reaktive Sauerstoff-Spezies | WB | Western Blot |
| RNA | Ribonukleinsäure | Z | Zyklus |
| RNase | Ribonuklease | ZEB | Zinc Finger E-Box binding homeobox |
| R-PE | R-Phycoerythrin | | |
| RT | Raumtemperatur | A | Ampere |
| Rv | Reverse | C | Grad in Celsius |
| S | Individueller biologischer Spender | cm² | Quadratcentimeter |
| SD | Standardabweichung | g | Gramm |
| SDF-1 | Ligand stromal cell-derived factor-1 | h | Zeit in Stunden |
| SDR | Standardreihe | kDA | Kilodalton |
| SMAC | Second mitochondrial activator of caspases | mg | Milligramm |
| SMAD | Sma- and mad-related protein | min | Minute |
| SOX | Sex determining region Y (SRY)-box | ml | Milliliter |
| T | Temperatur | nm | Nanometer |
| Tab | Tabelle | pmol | Pikomol |
| TGF-β | Transforming growth factor-beta | U/ml | Units pro Milliliter |
| TGF-β-RI | TGF-β-Rezeptor I | µg | Mikrogramm |
| TGF-β-RII | TGF-β-Rezeptor II | µl | Mikroliter |
| TMM | Tumormikromilieu | µm | Mikrometer |
| TNT | Tunneling Nanotubes | µM | Mikromolar |
| Tris-HCL | Tris-Hydrochlorid | V | Volt |
| UCC | Urothelkarzinom-Zelllinien | | |
| UC | Muskelinvasives Urothelkarzinom der Harnblase | | |
| UDG | Uracil-DNA-Glykosylase | | |
| UL | Ursprungslösung | | |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor | | |
| VF | Verdünnungsfaktor | | |
| VK | Vorkonditionierung | | |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Das Tumormikromilieu | 1 |
| 1.1.1 | Zusammensetzung des TMM | 2 |
| 1.1.2 | Humane mesenchymale Stammzellen | 3 |
| 1.1.3 | Einfluss von MSC auf die Tumorprogression | 4 |
| 1.2 | Urothelkarzinom der Harnblase | 15 |
| 1.2.1 | Epidemiologie und Ätiologie | 15 |
| 1.2.2 | Klinik und Diagnostik | 15 |
| 1.2.3 | Histopathologie | 15 |
| 1.2.4 | Therapie fortgeschrittener Tumorstadien | 16 |
| 1.3 | Zielsetzung der Arbeit | 16 |
| 2 | Material | 18 |
| 2.1 | Patientenproben/Zelllinien | 18 |
| 2.1.1 | Humane mesenchymale Stammzellen | 18 |
| 2.1.2 | Urothelkarzinom-Zelllinien | 18 |
| 2.2 | Chemikalien, Reagenzien, Kits | 19 |
| 2.2.1 | Chemikalien und Reagenzien | 19 |
| 2.2.2 | Kits | 20 |
| 2.3 | Puffer- und Lösungsrezepturen | 20 |
| 2.3.1 | Lösungen für die Zellkultur | 20 |
| 2.3.2 | Pufferrezepturen für Western Blot-Analyse | 21 |
| 2.3.3 | Lösungen für molekularbiologische und funktionelle Analysen | 22 |
| 2.4 | Zellkulturmedien | 23 |
| 2.5 | Oligonukleotidprimer | 23 |
| 2.6 | Antikörper | 24 |
| 2.7 | Verbrauchsmaterialien | 24 |
| 2.8 | Geräte | 25 |
| 2.9 | Software und Datenbanken | 27 |
| 3 | Methoden | 28 |
| 3.1 | Übergreifende Arbeiten in der Zellkultur | 28 |
| 3.1.1 | Zellkulturbedingungen | 28 |
| 3.1.2 | Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer | 28 |
| 3.1.3 | Passagieren der Zellkulturen | 28 |
| 3.1.4 | Kryokonservierung und Rekultivierung | 28 |
| 3.2 | Kultivierung humaner Mesenchymaler Stammzellen | 29 |
| 3.2.1 | Isolierung der MSC aus Fettgewebe | 29 |
| 3.2.2 | Nährmedium und Kultivierung | 29 |
| 3.2.3 | Herstellung des konditionierten Mediums | 30 |
| 3.3 | Kultivierung humaner Urothelkarzinom-Zelllinien | 31 |
| 3.3.1 | Nährmedien und Kultivierung der UCC | 31 |
| 3.3.2 | Aussäen der UCC im Well-Format | 32 |
| 3.4 | Herstellung von Cisplatin-Lösungen | 32 |
| 3.4.1 | Berechnung von Cisplatin-Konzentrationen | 32 |
| 3.5 | Zellviabilitäts-Analysen | 33 |
| 3.5.1 | CellTiter®-Blue-Assay | 33 |
| 3.5.2 | Untersuchung der Proliferation | 33 |
| 3.5.3 | Evaluation der Resistenzvermittlung durch KM | 34 |
| 3.6 | Funktionelle Versuche | 34 |
| 3.6.1 | Migrations-Assay | 34 |
| 3.6.2 | Invasions-Assay | 35 |
| 3.7 | Vorkonditionierung der UCC | 37 |
| 3.7.1 | Behandlungsschema | 37 |
| 3.8 | Zellmorphologische Analysen | 38 |
| 3.8.1 | Phänotyp-Bestimmung | 38 |
| 3.9 | Molekularbiologische Analysen | 38 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 3.9.1 | RNA-Extraktion..... | 38 |
| 3.9.2 | DNase-Verdau..... | 38 |
| 3.9.3 | RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle | 38 |
| 3.9.4 | Reverse Transkription und cDNA-Verdünnung..... | 38 |
| 3.9.5 | Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion..... | 39 |
| 3.10 | Western Blot-Analysen | 40 |
| 3.10.1 | Präparation von Proteinlysaten | 40 |
| 3.10.2 | Proteinbestimmung | 41 |
| 3.10.3 | Western Blot-Analyse | 41 |
| 3.11 | Immunzytochemie | 42 |
| 3.11.1 | Fixierung..... | 42 |
| 3.11.2 | Antikörperfärbung | 42 |
| 3.12 | Enzymimmunoassay | 43 |
| 3.12.1 | PAI-ELISA | 43 |
| 3.13 | Durchflusszytometrische Analysen | 44 |
| 3.13.1 | FACS..... | 44 |
| 3.14 | Statistische Auswertung | 45 |
| 4 | Ergebnisse..... | 46 |
| 4.1 | Auswahl der UCC..... | 46 |
| 4.2 | Behandlung der UCC mit KM | 46 |
| 4.2.1 | Überprüfung eines eventuellen Nährstoffmangels durch KM..... | 46 |
| 4.2.2 | Einfluss von KM auf die Proliferation | 48 |
| 4.2.3 | Einfluss von KM auf die Cisplatin-Sensitivität | 49 |
| 4.2.4 | Effekte von KM auf die Zelldifferenzierung..... | 51 |
| 4.2.5 | Einfluss von KM auf die Apoptose | 53 |
| 4.2.6 | Effekte von KM auf die Zellmotilität | 55 |
| 4.2.7 | Einfluss von KM auf die Invasivität..... | 56 |
| 4.2.8 | Effekte von KM auf die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) | 60 |
| 4.2.9 | Einfluss von KM auf die Metastasierung..... | 73 |
| 4.2.10 | Effekte von KM auf den zellulären Immunphänotyp..... | 75 |
| 5 | Diskussion..... | 77 |
| 5.1 | Methodische Einschränkungen | 77 |
| 5.1.1 | Konditioniertes Medium..... | 77 |
| 5.1.2 | Die Heterogenität der MSC | 79 |
| 5.2 | Einfluss der MSC auf die Aggressivität von UCC..... | 79 |
| 5.2.1 | Förderung der Proliferation..... | 79 |
| 5.2.2 | Erhöhung der Cisplatin-Resistenz..... | 80 |
| 5.2.3 | Förderung des Stammzellcharakters | 82 |
| 5.2.4 | Effekte auf die Apoptose | 83 |
| 5.2.5 | Förderung der Migration und Invasivität | 84 |
| 5.2.6 | Effekte auf den zellulären Phänotyp und die Metastasierung..... | 86 |
| 5.2.7 | Effekte auf den Immunphänotyp | 91 |
| 5.3 | Fazit | 92 |
| 6 | Literatur- und Quellenverzeichnis | 93 |
| 7 | Anhang | 103 |
| 7.1 | TNM-Klassifikation: Urothelkarzinom der Harnblase | 103 |
| 7.2 | Zellinienspezifische Charakteristika der UCC..... | 104 |
| 7.3 | Migrations-Analysen mit KM und Cisplatin..... | 106 |
| 8 | Danksagung..... | 108 |

1 Einleitung

1.1 Das Tumormikromilieu

Das Tumormikromilieu (TMM) umfasst die unmittelbare Umgebung eines Tumors und wurde in den vergangenen Jahren als wichtiger Faktor im Prozess der Tumorentstehung und -progression identifiziert [1,2]. Inzwischen gilt es als gesichert, dass Tumoreigenschaften wie die Invasivität, die Metastasierung oder die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika nicht nur von endogenen Mechanismen der Tumorzellen selbst, sondern auch von externen Signalen aus der Tumorumgebung beeinflusst werden [3]. Die Modifikation der Tumoreigenschaften gelingt dabei durch einen intensiven und multidirektionalen Austausch zwischen dem Tumorzellverbund und den einzelnen Komponenten des TMM [4]. Zu diesen Komponenten zählen zum einen die verschiedenen Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) und zum anderen alle nicht maligne-transformierten Körperzellen, die sich in lokaler Nähe zum Tumor befinden [2]. Das Netzwerk aus Tumorzellen und TMM gleicht dabei einem eigenen Ökosystem, das sich im Laufe der Tumorentstehung verändert [5,6]. Die Entwicklung des TMM wird durch die Tumorzellen dirigiert, sodass sich durch eine wechselseitige Interaktion ein zunehmend progressives Milieu etabliert [5]. Der rasche Zugewinn an Erkenntnissen bezüglich der Bedeutung des TMM für die Tumorentwicklung führte dazu, dass dieses als Ziel zukünftiger Krebstherapien erfasst wurde. Sollte es gelingen prokanzerogene Signale des TMM zu hemmen und stattdessen ein antikanzerogenes Milieu zu etablieren, könnten die Tumorentstehung verlangsamt, die Wirkung gängiger Therapien verstärkt und die Prognose der Patienten verbessert werden [2].

Eine Herausforderung für die Nutzung des TMM als Ziel moderner Tumorthera-pien stellen vor allem die komplexen Interaktionsmechanismen dar, über die die Tumorzellen mit ihrer Umgebung in Kontakt treten. Übergreifend können die Kommunikationswege in einen direkten Transfer über interzelluläre Kontakte sowie eine indirekte Interaktion via parakriner Signalgebung unterteilt werden [4]. Ein direkter Austausch zwischen den Tumorzellen und den TMM-Zellen gelingt z. B. über Zell-Zell-Kontakte wie Gap junctions, Connexine oder dünne Membrankanäle (TNT, engl. Tunneling Nanotubes) [7,8,9]. Ein Großteil der Kommunikation im TMM erfolgt jedoch ohne direkten zellulären Kontakt mit Hilfe parakriner Signaltransduktion, u. a. durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren, Zytokinen und Chemokinen [4]. Eine etablierte Methode zur in-vitro-Analyse des parakrinen Einflusses von TMM-Zellen auf Tumorzellen stellt die Verwendung von konditioniertem Medium (KM) dar. Bei dieser Methode wird das mit

parakrinen Signalmediatoren angereicherte Kulturmedium aus TMM-Zellkulturen entnommen und zur Behandlung von Tumorzellen eingesetzt [10, 17, 18].

1.1.1 Zusammensetzung des TMM

Die exakte Zusammensetzung des TMM ist für jeden Tumor einzigartig und in erster Linie davon abhängig, aus welcher Zellpopulation und in welchem Gewebe bzw. Organ der Primärtumor ursprünglich entstanden ist. So verfügt ein Osteosarkom eines langen Röhrenknochens über eine andere Mikroumgebung als ein Glioblastom der Großhirnhemisphäre [11, 12]. Doch auch das TMM derselben Tumorentität ist nicht identisch, da es durch die ständige Interaktion mit den heterogenen Tumorzellen dynamischen Veränderungen unterliegt [6]. Dennoch existieren relevante Zellpopulationen, die Teil des TMM vieler unterschiedlicher Tumorarten sind. Hierzu gehören insbesondere die so genannten humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC), aber auch Fibroblasten und Myofibroblasten, Adipozyten, Endothelzellen, Perizyten sowie Immunzellen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr [1]. Darüber hinaus wird das Zellspektrum des TMM dadurch erweitert, dass ein Tumor nicht nur mit seiner lokalen Umgebung interagiert, sondern auch mit nicht onkogen-transformierten Zellen weiter entfernt liegender Gewebe in Kontakt treten kann [13]. So konnte demonstriert werden, dass im Blut zirkulierendes VEGF (engl. Vascular Endothelial Growth Factor), welches von Lungenkarzinomzellen sekretiert wurde, parakrin zu einer Mobilisierung von VEGF-Rezeptor-positiven⁽⁺⁾-hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC) aus dem Knochenmark führte [14]. Noch vor der Ablösung der ersten malignen Zelle aus dem Primärtumor gelangten die nicht-onkogen-transformierten HPC über das Gefäßsystem an tumorspezifische Prädilektionsstellen und etablierten dort eine prä-metastatische Nische [13]. Dieser vorbereitende Schritt ermöglichte es den im Nachgang abgelösten Tumorzellen in dem räumlich entfernt liegenden Gewebe zu adhären und eine Metastase zu bilden [13, 14]. Vor diesem Hintergrund wurde das Konzept des regionalen TMM um eine metastatische bzw. periphere Mikroumgebung erweitert, die ebenfalls Einfluss auf die Tumorprogression ausübt [3].

Unter den verschiedenen zellulären Vertretern des TMM rückte in den vergangenen Jahren eine besonders potente Zellpopulation in den Vordergrund. Hierbei handelt es sich um die MSC, eine Stammzellpopulation, die in nahezu jedem Gewebe des menschlichen Körpers vorkommt und über ein ausgeprägtes Differenzierungspotential verfügt [15]. Für viele unterschiedliche Tumorarten konnte gezeigt werden, dass MSC der Tumorumgebung in einem engen Austausch mit den Tumorzellen stehen und deren Aggressivität relevant beeinflussen [16, 17, 18]. Die besonderen Eigenschaften der MSC sowie ihr Stellenwert im TMM werden in den nachfolgenden Abschnitten weiter vertieft.

1.1.2 Humane mesenchymale Stammzellen

Um die Bedeutung der MSC als Teil des TMM für die Tumorbiologie nachvollziehen zu können, ist es sinnvoll zunächst ihre physiologischen Eigenschaften und Funktionen zu betrachten. Als multipotente Stammzellen verfügen MSC über die Fähigkeiten sich selbst zu replizieren („self renewal“) und in verschiedene Zelllinien zu differenzieren [15, 19, 20]. Viele andere adulte Zellpopulationen sind im Gegensatz hierzu bereits ausdifferenziert und haben ihren Stammzellcharakter verloren [19]. Während die osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung der MSC bereits früh beschrieben wurde, konnten sie bis heute in vitro erfolgreich in Zellreihen aller drei embryonalen Keimblätter (Mesoderm, Endoderm und Ektoderm) differenziert werden [21, 22]. Auf Grund dieses Differenzierungspotentials scheint den MSC insbesondere für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und -regeneration eine herausragende Bedeutung zuzukommen [26, 27]. Gesteuert durch Chemokine, Wachstumsfaktoren und Zytokine können MSC gezielt in geschädigtes Gewebe migrieren und differenzieren, wodurch sie die Gewebsregeneration fördern [23]. Wegen ihres außergewöhnlich hohen Regenerationspotentials gelten MSC als vielversprechende Quelle in der modernen regenerativen Medizin [24]. Darüber hinaus weisen MSC ein ausgeprägtes pro-angiogenes Potential auf und besitzen immunmodulatorische Eigenschaften [25, 26, 27].

Bis heute wurden MSC aus einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe extrahiert, hierzu zählen u. a. menschliches Knochenmark, Fett-, Herzmuskel- und Harnblasengewebe sowie Endometrium, Menstruationsblut und menschliche Zahnpulpa [20, 24, 28, 29, 30]. Während anfänglich angenommen wurde, dass es sich bei allen isolierten MSC um eine homogene Zellpopulation mit einheitlichem Phänotyp und Differenzierungspotential handelte, demonstrierten Bayraktar, Grotheer et al. (2017) hingegen, dass MSC aus verschiedenen Ursprungsgeweben in ihrem Phänotyp und Differenzierungsverhalten variierten [31]. Die gewebespezifischen Unterschiede der isolierten MSC führten dazu, dass sich in der Literatur weitere namensgebende Begriffe etablierten, u. a. das häufig genutzte Synonym „mesenchymale Stromazellen“ [32]. Kompliziert wird dieser Aspekt dadurch, dass bis heute kein spezifischer Oberflächenmarker für MSC entdeckt wurde [33]. Daher ist es gängige Praxis MSC über eine Konstellation aus Oberflächenmarkern und Eigenschaften zu identifizieren. Hierzu zählen die Plastikadhärenz der Zellen, eine fibroblasten-ähnliche Morphologie sowie die Expression verschiedener Oberflächenantigene, z. B. CD90 (engl. cluster of differentiation), CD29 und CD44 [31].

1.1.3 Einfluss von MSC auf die Tumorprogression

Die Fähigkeit in verschiedenste Zelltypen differenzieren zu können und das Vorkommen in vielen Geweben begründen, warum MSC zunehmend auch in den Fokus der Erforschung des TMM rücken. Hierzu trug die Beobachtung bei, dass die Anzahl an MSC in der unmittelbaren Tumorumgebung im Laufe der Tumorprogression zunimmt [34]. Die Untersuchung zu den Auswirkungen der MSC auf die Tumoraggressivität ist gleich aus mehreren Gründen von großem klinischem Interesse: Auf der einen Seite könnte eine gezielte pharmakologische Beeinflussung der multipotenten MSC ein neues vielversprechendes Ziel in der Tumorthherapie darstellen [35]. Auf der anderen Seite muss ein potenzieller prokanzerogener Effekt dieses Stammzellsubtyps für deren sicheren Gebrauch im Rahmen regenerativer Therapien analysiert werden [24].

Bis heute konnte tatsächlich für etliche Tumorentitäten belegt werden, dass MSC einen relevanten Einfluss auf die Tumorprogression ausüben [16, 36, 37]. Allerdings existiert kein einheitlicher Konsens dazu, ob MSC eine anti- oder prokanzerogene Wirkung besitzen. Während ein Großteil der Literatur die Hypothese einer progressionsfördernden Wirkung der MSC stützt, existiert auch reichlich Evidenz dafür, dass sie die Tumorprogression inhibieren [17, 38, 39, 40]. Tatsächlich wird aktuell vermutet, dass im TMM desselben Tumors sowohl Tumor-inhibierende als auch -fördernde MSC koexistieren [38]. Die enge Interaktion zwischen MSC und den Tumorzellen findet Ausdruck im Konzept der Tumor-assoziierten MSC (engl. cancer associated MSC, CA-MSC). Dieses Konzept greift insbesondere den Aspekt auf, dass sich die MSC im TMM in Relation zum Tumorfortschritt zunehmend verändern [41, 42]. In den kommenden Kapiteln wird der aktuelle Kenntnisstand zur Wirkung der MSC auf progressionsrelevante Eigenschaften von Tumoren zusammengefasst. Dabei werden insbesondere die in Abb. 1 dargestellten Aspekte der Tumorprogression fokussiert.

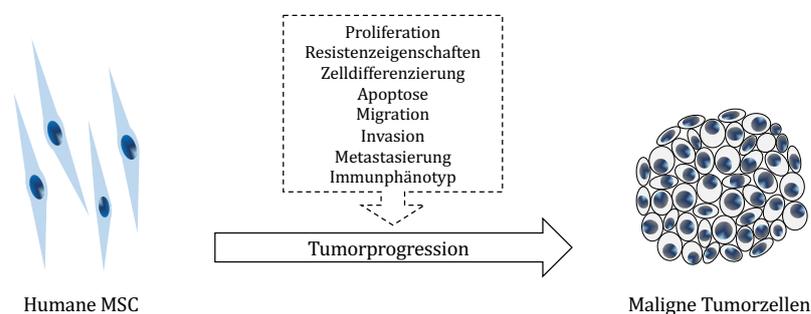


Abb. 1: Der Einfluss von MSC auf progressionsrelevante Eigenschaften von Tumorzellen. Neben dem Tumorwachstum gibt es weitere Tumoreigenschaften, die die Prognose der Patienten und die therapeutischen Optionen bestimmen. Hierzu zählen die Zelldifferenzierung, die Apoptose, die Motilität der Zellen, die Invasivität, der Prozess der Metastasierung, der immunologische Phänotyp sowie die Resistenzeigenschaften der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika.

1.1.3.1 Modulation des Tumorwachstums

Maligne Tumore sind meist durch eine hohe Proliferationsgeschwindigkeit gekennzeichnet [43]. Dabei ist eine gesteigerte Zellteilungsrate häufig mit einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit und verschlechterten Prognose des Patienten assoziiert [43]. Für diverse Tumorsubtypen konnte belegt werden, dass MSC des TMM das Tumorwachstum beeinflussen. U. a. wurde für Zelllinien aus Mamma- und Magenkarzinomen sowie Osteosarkomen und kolorektalen Karzinomen ein proliferationsfördernder Effekt durch MSC belegt [44, 45, 46]. Erste Mechanismen, die diese Steigerung der proliferativen Kapazität vermitteln, konnten identifiziert werden. Bspw. wurde eine direkte Beeinflussung des Zellzyklus der Tumorzellen durch MSC-Exosomen beschrieben, die mit einer erhöhten Zellteilungsrate einherging [47]. Daneben wurde festgestellt, dass MSC durch die Sekretion des pro-angiogen wirkenden Interleukins IL-6 (engl. Interleukin), die Neoangiogenese im Tumorbett fördern und dadurch die Proliferationsrate der Tumorzellen erhöhen konnten [46, 48]. In diesem Zusammenhang wurde auch beobachtet, dass Tumorzellen die CA-MSC ihrer Umgebung stimulieren können, so dass diese einen Perizyten- oder Endothelzell-ähnlichen Phänotyp annehmen [49]. Mit Hilfe dieses adaptierten Phänotyps können sie anschließend gezielter die Vaskularisation des Tumors steuern und durch ein verbessertes Sauerstoff- und Nährstoffangebot die Proliferation der Tumorzellen effektiver steigern [49].

1.1.3.2 Einfluss auf die Differenzierung und den Stammzellcharakter

Ein moderner Bereich der Tumorforschung beschäftigt sich mit den so genannten Krebsstammzellen (engl. cancer stem cells, CSC) bzw. dem Stammzellcharakter (engl. stemness) von Tumoren [50, 51]. Bei den CSC handelt es sich um spezialisierte Tumorzellen, die über stammzelltypische Eigenschaften verfügen [52]. Wie es scheint, beeinflussen CSC nicht nur maßgeblich progressionsrelevante Eigenschaften, wie die Therapieresistenz oder die Metastasierung eines Tumors, sondern auch die Entwicklung eines Tumorrezidivs [50, 51, 53]. Trotz großer Fortschritte in der Identifikation spezifischer CSC-Oberflächenmarker, stellt die Unterscheidung der Krebsstammzellen von den übrigen Tumorzellen bis heute eine Herausforderung dar. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass sich die CSC verschiedener Tumorarten voneinander unterscheiden und selbst innerhalb eines Tumors eine heterogene CSC-Population vorhanden sein kann [51, 54]. Bspw. stellt das Zytokeratin 14 (CK14) bisher einen spezifischen CSC-Marker des muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase (UC) dar, wohingegen sich der membrangebundene Rezeptor für Hyaluronsäure (engl. hyaluronic acid, HA) CD44 für verschiedene Tumorentitäten als CSC-Marker etabliert hat [55, 56].

Zum Einfluss von MSC auf die CSC-Population und den Stammzellcharakter von Tumoren existieren derzeit erste Ergebnisse. Diese legen nahe, dass MSC des TMM die Expression von CSC-Markern steigern können, wodurch die invasive und metastatische Kapazität der Tumorzellen zunehmen [57, 58]. Bspw. induzierten MSC durch die Sekretion von IL-6 eine verstärkte Expression von CD44 auf der Oberfläche von Zelllinien aus kolorektalen Karzinomen, was u. a. mit einer erhöhten Proliferationsrate, Invasivität und einer EMT-Induktion der Tumorzellen, assoziiert war [56].

1.1.3.3 Effekte auf die Apoptose

Um die Auswirkungen der MSC des TMM auf die Apoptose von Tumorzellen nachvollziehen zu können, ist es hilfreich zunächst die physiologischen Hintergründe des Caspase-abhängigen Zelltodes zu betrachten. Physiologisch stellt die Apoptose u. a. einen natürlichen Schutzmechanismus vor der Tumorentstehung dar, so kann z. B. das Auftreten von DNA-Schäden als Ausgangspunkt der Karzinogenese die Apoptose der betroffenen Zelle induzieren [59, 60]. Es gilt als gesichert, dass die Fehlregulation der Apoptose eine entscheidende Komponente in der Tumorgenese, -progression und der Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber antikanzerogenen Therapien darstellt [40, 61]. Übergeordnet werden zwei Mechanismen der Apoptose-Induktion unterschieden. Der extrinsische Weg wird durch verschiedene extrazelluläre Mediatoren initiiert, die mit den membrangebundenen Todesrezeptoren interagieren und die Apoptose der Zielzelle auslösen [62]. Der intrinsische Weg hingegen wird durch intrazelluläre Faktoren wie DNA-Schäden, Replikationsstress oder eine hohe intrazelluläre Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induziert [60, 63]. Ein entscheidender Mechanismus, mit dessen Hilfe die Tumorzellen die Apoptoseinduktion umgehen können besteht in einem Ungleichgewicht in der Expression von anti- und proapoptotischen Faktoren [64]. Die komplexe Regulation dieser Faktoren wird in Abb. 2 zusammengefasst.

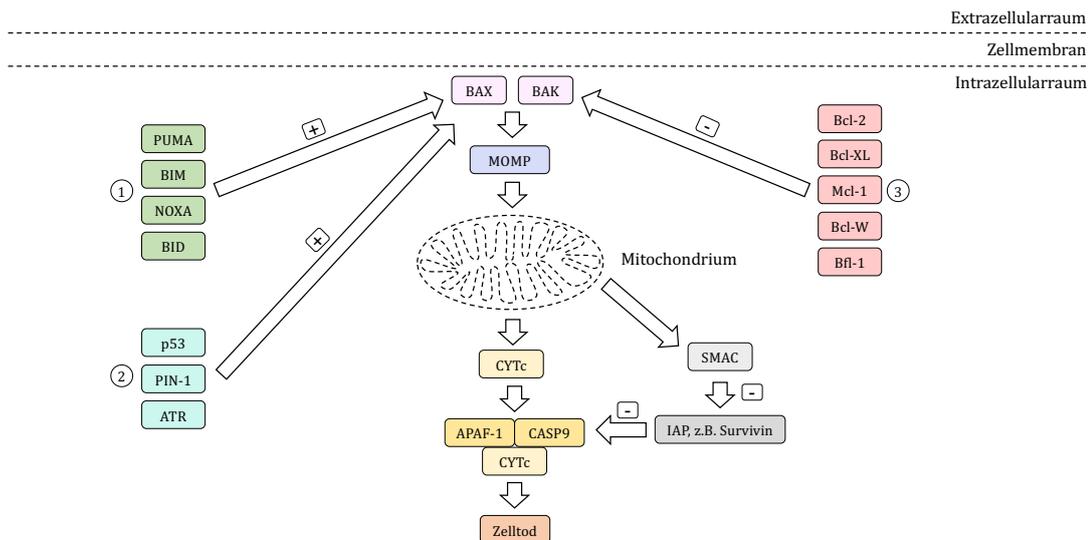


Abb. 2: Schematische Darstellung der intrinsischen Aktivierung der Apoptose. Physiologisch wird der intrinsische Signalweg der Apoptose durch verschiedene Faktoren aktiviert. Hierzu zählen u. a. DNA-Schäden und mitotische bzw. mikrotubuläre Defekte [60, 63]. Im Zentrum der Signalkaskade steht die irreversible Permeabilisation der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP, engl. mitochondrial outer membrane permeabilization) [59]. Im Rahmen der MOMP gelangen mitochondriale Proteine wie CYTc (engl. Cytochrome c) und SMAC (engl. Second mitochondrial activator of caspases) in das Zytoplasma [59]. CYTc bildet ein Oligo-Heteromer mit APAF1 (engl. Apoptotic peptidase activating factor 1) und Pro-Caspase 9 (CASP9) [63]. Die Caspasekaskade wird aktiviert und initiiert den Zelltod [63]. Das ebenfalls freigesetzte SMAC hemmt hingegen Apoptose-Inhibitoren (IAP), zu denen u. a. Survivin gehört [63]. In Abwesenheit von SMAC hemmt Survivin die Dimerisierung von APAF-1 und CASP9 [65]. Eingeleitet wird die MOMP durch die Proteine BAX (engl. Bcl-2 associated X) und BAK (Bcl-2 killer 1) [59, 63]. BAX und BAK werden durch pro- und antiapoptotische Moleküle reguliert, deren Großteil der Bcl-2-Familie angehören. ① Zu den proapoptotischen Mediatoren gehören PUMA (engl. p53-upregulated modulator of apoptosis), BIM (engl. Bcl-2 interacting mediator of cell death), NOXA (syn. Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1) und BID (engl. BH3-interacting domain death agonist) [59, 63]. Neben der Bcl-2-Familie existieren weitere unabhängige Regulatoren von BAX und BAK. ② Ebenfalls proapoptotisch wirken p53 (engl. tumor protein p53), PIN-1 (engl. peptidyl prolyl cis/trans isomerase NIME-interacting 1) und ATR (engl. ATR serine/threonine kinase) [63]. ③ Die antiapoptotisch wirkenden Mediatoren sind Bcl-2 (engl. B-cell lymphoma), Bcl-XL, Mcl-1 (engl. myeloid cell leukemia 1), Bcl-W und Bfl-1 (syn. Bcl-2 related protein A1, Bcl-2-A1) [59, 60, 63].

Bis heute bleibt der Effekt von MSC des TMM auf die apoptotischen Eigenschaften von Tumorzellen ungeklärt, was insbesondere auf widersprüchliche Ergebnisse zurückzuführen ist. Auf der einen Seite gibt es Hinweise dafür, dass MSC eine immortalisierende Wirkung auf Tumorzellen ausüben [36, 40]. Bspw. konnte für Blasten akuter B-Zell-Leukämien gezeigt werden, dass MSC aus dem Knochenmark durch die Sekretion von PGE₂ (engl. prostaglandine E₂) eine Senkung des Expressionsniveaus von p53 in den Tumorzellen bewirkten [66]. Dies resultierte in einer verringerten BAX- und BAK-Aktivierung und somit in einer Hemmung der Apoptose [66]. Auf der anderen Seite gibt es Anhaltspunkte für eine proapoptotische Wirkung der MSC. Entgegen den zuvor geschilderten Ergebnissen, demonstrierten Lu et al. (2019), dass MSC über die Aktivierung des PI3K-Akt-Signalwegs (Phosphatidylinositol-3-Kinase) die Bcl-2-Expression einer Glioblastom-Zelllinie reduzierte und das p53-Expressionsniveau steigerte [40]. Dies resultierte in einer signifikant erhöhten Apoptoserate der Tumorzellen [40]. Die

beschriebenen gegensätzlichen Ergebnisse begründen, weshalb die Interaktion von MSC und Tumorzellen weiterer Exploration bedarf.

1.1.3.4 Einfluss auf die Migration und Invasivität von Tumorzellen

Die Eigenbeweglichkeit einer Zelle wird als Migration bezeichnet [67]. Sie stellt im Gegensatz zur Invasivität zwar kein eigenständiges Malignitätskriterium dar, ist aber dennoch entscheidend für die Tumormetastasierung [67]. Die Invasivität umfasst stattdessen die gerichtete Bewegung maligner Zellen durch die umliegende ECM mit Überschreitung der histologischen Grenzen des Ursprungsgewebes [68]. Analog zu den zuvor erläuterten Tumoreigenschaften konnte auch für die migratorische und invasive Kapazität von Tumorzellen ein Einfluss von MSC des TMM beobachtet werden. Zhang et al. demonstrierten, dass CA-MSC aus kolorektalen Karzinomen die Invasivität und Migration der Tumorzellen steigerten [46]. Eine entsprechende Migrations- und Invasivitätsfördernde Wirkung von MSC wurde auch für Zelllinien aus malignen Melanomen, Mamma- und Lungenkarzinomen dokumentiert [47, 69, 70, 71]. Die Steigerung der migratorischen und invasiven Eigenschaften der Tumorzellen durch die CA-MSC erfolgt dabei nachweislich auf unterschiedlichen Wegen. Durch die Sekretion parakriner Mediatoren, wie den Chemokinen CXCL12 (engl. C-X-C motif chemokine ligand 12, syn. ligand stromal cell-derived factor-1, SDF-1), CCL5 (engl. CC-Chemokine-Ligand) und CCL9 induzieren MSC die verstärkte Expression von Metalloproteinasen (MMP), mit deren Hilfe Tumorzellen die Bestandteile der ECM proteolytisch degradieren können [72]. Die herabgesetzte ECM-Dichte erleichtert den malignen Zellen die Fortbewegung und erhöht somit die Migration und Invasivität [72]. Durch die Sekretion von CXCL12 können MSC zusätzlich direkt die Actin-Polymerisation und Pseudopodien-Bildung der Tumorzellen verstärken, was ebenfalls als begünstigender Faktor für die zelluläre Mobilität angesehen wird [76, 77]. Weiterhin sekretieren MSC IL-6 und IL-8, was nachweislich eine erhöhte Expression des HA-Rezeptors CD44 bewirkt [56, 73, 74]. Wie bereits erwähnt handelt es sich bei CD44 um einen klassischen CSC-Marker (Abschnitt 1.1.3.2), darüber hinaus beeinflusst die CD44-Expression aber auch auf direktem Weg progressionsrelevante Tumoreigenschaften [56, 73, 74]. Ein Überblick über die Bedeutung von CD44 im Kontext der Tumorprogression lässt sich Abb. 3 entnehmen.

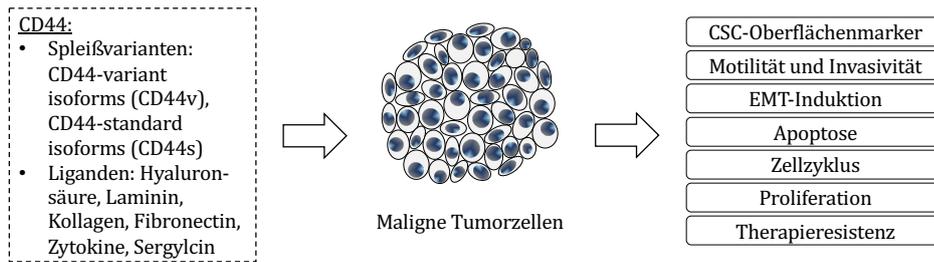


Abb. 3: Die Bedeutung der CD44-Expression für die Tumorprogression. Die CD44-Familie umfasst eine Gruppe von Isoformen des membranständigen CD44-Rezeptors. Es existieren mehrere posttranskriptionelle alternative Spleißvarianten, deren Obergruppen in CD44v (engl. CD44-variant isoforms) und CD44s (engl. CD44-standard isoforms) unterteilt werden [75]. Den Hauptliganden des CD44-Rezeptors stellt die HA der ECM dar, dennoch interagiert CD44 auch mit einer Vielzahl weiterer Faktoren, zu denen u. a. Zytokine zählen [76, 77, 78]. Physiologisch vermittelt CD44 die Adhäsion von Zellen an der ECM, koordiniert die Hämatopoese, die embryonale Extremitäten-Entwicklung und reguliert die Migration von Lymphozyten in peripheren Geweben [76]. Im Kontext der Tumorentwicklung wurde CD44 als prognostisch ungünstiger CSC-Marker identifiziert [53, 79]. Zudem ist eine erhöhte Expression für viele Tumorentitäten mit einer gesteigerten Migration und Invasivität assoziiert [80, 81]. Bspw. vermittelt CD44 über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) eine Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und bewirkt dadurch eine erhöhte Metastasierungsrate [77]. Zusätzlich übt der Rezeptor Einfluss auf die Apoptose, den Zellzyklus und die Proliferation von Tumorzellen aus [77]. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen einem hohen CD44-Expressionsniveau und einer verstärkten Therapieresistenz gegenüber diversen Chemotherapeutika sowie der Radiotherapie von Tumoren beobachtet werden [82, 83].

Schließlich fördern MSC die Migration und Invasivität von Tumorzellen durch die Beeinflussung des zellulären Phänotyps [84]. Dieser Aspekt ist besonders im Kontext der Tumormetastasierung von Bedeutung und wird daher im Anschluss an dieses Thema weiterführend erläutert.

1.1.3.5 Einfluss auf den zellulären Phänotyp und die Metastasierung

Der Prozess der Metastasierung beschreibt die Ablösung maligner Zellen aus dem primären Tumorzellverbund, ihre Dissemination im Körper bis hin zur Ausbildung einer Metastase in einem entfernt liegenden Organ bzw. Gewebe [85]. Die Fähigkeit zur Metastasierung stellt nicht nur ein essentielles Malignitätskriterium dar, sondern bedeutet für den Großteil aller Tumorentitäten zugleich auch einen einschneidenden Wendepunkt für den Therapieerfolg und die Prognose der Patienten [86]. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wird durch eine stattgehabte Metastasierung häufig derart reduziert, dass nur noch ein palliatives Therapiekonzept verfolgt werden kann [87]. Dies erklärt, warum der Prozess der Metastasierung seit vielen Jahren im Fokus der Tumorforschung steht. Nichtsdestotrotz sind die Details dieses pathologischen Vorgangs bis heute nicht vollends verstanden. Das Konzept eines linearen Ablaufs, bestehend aus der Loslösung von einigen wenigen Tumorzellen, ihrem Eintritt in das Gefäß- oder Lymphsystem (Intravasation), dem anschließenden Austritt im Bereich des Zielgewebes (Extravasation) und der dortigen Kolonialisierung wurde inzwischen stark erweitert [85]. Hierzu hat die Erkenntnis

beitragen, dass MSC des TMM ein Schlüsselereignis des Metastasierungsprozesses relevant beeinflussen können [84, 88, 89]. Hierbei handelt es sich um die so genannte Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) [84, 88]. Im Rahmen der EMT verlieren die epithelialen Tumorzellen ihre charakteristischen Eigenschaften zu Gunsten eines mesenchymalen Phänotyps [85]. Es wird angenommen, dass Tumorzellen erst nach dem Durchlaufen der EMT die Fähigkeit erlangen, sich aus dem Primärtumor zu lösen und systemisch zu zirkulieren [90]. Interessanterweise konnte bereits für verschiedenste Tumorentitäten ein EMT-fördernder Effekt von MSC des TMM auf die Tumorzellen nachgewiesen werden [84, 88, 89]. Zu möglichen Vermittlern der EMT-induzierenden Wirkung der MSC zählen u. a. Zytokine wie TGF- β (engl. transforming growth factor), TGF- α und IL-6 sowie die Wachstumsfaktoren HGF (engl. hepatocyte growth factor), EGF (engl. epidermal growth factor), PDGF (engl. platelet-derived growth factor) und FGF (fibroblast growth factor) [45, 46, 70, 92, 99]. Von besonderem Interesse ist die Entdeckung, dass die EMT auch in umgekehrter Richtung ablaufen kann, was entsprechend als Mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bezeichnet wird [91]. Während es erste Erkenntnisse bezüglich der physiologischen Funktionen der MET (Embryo- und Organogenese) gibt, ist die Bedeutung des MET-Phänomens von Tumorzellen nur unzureichend erforscht [92]. Erste Ergebnisse legen nahe, dass eine durchlaufene MET mit einer geringeren Dissemination und Metastasierung der Zellen assoziiert zu sein scheint [98, 105]. Es gibt aber Grund zur Annahme, dass auch die MET eine tragende Rolle im Rahmen einer erfolgreichen Metastasierung spielt, denn wie es scheint, müssen die Tumorzellen nach der Extravasation im peripheren Gewebe die MET durchlaufen, um dort proliferieren und einen Sekundärtumor etablieren zu können [98, 102]. In Abb. 4 werden die Abläufe der EMT und MET veranschaulicht.

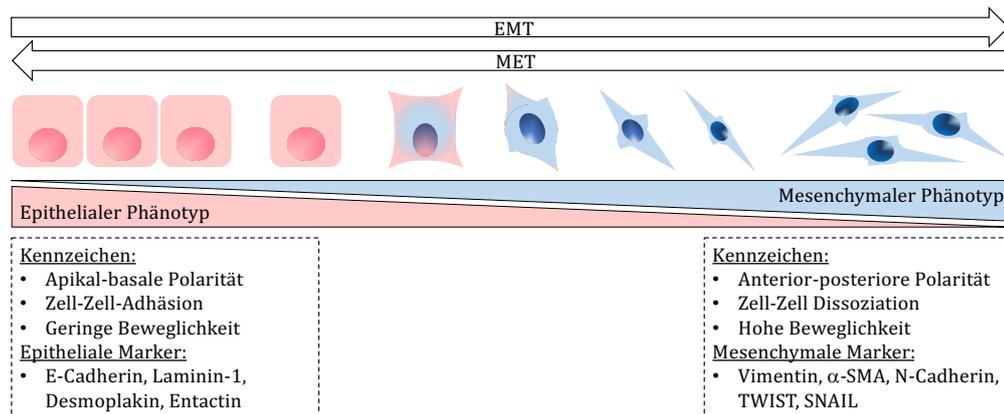


Abb. 4: EMT und MET. Im Rahmen der EMT verlieren die Zellen ihre epithelialen Eigenschaften wie eine apikal-basale Polarität, interzelluläre Adhäsionsmoleküle und ihre eingeschränkte Motilität [85]. Dies spiegelt sich auf molekularer Ebene in einer verringerten Expression epithelialer Marker wie E-Cadherin oder Entactin wider [85]. Stattdessen nehmen die Zellen einen zunehmend mesenchymalen, spindelförmigen Phänotyp mit einer anterior-posterioren Polarität und einer steigenden Zell-Zell-Dissoziation an [85]. Sie kennzeichnen sich durch eine hohe Eigenbeweglichkeit und exprimieren verstärkt mesenchymale Marker wie Vimentin oder α -SMA (engl. alpha-smooth muscle actin) [85, 93]. Die Umkehr dieses Prozesses wird als MET bezeichnet [91]. Eine häufig angewandte Methode zur Analyse der EMT bzw. MET ist die Bestimmung epithelialer und mesenchymaler Marker. Etabliert ist in diesem Kontext die Detektion des epithelialen Markers E-Cadherin sowie des mesenchymalen Markers Vimentin [75, 93].

Als besonders potente EMT-Induktoren wurden inzwischen die verschiedenen Zytokine der TGF- β -Familie identifiziert [58, 93]. Unter physiologischen Bedingungen steuert diese Zytokinfamilie insbesondere die Proliferation, Differenzierung und die Apoptose von Körperzellen [93, 94]. Im Kontext der Tumorprogression stellen MSC des TMM einen relevanten TGF- β -Produzenten dar [70]. Neben einer EMT-Induktion scheint die Sekretion der TGF- β -Zytokine die Tumorinitiation, -vaskularisation, -invasivität und -metastasierung relevant zu verstärken [58, 93]. Für die Signalvermittlung von TGF- β im Kontext der EMT sind ein SMAD-abhängiger (engl. sma- and mad-related protein) und ein SMAD-unabhängiger Signalweg beschrieben [93]. Die SMAD-vermittelte Expressionssteigerung wichtiger EMT-Transkriptionsfaktoren und ihre Auswirkungen auf die Expression von E-Cadherin und Vimentin werden in Abb. 5 visualisiert. Auch der nicht kanonische TGF- β -Signalweg (SMAD-unabhängig) resultiert in der Aktivierung potenter EMT-Induktoren wie MTA1 (engl. metastasis-associated protein 1), SOX4 (engl. SRY-Box transcription factor 4) und EZH2 (engl. enhancer of zeste homolog 2) [95].

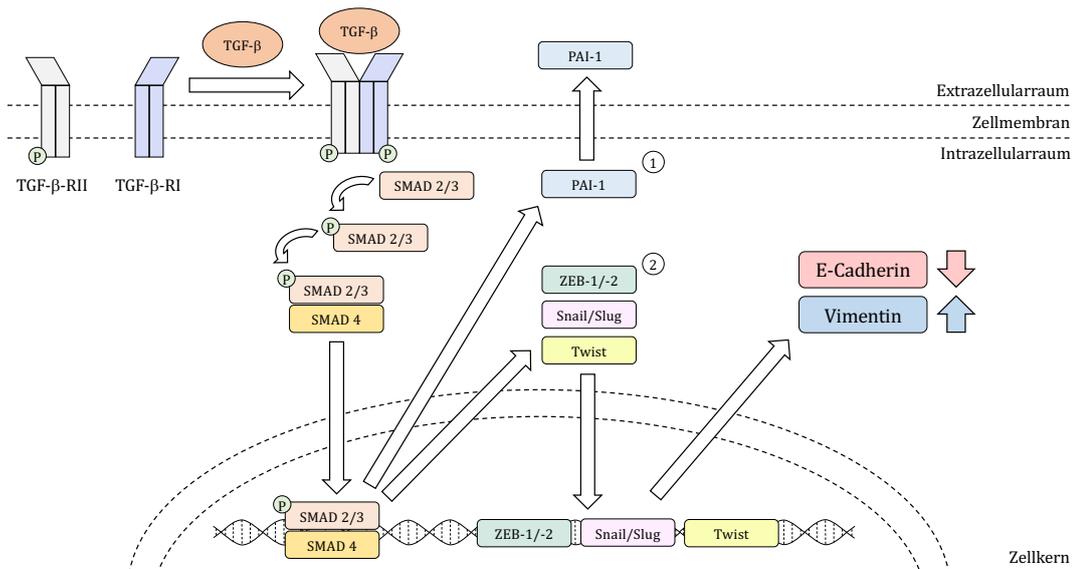


Abb. 5: TGF- β -vermittelte SMAD-abhängige EMT-Induktion. Die SMAD-abhängige EMT-Induktion durch TGF- β wird durch die Bindung des Liganden an den membranständigen TGF- β -Rezeptor II (RII) initiiert [93]. Dieser fungiert als konstitutiv aktive Kinase und dimerisiert mit dem TGF- β -Rezeptor I (RI) [93]. Durch die Phosphorylierung des TGF- β -RI bindet die intrazelluläre Domäne des Rezeptors einen Proteinkomplex, bestehend aus einem Heterodimer von SMAD2 und SMAD3 [96]. Der Komplex wird phosphoryliert, woraufhin er eine Bindung mit SMAD4 eingeht [96]. ① Das Hetero-Oligomer transloziert in den Zellkern und bewirkt im Kontext der EMT-Induktion als Transkriptionsfaktor insbesondere die Expression von ZEB-1/ZEB-2 (engl. zinc finger E-Box binding homeobox), Snail/Slug und Twist [93, 97]. Die zuletzt genannten Proteine wirken ihrerseits als Transkriptionsfaktoren und senken das Expressionsniveau von E-Cadherin bzw. erhöhen die Expression von Vimentin [95]. ② Unabhängig von der EMT-induzierenden Wirkung, steigert das Hetero-Oligomer aus SMAD2, SMAD3 und SMAD4 auch die Expression von PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type 1), dessen Analyse dazu genutzt werden kann, die Aktivität des TGF- β -Signalwegs zu untersuchen [98].

Zusätzlich zur Beeinflussung des zellulären Phänotyps, können MSC das metastatische Potential von Tumorzellen auch durch die Sekretion verschiedener Chemokine modulieren. Diese können mit membrangebundenen Rezeptoren interagieren und als „Lockstoff“ für Zellen fungieren [62]. Die Migration der Zellen erfolgt dabei gerichtet und entlang eines Konzentrationsgefälles ausgehend von der niedrigsten hin zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration [62]. Es wird vermutet, dass bspw. die Intra- und Extravasation der Tumorzellen im Zuge der Metastasierung durch Chemokine koordiniert werden [99]. Ein bedeutsames chemotaktisch wirksames Protein, das von MSC produziert und dem eine Bedeutung in der Tumorprogression zugeschrieben wird, stellt CXCL12 dar [99]. Das von den MSC sekretierte CXCL12 bindet an die membranständigen Rezeptoren CXCR-4 (engl. C-X-C motif chemokine receptor), CXCR-7 und CXCR-3 auf der Oberfläche der Tumorzellen, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden [100]. Die Bedeutung der CXCL12-CXCR-4-Interaktion ist bisher am intensivsten erforscht. Für eine Vielzahl unterschiedlicher Tumore, zu denen bspw. das UC der Harnblase, das Schilddrüsen- sowie das kolorektale Karzinom und das maligne Melanom gehören, wurde ein Zusammenhang der CXCL12-CXCR-4-Interaktion mit der Tumorprogression demonstriert [100, 101, 102, 103].

Dabei scheint die genannte Interaktion eine gesteigerte Zellproliferation, lymphogene Invasivität und Metastasierungswahrscheinlichkeit sowie eine herabgesetzte Apoptose der Tumorzellen zu bewirken [100, 103, 104]. Aktuell wird zudem die Bedeutung der CXCR-4-Expression von Tumoren hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft für die Entstehung eines Tumorrezidivs untersucht [101].

1.1.3.6 Modulation des immunologischen Phänotyps und der Immunevasion

Im Laufe der Tumorinitiation und -progression entwickeln Tumorzellen Mechanismen, mit denen sie sich der Überwachung des Immunsystems entziehen können [105]. Dieser Prozess wird als Immunevasion (engl. immune escape) bezeichnet und gewann in den vergangenen Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit [105]. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass bereits erste wirksame Medikamente entwickelt wurden, die eine Inhibition der Immunevasion von Tumorzellen bewirken können, wodurch diese besser durch die körpereigene Immunabwehr erfasst und bekämpft werden [106]. Bspw. bedeutete die Markteinführung der Immuncheckpoint-Inhibitoren für Tumore wie das maligne Melanom tiefgreifende Fortschritte in der Therapie und Prognose metastasierter Tumorstadien [107]. Die Wirkstoffe binden an den PD-1-Rezeptor (engl. programmed cell death protein 1-receptor) auf der Oberfläche von T-Zellen und verhindern dadurch die Interaktion mit dem zugehörigen Liganden PD-L1 (engl. programmed cell death protein 1-ligand) [107]. Dieser wird vermehrt von Tumorzellen exprimiert, da die Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor immunsuppressiv wirkt und die antitumorale T-Zell-Aktivität hemmt [107]. Da MSC sich durch ein außergewöhnliches immunmodulatorisches Potential auszeichnen und sowohl ein pro- als auch antiinflammatorisches Milieu im Gewebe etablieren können, stellen sie potentielle Regulatoren des immunologischen Phänotyps von Tumorzellen dar [108]. Eine Förderung der antitumoralen Immunantwort durch Modulation der MSC im TMM könnte ein zukünftiges Ziel antikanzerogener Therapiestrategien darstellen [109].

1.1.3.7 Einfluss auf die Therapieresistenz

In den vorangehenden Abschnitten wurde der Einfluss von MSC auf relevante progressive Eigenschaften von Tumoren vorgestellt. Von besonderem klinischem Interesse sind die Auswirkungen der MSC auf die Resistenzeigenschaften von Tumorzellen gegenüber gängigen Chemotherapeutika. Besonders ausgiebig erforscht ist bis dato der Effekt von MSC auf die Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin [36, 110, 111]. Das platinhaltige Pharmakon stellt seit Jahrzehnten einen fundamentalen Bestandteil der Therapie eines breiten Spektrums an Tumoren dar. Bis heute wird der Wirkstoff, meist in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, z. B. für die Therapie des UC der Harnblase,

des Ovarialkarzinoms, des kleinzelligen Bronchialkarzinoms sowie für Kopf-Hals- und Hodentumore eingesetzt [112, 113].

Unter den verschiedenen Wirkweisen von Cisplatin sind drei Mechanismen wesentlich für den zytostatischen Effekt. Zuerst handelt es sich um ein Alkylans, welches Alkylgruppen auf Nukleinsäuren überträgt. Zweitens induziert das Chemotherapeutikum Quervernetzungen der Nukleinsäuren. Drittens erhöht Cisplatin die intrazelluläre Akkumulation von ROS [112]. Die genannten Mechanismen führen zu einer gestörten Teilung und Transkription replizierender Zellen, wodurch der intrinsische Weg der Apoptose aktiviert wird [112]. Die hohe Rezidivrate unter Anwendung von Cisplatin bei fehlenden Therapiealternativen betont die Relevanz der Erforschung der Resistenzmechanismen gegenüber diesem Zytostatikum und der Erforschung alternativer Therapiestrategien. Bisher beschriebene Strategien der Resistenzentwicklung bestehen bspw. in einer verringerten intrazellulären Akkumulation des Wirkstoffs durch eine erniedrigte Aufnahme oder in einer verstärkten Reparatur der induzierten DNA-Schäden [114]. Doch auch MSC des TMM beeinflussen die Therapieresistenz von Tumorzellen gegenüber Cisplatin. Xu et al. (2018) beobachteten, dass MSC durch die Sekretion von IL-6 eine erhöhte Resistenz von Zelllinien aus Mammakarzinomen gegenüber der in-vitro-Behandlung mit Cisplatin bewirkten [115]. Eine ähnliche resistenzfördernde Wirkung von MSC wurde für Zelllinien aus Nasopharyngealkarzinomen belegt [111]. Wie auch für den Einfluss der MSC auf die zuvor beschriebenen progressionsrelevanten Eigenschaften, sind die Ergebnisse zum Einfluss auf die Therapieresistenz konträr. So wurde für Zelllinien aus kleinzelligen Bronchialkarzinomen festgestellt, dass MSC die Cisplatin-Resistenz reduzierten [110]. Die beschriebenen Erkenntnisse unterstreichen, dass ein grundsätzlicher Einfluss von MSC auf die Resistenzeigenschaften von Tumoren naheliegend ist. Diese Entdeckung stellt insbesondere für Tumorentitäten, die sich durch ein geringes Ansprechen auf moderne Chemotherapeutika kennzeichnen, eine vielversprechende Perspektive dar. Eine solche Entität ist bspw. das UC der Harnblase [113]. Dieses zeichnet sich nicht nur durch eine hohe Prävalenz aus, sondern ist im fortgeschrittenen Stadium auf Grund fehlender Therapiealternativen mit einer sehr ungünstigen Prognose assoziiert [86]. Trotz des dringlichen Bedarfs an neuen therapeutischen Ansatzpunkten ist bis heute nur wenig über den Einfluss von MSC auf diese Tumorentität bekannt. Erste Ergebnisse legen zwar eine Beeinflussung von Urothelkarzinom-Zelllinien (UCC) durch MSC des TMM nahe, doch die Beobachtungen sind widersprüchlich und werfen viele unbeantwortete Fragen auf [10, 57, 116]. Auf Grund der unbedingten Notwendigkeit weiterer Fortschritte in der klinischen Diagnostik und Therapie des fortgeschrittenen UC der Harnblase sowie den lückenhaften Erkenntnissen zur Wirkung von MSC, untersucht die vorliegende Arbeit diese

Thematik. Sie befasst sich mit dem Einfluss der MSC auf aggressive Eigenschaften von UCC und verfolgt dadurch das Ziel, die bisherigen Erkenntnisse zur Biologie dieser Tumorentität zu ergänzen. Um den Einfluss der MSC auf UCC nachvollziehen zu können, stellt der nachfolgende Abschnitt zunächst die klinisch-pathologischen Rahmenbedingungen des UC der Harnblase vor.

1.2 Urothelkarzinom der Harnblase

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das UC der Harnblase ist weltweit die neunthäufigste Tumorentität mit einer jährlichen Inzidenz von 12 Millionen Fällen, wobei männliche Patienten nachweislich ein erhöhtes Erkrankungsrisiko aufweisen [117, 118, 119]. Durch die Identifikation und Reduktion verschiedener Risikofaktoren im Laufe der vergangenen 20 Jahre, konnte die Inzidenz- und Sterberate des UC männlicher Patienten leicht gesenkt werden [86]. Eine deutliche Reduktion durch die Entwicklung neuer Therapie- oder Vorsorgemaßnahmen, wie es bspw. für das kolorektale Karzinom beschrieben ist, bleibt bis heute allerdings aus [86]. Die Risikofaktoren für die Entstehung eines UC sind vielfältig. Hierzu zählen u. a. ein steigendes Alter, ein langjähriger Nikotinabusus sowie eine chronische Infektion mit Schistosomen [120, 121, 122].

1.2.2 Klinik und Diagnostik

Ein Grund für die häufig späte Diagnosestellung des UC der Harnblase stellt die inapparente klinische Symptomatik der Patienten dar. Häufig wird die Diagnose erst sekundär gestellt, bspw. beim Auftreten von Knochenschmerzen bei erfolgter ossärer Metastasierung [123]. Die Prognose der Patienten ist in diesem Stadium bereits infaust und die therapeutische Zielsetzung palliativ [113]. Das Leitsymptom des Harnblasenkarzinoms stellt die Makrohämaturie dar, die von irritativen Beschwerden, wie Pollakisurie oder Dysurie begleitet sein kann [124, 125, 126]. Verschiedene bildgebende Verfahren werden in der Diagnostik des UC der Harnblase angewandt. Hierzu zählen insbesondere die Weißlicht-Zystoskopie mit Biopsieentnahme zur histologischen Sicherung in der Primär- und die Computertomographie im Zuge der Ausbreitungsdiagnostik [113, 126].

1.2.3 Histopathologie

Der Großteil aller Harnblasentumore entsteht aus dem Urothel, das auch als Übergangsepithel bezeichnet wird [120]. Dieses stellt die innerste Schicht der Harnblasenwand dar und steht luminal in direktem Kontakt mit dem Urin. An die Basalmembran des Epithels grenzt die Lamina propria, eine dünne Bindegewebsschicht, die

über einen dichten Kapillarplexus verfügt, der die Versorgung des nicht vaskularisierten Epithels sicherstellt [127]. Die nächste Schicht wird durch die Harnblasenmuskulatur gebildet, die für die Kontinenz essenziell ist [127]. Die äußerste Schicht der Harnblase stellt die Tunica adventitia dar, die in den kranialen Bereichen von parietalem Peritoneum überzogen ist [127]. Wie für Tumore üblich wird das Stadium des UC der Harnblase histopathologisch entsprechend der TNM-Klassifikation (Abschnitt 7.1 im Anhang) eingeteilt [113]. Während ein T1-Tumor nicht über die Lamina propria hinausreicht und noch eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit (5J-ÜW) von ca. 82 % aufweist, liegt diese für die muskelinvasiven Stadien T2 und T3 bereits unter 50 % [86]. Im metastasierten Zustand ist lediglich die palliative Versorgung der Patienten möglich und die 5J-ÜW sinkt auf unter 15 % [86].

1.2.4 Therapie fortgeschrittener Tumorstadien

Die starke Reduktion der 5J-ÜW von Patienten mit einem muskelinvasiven UC der Harnblase ist auf eingeschränkte Therapiealternativen und eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine erfolgte Metastasierung bei Diagnosestellung zurückzuführen [123]. Entsprechend radikal fällt das von der deutschen Gesellschaft für Urologie und der deutschen Krebsgesellschaft empfohlene therapeutische Vorgehen in der aktuell gültigen S3-Leitlinie aus. Diese empfiehlt für muskelinvasive UC (\geq pT2) die offene radikale Zystektomie mit bilateraler pelviner Lymphadenektomie bei fehlendem Hinweis auf eine stattgehabte Metastasierung [113]. Ergänzend empfiehlt die Leitlinie die neoadjuvante Kombinationschemotherapie mittels Cisplatin und Gemcitabin [113]. Metastasierte Tumore können nur noch palliativ therapiert werden. In diesem Stadium wird in der Regel auf eine Operation verzichtet und nur bei einem ausreichenden Allgemeinzustand der Patienten eine platinhaltige Kombinationschemotherapie gemäß dem MVAC-Schema (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin) durchgeführt [113,123]. Als Zweitlinientherapie für Patienten mit metastasiertem UC und Tumorprogress unter oder nach einer platinhaltigen Chemotherapie werden Immuncheckpoint-Inhibitoren wie die PD-L1-Inhibitoren Atezolizumab oder Nivolumab empfohlen (s. Abschnitt 1.1.3.6) [113].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss parakriner Signalmediatoren humaner MSC auf relevante Eigenschaften muskelinvasiver UCC der Harnblase. Auf Grund der konträren Ergebnisse zu der Bedeutung der MSC im TMM, ist sowohl eine pro- als auch antikanzerogene Wirkung auf die Tumorzellen denkbar. Daneben ist es ebenfalls möglich, dass sich die UCC als resistent gegenüber dem Einfluss der MSC herausstellen. Um der

molekularen Heterogenität des UC der Harnblase gerecht zu werden, wurden für die Untersuchungen drei verschiedene muskelinvasive UCC ausgewählt: BFTC-905, UMUC-3 und VMCUB-1. Zur Simulation der parakrinen Signaltransduktion, wurde KM aus MSC-Primärkulturen gewonnen und für die in-vitro-Behandlung der UCC eingesetzt. Im Anschluss an die Behandlung wurde der Einfluss des KM auf die Proliferation und die Cisplatinresistenz der UCC untersucht. Weiterhin wurde die Wirkung des KM auf die Apoptose der Tumorzellen analysiert. Da die CSC-Population auch für das UC der Harnblase eine entscheidende Komponente der Aggressivität darstellt, wurden die Auswirkungen des KM auf die Expression der CSC-Marker CK14 und CD44 ermittelt. Die Expressionsanalyse von CD44 ermöglichte zudem einen Einblick in die invasiven Eigenschaften der UCC. Dieser Aspekt wurde um funktionelle Analysen der migratorischen und invasiven Kapazität ergänzt. Ebenfalls wurde der Effekt des KM auf den zellulären Phänotyp der UCC bestimmt, um die Fragestellung zu beantworten, ob die MSC über ein EMT-induzierendes Potential verfügen. Weitere Faktoren wie die Expression des Chemokinrezeptors CXCR-4 wurden ebenfalls in den Analysen zum metastatischen Potential der UCC berücksichtigt. Daneben wurde eruiert, ob das KM den immunologischen Phänotyp der Tumorzellen verändern und dadurch die Immunevasion modulieren kann. Die Gesamtheit der Versuchsansätze sollte dazu beitragen die folgenden Fragestellungen zu beantworten:

1. Beeinflussen lösliche Faktoren der MSC die Tumorprogression der UCC?
2. Unterscheiden sich die Effekte der MSC zwischen den untersuchten UCC?
3. Wird die Wirkung des KM durch die gleichzeitige Zugabe von Cisplatin moduliert?
4. Stellen MSC des TMM ein potenzielles zukünftiges Therapieziel des UC der Harnblase dar?

2 Material

2.1 Patientenproben/Zelllinien

2.1.1 Humane mesenchymale Stammzellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde KM aus MSC-Primärkulturen hergestellt. Alle hierfür verwendeten MSC wurden ursprünglich aus Unterhautfettgewebe von Operationspräparaten isoliert, die in der Abteilung für Plastische Chirurgie des Krankenhauses Köln-Merheim gewonnen wurden. Dabei wurde ausschließlich überschüssiges Gewebe genutzt, wobei das diagnostische und therapeutische Vorgehen zu keiner Zeit beeinträchtigt war. Die verwendeten MSC aus dem Isolationszeitraum 2017-2018 wurden bis zur Verwendung im Rahmen dieser Arbeit kryokonserviert. Die MSC aus dem Zeitraum 2019-2020 wurden direkt in Primärkulturen überführt. Die Patientenaufklärung, Dokumentation, Entnahme sowie die Bereitstellung und Verwendung der Operationspräparate erfolgte auf Basis des für diesen Zweck eingereichten und bewilligten Ethikantrags der Universität Witten/Herdecke (Antragsnummer: 78/2017, bewilligt durch die Ethikkommission am 08.06.2017, **kooperierende Klinik: Krankenhaus Köln-Merheim**). Gemäß der in dem Ethikantrag beschriebenen Vorgehensweise wurden alle Patienten präoperativ ausführlich aufgeklärt und erteilten ihre schriftliche Einwilligung.

2.1.2 Urothelkarzinom-Zelllinien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten kommerziellen UCC wurden vom Forschungslabor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikum Düsseldorf durch Priv. Doz. Dr. M. J. Hoffmann bereitgestellt. Vor Verwendung wurden die Tumorzellen negativ auf Mykoplasmen getestet.

Tab. 1: Überblick über die verwendeten kommerziellen UCC und ausgewählte Charakteristika.

| | BFTC-905 | UMUC-3 | VMCUB-1 |
|--------------------|------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Alter | 51 | unbekannt | unbekannt |
| Geschlecht | w | m | m |
| Ursprung | epithelial | epithelial | epithelial |
| Morphologie | epithelial | mesenchymal | epithelial |
| Referenz | Tzeng et al. (1996) [128] | Grossmann et al. (1986) [129] | Williams (1980) [130] |

2.2 Chemikalien, Reagenzien, Kits

2.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2: Überblick über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

| Chemikalien/Reagenzien | Hersteller |
|--|---------------------|
| 2-Propanol | VWR® Chemicals |
| 2-Mercaptoethanol (β-ME) | Sigma-Aldrich® |
| 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) | Sigma-Aldrich® |
| Alexa Fluor® 488 Streptavidin | Thermo Scientific™ |
| Alexa Fluor® 594 Streptavidin | Thermo Scientific™ |
| BCA Working Reagent A | Thermo Scientific™ |
| BCA Working Reagent B | Thermo Scientific™ |
| Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA) | Carl Roth® |
| Bromphenolblau C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ SNa | Carl Roth® |
| CellTiter-Blue® Reagent | Promega |
| CellWASH | BD® Biosciences |
| Cisplatin Accord (1 mg/ml) | Accord Healthcare |
| Collagenase Type CLS (360 U/mg) | Merck KGaA |
| Complete Mini (EDTA Free) | Roche Diagnostics |
| Demi-Wasser (Aqua dest.) | Fischar |
| DePeX | Serva |
| Dimethylsulfoxid (≥ 99,5 %, DMSO) | Sigma-Aldrich® |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with Ca ²⁺ and Mg ²⁺ (DPBS) | Pan Biotech™ |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | Gibco® |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Ca ²⁺ and Mg ²⁺ (PBS) | Sigma-Aldrich® |
| Erythrozyten-Lyse-Puffer | Zentralapotheke UKD |
| Ethanol | VWR® Chemicals |
| FCS (Hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum) | PAN Biotech™ |
| Fluoromount Aqueous Mounting Medium™ | Sigma-Aldrich® |
| Glycerol (≥ 99,5 %) | Carl Roth® |
| Glycin (≥ 99,0 %) | Carl Roth® |
| GlutaMAX™ Supplement | Gibco® |
| Hydrochloric acid (HCL, Salzsäure) | Merck KGaA |
| Immobilon® Forte Western HRP Substrat | Milipore® |
| Kristallviolett-Fertiglösung (1 %) | Sigma-Aldrich® |
| Matrigel® Matrix phenolrotfrei | Corning® |
| Methanol | Merck KGaA |
| Natriumchlorid (99,5 %, NaCl) | Carl Roth® |
| Natrium Deoxycholat (≥ 98,0 %) | Sigma-Aldrich® |
| Neonidet-P40 (NP40) | US Biological |
| Normal Goat Serum Blocking Solution | Vector Laboratories |
| Opti-MEM® Reduced-Serum Medium without Phenol Red | Gibco® |
| PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix | Applied Biosystems® |

| Chemikalien/Reagenzien | Hersteller |
|---|-------------------|
| Roti®-Histofix 4 % | Carl Roth® |
| Roti®-Mark WESTERN-Marker | Carl Roth® |
| RLT Puffer | Qiagen® |
| RPE Puffer | Qiagen® |
| RW1 Puffer | Qiagen® |
| SDS C ₁₂ H ₂₅ NAO ₄ S (≥ 99,5 %) | Carl Roth® |
| Tris (≥ 99,3 %) C ₄ H ₁₁ NO ₃ | Carl Roth® |
| Tris-Base | Calbiochem® |
| Tris-Hydrochlorid (Tris-HCL) | Calbiochem® |
| Triton™ X-100 | Sigma-Aldrich® |
| Trypan Blue Solution (0,4 %) | Sigma-Aldrich® |
| Trypsin 0,5 %/EDTA 0,2 % in PBS, w/o: Ca and Mg | Pan Biotech™ |
| UltraPure™ Water for Molecular Biology (RNase-freies Wasser) | Milipore®Sigma™ |
| Xylol | VWR® Chemicals |

2.2.2 Kits

Tab. 3: Überblick über die verwendeten Kits.

| Kits | Hersteller |
|---|-------------------|
| Human Serpin E1/PAI-1 Quantikine® ELISA Kit | R&D Systems® |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit | R&D Systems® |
| QIAshredder® | Qiagen® |
| Quantitect® Reverse Transcription Kit | Qiagen® |
| RNase® free DNase Kit | Qiagen® |
| RNeasy® Mini Kit | Qiagen® |
| Roti®-Mark WESTERN-Set | Carl Roth® |

2.3 Puffer- und Lösungsrezepturen

2.3.1 Lösungen für die Zellkultur

Tab. 4: Überblick über Lösungsrezepturen für Arbeiten in der Zellkultur.

| Lösungen | Endkonzentration |
|---------------------------------|-------------------------|
| Erythrozyten-Lyse-Puffer | |
| Ammoniumchlorid | 1,5 % |
| Natriumhydrogencarbonat | 0,2 % |
| Na-EDTA | 0,2 % |
| <i>ad aqua ad injectionem</i> | |
| Kollagenase-dPBS-Lösung | |
| BSA | 1,5 % |
| Kollagenase Typ 1 (270 U/mg) | 0,2 % |
| <i>ad DPBS</i> | |

| Lösungen | Endkonzentration |
|--|-------------------------|
| Trypsin-PBS-Lösung | |
| Trypsin 0,5 %/EDTA 0,2 % in PBS <i>ad PBS</i> | 0,05/0,02 % |

2.3.2 Pufferrezepturen für Western Blot-Analyse

Tab. 5: Überblick über Pufferrezepturen für Western Blot Analysen.

| Puffer und Lösungen | Endkonzentration |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Proteinlysepuffer RIPA | |
| Complete Mini | 1 Tbl. in 10 ml RIPA |
| NaCl | 150 mM |
| Natrium Deoxycholat | 0,5 % |
| NP-40 | 1 % |
| SDS | 0,1 % |
| Tris, pH 8,0 | 50 mM |
| Farblösung Working Reagent | |
| BCA Reagent A | 50:1 |
| BCA Reagent B | 1:50 |
| 4x Laemmli-Puffer | |
| Bromphenolblau | 0,01 % |
| Glycerol | 40 % |
| SDS | 8 % |
| Tris-HCL pH 6,8 | 252 mM |
| Vor Gebrauch: β -ME | 20 % |
| <i>ad A. dest.</i> | |
| 1x Blotting-Puffer | |
| Methanol | 10 % |
| Transferpuffer | 25 x |
| <i>ad A. dest.</i> | |
| Transferpuffer (1x) | |
| Glycin | 96 mM |
| Tris-Base | 12 mM |
| <i>ad A. dest.</i> | |
| Laufpuffer (1x) | |
| Glycin | 192 mM |
| SDS | 0,1 % |
| Tris, pH 8,3 – 8,8 | 25 mM |
| <i>ad A. dest.</i> | |

| Puffer und Lösungen | Endkonzentration |
|-----------------------------|-------------------------|
| TBS-Waschpuffer (1x) | |
| NaCl | 150 mM |
| Tris (pH 7,5) | 7,7 mM |
| <i>ad A. dest.</i> | |
| Blockier-Lösung | |
| BSA | 5 % |
| <i>ad A. dest.</i> | |

2.3.3 Lösungen für molekularbiologische und funktionelle Analysen

Tab. 6: Überblick über die Lösungsrezepturen für RNA-Extraktion, Immunzytochemie, Fluorescence Activated Cell Scanning (FACS)-Analyse und Invasions-Assay.

| Lösungen | Endkonzentration |
|-------------------------------------|-------------------------|
| Cellwash-Lösung | |
| Cellwash | 97 % |
| FCS | 3 % |
| <i>ad PBS</i> | |
| DAPI-Lösung | |
| 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) | 0,1 % |
| <i>ad A. dest.</i> | |
| Kristallviolett-Lösung | |
| Kristallviolett-Fertiglösung | 1 % |
| Matrigel-Gebrauchslösung | |
| Corning® Matrigel® | 2,7 % (216-270 µg/ml) |
| PBSTA-Normal-Goat-Lösung | |
| BSA | 2 % |
| Normales Ziegenserum (10 %) | 2 % |
| Triton X-100 | 1 % |
| <i>ad PBS</i> | |
| RLT-Puffer | |
| β-ME | 1 % |
| <i>ad A. dest.</i> | |

2.4 Zellkulturmedien

Tab. 7: Überblick über die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien. Die aufgeführten Nährmedien beziehen sich auf die Passage der Zellen ohne Versuchsansatz.

| Medium und Zusätze | Endkonzentration |
|--|--------------------------|
| MSC Nährmedium | |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (4,5 g/L D-Glucose) | |
| FCS | 10 % |
| Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) | 10 000 U/ml/10 000 µg/ml |
| UCC-Nährmedium | |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium mit GlutaMAX™ (4,5 g/L D-Glucose) | |
| FCS | 10 % |
| Pen/Strep | 10 000 U/ml/10 000 µg/ml |
| DMSO-Einfriermedium | |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | 10 % |
| <i>ad FCS</i> | |

2.5 Oligonukleotidprimer

Tab. 8: Überblick über die verwendeten Oligonukleotidprimer. AT = Annealing-Temperatur, SDR = Standardreihe für relative Quantifizierung der Expression, *House-Keeping-Gene für Normalisierung

| Gen/Transkript | Primer-Sequenz 5'-3' | AT (°C) | SDR |
|----------------|-------------------------------------|---------|----------|
| Bcl-2 | Fw CCTGTGGATGACTGAGTACCTG | 60 | UMUC-3 |
| | Rv CAGAGGCCGCATGCTGGG | | |
| Bcl-XL | Fw CACAGCAGCAGTTTGGATGC | 55 | VMCUB-1 |
| | Rv ATATGCTGTCCCTGGGGTGA | | |
| CK14 | Fw GCGCACCATGCAGAACCTG | 60 | BFTC-905 |
| | Rv CCTCCACGCTGCCAATCATC | | |
| E-Cadherin | Fw ACCAGAATAAAGACCAAGTGACCA | 60 | BFTC-905 |
| | Rv AGCAAGAGCAGCAGAATCAGAAT | | |
| GAPDH* | Fw CCCTTCATTGACCTC | 60 | BFTC-905 |
| | Rv ATGACAAGCTTCCCG | | |
| Survivin | Fw AGGACCACCGCATCTCTACAT | 60 | VMCUB-1 |
| | Rv AAGTCTGGCTCGTTCAGTG | | |
| Vimentin | Fw AATGGCTCGTCACCTTCGTGAAT | 60 | UMUC-3 |
| | Rv CAGATTAGTTTCCCTCAGGTTTCAG | | |
| ZEB-1 | Fw TCACATAAATCAGGAAGAGATC | 55 | UMUC-3 |
| | Rv CACTGTGAATTCTTAAGTGCTC | | |

2.6 Antikörper

Tab. 9: Überblick über die verwendeten Antikörper.

| Antikörper | Katalog-Nummer | Herkunft |
|---|----------------|------------------------------|
| Primärantikörper | | |
| Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA) | ab7817 | Abcam® |
| CD273/PD-L2 | 557926 | BD® Biosciences |
| CD274/PD-L1 | 563741 | BD® Biosciences |
| CD44 | 550989 | BD® Biosciences |
| CXCR-4 | PA5-19856 | Invitrogen™ |
| E-Cadherin | ab15148 | Abcam® |
| SMAD4 | sc-7966 | Santa Cruz Biotechnology® |
| Vimentin | MA5-14564 | Invitrogen™ |
| Sekundärantikörper | | |
| Allophycocyanin (APC)-Goat-Anti-Rabbit-IgG | 111-136-144 | Jackson ImmunoResearch |
| BD® Pharmingen™ APC-Mouse Anti-Human CD44 | 559942 | BD® Biosciences |
| BD® Pharmingen™ FTC-Mouse Anti-Human CD274 | 558065 | BD® Biosciences |
| BD® Pharmingen™ PE-Mouse Anti-Human CD273 | 558066 | BD® Biosciences |
| Goat-Anti-Rabbit-IgG-Biotin | A16114 | Invitrogen™ |
| Roti®-Mark WESTERN-HRP-Konjugat (aus Kaninchen) | 2245.2 | Carl Roth® |

2.7 Verbrauchsmaterialien

Tab. 10: Überblick über verwendete Verbrauchsmaterialien.

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|---|-------------------------|
| Zellkultur | |
| 50 ml Einmalspritze | B. Braun SE |
| CELLSTAR® 75 cm ² Zellkulturflaschen | Greiner Bio-One |
| CELLSTAR® 175 cm ² Zellkulturflaschen | Greiner Bio-One |
| Cell Lifter Polyethylene 3008 | Corning® Costar® |
| Cell Scraper M | TPP® |
| Cellstar® Cell Culture Dishes, PS, 145/20 mm | Greiner Bio-One GmbH |
| Cellstar® Zellkulturplatten (6, 12, 96 Well-Format) | Greiner Bio-One GmbH |
| Combitips advanced® (2 ml, 5 ml, 10 ml) | Eppendorf SE |
| Filtropur S (0,2 µm) | Sarstedt AG & Co. KG |
| Glas Pasteurpipetten | Brand™ |
| Kryoröhrchen (1,5 ml) | Nalgene® |
| Pipettenspitzen | Eppendorf SE |
| Safe-Lock Tubes (0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml) | Eppendorf SE |
| Safeshield Scalpel No. 11 | Feather® |
| Siebewebe Nylon (250 µm Maschenweite) | Behr Labor-Technik GmbH |
| Stripetten (5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml) | Corning® Costar® |

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|---|---------------------------|
| Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml) | Greiner Bio-One GmbH |
| Konditioniertes Medium | |
| Vakuumfiltrationseinheit Filtrapur V25 (250 ml; 0,2 µm Porengröße) | Sarstedt AG & Co. KG |
| Molekularbiologische Analysen | |
| Collection Tubes (2 ml) | Qiagen® |
| MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film | Applied Biosystems® |
| MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate (0,1 mL) | Applied Biosystems® |
| RNeasy® Mini spin column | Qiagen® |
| QIAShredder® | Qiagen® |
| Western-Blot Analysen | |
| 4-15 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| 7,5 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| Blotting Filter Paper (2,5 mm; 7,5 x 8,4 mm) | Invitrogen™ |
| Mikrotiterplatte 96-Well | Greiner AG |
| PVDF Western Blotting Membranes (Nitrocellulose-Membran) | ROCHE Diagnostics GmbH |
| Invasions-Assay | |
| Deckgläser für Mikroskopie | Engelbrecht GmbH |
| Objektträger | Engelbrecht GmbH |
| Omnifix®-F Tuberkulin/Tuberculin (1 ml) | B. Braun SE |
| Peha® Wattestäbchen | Hartmann |
| ThinCert® Zellkultur Einsatz (24-Well; 8 µm Porengröße, transluzent) | Greiner Bio-One GmbH |
| Migrations-Assay | |
| ibidi® 2-Well-Zellkultureinsätze | ibidi® GmbH |
| FACS-Analyse | |
| 5 ml Rundbodenröhrchen | Corning® |

2.8 Geräte

Tab. 11: Überblick über die verwendeten Geräte.

| Geräte | Hersteller |
|-------------------------------------|---------------------------|
| Absorptionsmessung | |
| BD® FACSVia™ | BD® Biosciences |
| Nanodrop™ 2000 | Thermo Scientific™ |
| Victor™ X3 Multilabel-Reader | PerkinElmer® |
| qPCR | |
| StepOne™ Real-Time PCR System | Applied Biosystems® |
| T100™ ThermalCycler | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| ThermoStat® plus | Eppendorf SE |
| Western-Blot | |
| BioRad ChemiDoct™ MP Imaging System | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| Dry bath FB15101 | Thermo Scientific™ |

| Geräte | Hersteller |
|--|--------------------------------|
| Gelelektrophoresekammer | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| Trans-Blot® Turbo™ Transfer System | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| UP 50H Ultraschallprozessor | Hielscher Ultrasonics GmbH |
| PowerPac™ Basic Power Supply | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| Brutschrank | |
| Heracell™ 150i | Thermo Scientific™ |
| WTB CB 150 | Binder GmbH |
| Mikroskop | |
| AxioCam MRc | Carl Zeiss GmbH |
| Axioskop 40 | Carl Zeiss GmbH |
| Axiovert A1 | Carl Zeiss GmbH |
| Inverses Fluoreszenz Mikroskop Axiovert 200 | Carl Zeiss GmbH |
| MBQ 52 ac power supply | Carl Zeiss GmbH |
| Kühlung | |
| Cryo 1 C Freezing Container | Nalgene® |
| Eiswürfelmaschine | Manitowoc® |
| HAT 5786-AC | Hettich Holding GmbH & Co. oHG |
| Kühlgerät | Phillipp Kirsch GmbH |
| Locator™ 4 Plus (Stickstofftank) | Thermo Scientific™ |
| Pipettierung | |
| E3 Multipette | Eppendorf SE |
| Multichannel Pipetten | Eppendorf SE |
| Pipetus® | Hirschmann GmbH & Co. KG |
| Singlechannel Pipetten | Eppendorf SE |
| Waagen | |
| Analysenwaage Extend | Sartorius AG |
| Feinwaage M-prove | Sartorius AG |
| Zentrifugen | |
| Heraeus Megafuge 1.0R | Thermo Scientific™ |
| Heraeus Megafuge 16R | Thermo Scientific™ |
| Typ 5424 | Eppendorf SE |
| Typ 5810 R | Eppendorf SE |
| Sonstiges | |
| DX-90 Autoklav | Systec GmbH |
| Euroflow EF5E | CleanAir by Baker |
| Integra Biosciences™ Vacusafe™ Comfort Absaugsystem | Integra Biosciences AG |
| MBT-Reagenzschüttler, ROCK'N`ROLLER | neoLab® Migge GmbH |
| Neubauer-Zählkammer (0,1 mm, 0,0025 mm ²) | Paul Marienfeld GmbH & Co.KG |
| WNB 45 Wasserbad | Memmert GmbH & Co.KG |
| Vortex Mixer 7-2020 | neoLab® Migge GmbH |

2.9 Software und Datenbanken

Tab. 12: Überblick über die verwendeten Softwares und Datenbanken.

| Software |
|--------------------------------------|
| BD® FACS Suite 1.4 |
| EndNote™ X9 |
| GraphPad Prism® (8. Version) |
| Image Lab Software |
| ImageJ |
| Microsoft® Excel für Mac 16.36 |
| Microsoft® Power Point für Mac 16.36 |
| Microsoft® Word für Mac 16.36 |
| NanoDrop 2000/2000c Software |
| StepOne® Software Applied Biosystems |
| Victor® X3 Workstation Software |
| Zen 3.0 Mikroskopsoftware |

| Datenbanken |
|---|
| ExPASy Zelldatenbank |
| https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov |
| https://scholar.google.de |

3 Methoden

3.1 Übergreifende Arbeiten in der Zellkultur

3.1.1 Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der MSC und UCC erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % im Brutschrank. Die Zellkulturen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch auf Vitalität, Morphologie und Wachstum geprüft.

3.1.2 Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde die Methode der Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer angewandt. Hierfür wurden 10 µl einer Lösung bestehend aus 5 µl Trypanblau sowie 5 µl der Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und die vier Großquadrate lichtmikroskopisch ausgezählt. Dabei wurden ausschließlich ungefärbte Zellen berücksichtigt, da der Trypanblau-Farbstoff bei vitalen Zellen nicht membrangängig ist. Mit Hilfe der folgenden Rechnung wurde die Zellkonzentration ermittelt:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{4} \times 2 \text{ VF} \times 10^4 \text{ KF}$$

VF = Verdünnungsfaktor, KF = Kammerfaktor

3.1.3 Passagieren der Zellkulturen

Zur Passage einer adhärennten Zellkultur wurden das Medium abgesaugt und die Zellen von der Plastikoberfläche enzymatisch mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,05/0,02 %) bei 37 °C abgelöst. Durch die Zugabe von Nährmedium wurde der Prozess beendet. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml-Röhrchen pelletiert (300 g, 5 min, RT) und in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt, entsprechend dem gewünschten Volumen verdünnt und ausgesät.

3.1.4 Kryokonservierung und Reaktivierung

Im Zuge der Kryokonservierung wurden die Zellen abgelöst und in Zellkulturmedium aufgenommen. Nach einer Zellzählung und der anschließenden Zentrifugation der Suspension (300 g, 5 min, RT), wurden die weiteren Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wurde mit eiskaltem DMSO-Einfriermedium (10 %) in einer Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen/ml verdünnt und auf 1,5 ml-Kryoröhrchen verteilt. Die langfristige

Lagerung erfolgte im Stickstofftank. Zur Rekultivierung wurde die angetaute Zellsuspension in einem 50 ml-Röhrchen nach der Auffüllung mit Nährmedium zentrifugiert (300 g, 5 min, RT). Der Überstand wurde ab- und das Pellet in 1 ml frischem Medium aufgenommen. Danach wurden die Zellen in eine 75 cm²-Zellkulturflasche gegeben, die bereits 19 ml vorgelegtes Zellkulturmedium enthielt.

3.2 Kultivierung humaner Mesenchymaler Stammzellen

3.2.1 Isolierung der MSC aus Fettgewebe

Die Isolierung der MSC erfolgte aus subkutanem univakuolärem Fettgewebe, das aus steril entnommenen humanen Bauchdeckenpräparaten gewonnen wurde. Das Fettgewebe wurde mit einem Skalpell von Haut und Bindegewebe befreit und zerkleinert. Danach wurde das präparierte Gewebe im Verhältnis 1:1 mit Kollagenase-Lösung (0,2 %) vermischt und für 1 h bei 37 °C auf einem Rollentaumler inkubiert. Es folgte die Filtration der Suspension durch ein steriles Nylonzellsieb (Maschenweite 250 µm). Die filtrierte Gewebesuspension wurde zentrifugiert (300 g, 10 min, RT). Durch die Zentrifugation teilten sich die Bestandteile der Suspension in drei Phasen unterschiedlicher Dichte auf: eine obere ölige Phase, eine mittlere Phase mit Fettgewebe und Serum sowie ein im Konus befindliches Zellpellet, welches die stromale vaskuläre Fraktion enthielt. Nach Abnahme der oberen Phasen erfolgte ein erster Waschschrift des Zellpellets mit 30 ml PBS und der anschließenden Zentrifugation (300 g, 10 min, RT). Zur weiteren Aufreinigung wurde das Pellet zur Durchführung einer hypotonen Erythrozytenlyse in 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer (pH 7,4) aufgenommen und nach kurzer Resuspension zentrifugiert (300 g, 5 min, RT). Danach wurden der Überstand verworfen und das Zellpellet wiederholt in PBS gewaschen. Um die Zellen abschließend in Kultur zu nehmen, wurde das Pellet mit 20 ml Nährmedium in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Hiernach konnten die MSC für weitere Versuche verwendet werden.

3.2.2 Nährmedium und Kultivierung

Für die Kultivierung der MSC wurde DMEM mit 4,5 g/L D-Glucose und L-Glutamin, 10 % FCS und Pen/Strep (10 000 U/ml/10 000 µg/ml) als Nährmedium verwendet. Die Kultivierung der MSC erfolgte in Abhängigkeit von der jeweiligen Kulturpassage (P). Die individuellen Kulturbedingungen von P0 bis P8 sind in

Tab. 13 aufgeführt. MSC-Kulturen in P0 und P1 wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit einer Zellzahl von mindestens $3,75 \times 10^5$ ausgesät und bei einer mikroskopischen Konfluenz von 80 - 90 % passagiert. Mit dem Übertritt der Kulturen in P2 erfolgte die Überführung in eine 175 cm²-Zellkulturflasche mit einer Zellzahl von mindestens 5×10^5 .

MSC-Kulturen in P3 bis P8 wurden zur Gewinnung von KM genutzt und daher unter gesonderten Bedingungen kultiviert.

Tab. 13: Passage-abhängige Kulturbedingungen der MSC.

| | P0-P1 | P2 | P3-P8 |
|--------------------------|---|-----------------------|------------------------------|
| Zellkulturflasche | 75 cm ² | 175 cm ² | 175 cm ² |
| Zellzahl/Flasche | ≥ 3,75 x 10 ⁵ | ≥ 5 x 10 ⁵ | 9 x 10 ⁵ |
| Mediumwechsel | 72 - 96 h, nach Isolierung Wechsel nach 24 h | | KM-Abnahme nach 72 bzw. 96 h |
| Passagieren | 80 - 90 % Konfluenz | | Nach jeder KM-Abnahme |

3.2.3 Herstellung des konditionierten Mediums

Um eine homogene Konditionierung des Nährmediums durch die MSC unterschiedlicher biologischer Spender zu erzielen, erfolgten die Kultivierung der Zellen und die Gewinnung des KM unter standardisierten Bedingungen. Der Herstellungsprozess wird in Abb. 6 veranschaulicht. Für die Gewinnung von KM wurden ausschließlich MSC in P3 bis P8 verwendet. Hierfür wurden die MSC zu Beginn der jeweiligen Passage mit einer etablierten Zellzahl von 9×10^5 Zellen und einem Aussaatvolumen von 35 ml Nährmedium in eine 175 cm²-Zellkulturflasche gegeben. Danach wurden die Zellkulturen für 72 h oder 96 h inkubiert. Während die mikroskopische Konfluenz des Zellrasens bei Kulturansatz ungefähr 35 - 45 % betrug, erreichte sie bis zum Zeitpunkt der KM-Abnahme eine Dichte von 85 - 90 %. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das mit löslichen Faktoren angereicherte Nährmedium aus den MSC-Kulturen entnommen und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Die Spenderinformationen, Inkubationsdauer und Kulturpassage wurden vermerkt. Das auf diesem Weg gewonnene native KM wurde bis zur weiteren Prozessierung bei -80 °C gelagert.

Vor der Verwendung des KM in den Versuchsansätzen erfolgten zunächst zwei weitere Verarbeitungsschritte. Um potenzielle Schwankungen durch Inter-Spender-Variabilität und unterschiedliche Kulturpassagen zu minimieren, wurde ein „Pool“ aus verschiedenen Medien erstellt. Hierfür wurde das KM von 6 individuellen biologischen Spendern (S1 - S6) aus dem Gesamtpool aller Spender (n = 25) ausgewählt, wobei jede Kulturpassage (P3 - P8) jeweils einmal vertreten war. Ergänzend wurde auf ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Proben mit einer 72- und einer 96-stündigen Inkubationszeit geachtet. Das anhand dieser Kriterien ausgewählte native KM der verschiedenen Spender wurde danach im Rahmen des zweiten Verarbeitungsschrittes, der Sterilfiltration, zu einem Gesamtpool konfundiert. Für die Filtration wurden die ausgewählten KM-Proben im Wasserbad erwärmt und auf die Membran einer Vakuumfiltrationseinheit (Porengröße 0,2 µm) überführt. Das prozessierte

KM wurde in 500 µl, 5 ml, 12 ml und 20 ml aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquots bei -80 °C gelagert.

Für die verschiedenen Versuchsansätze der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich KM verwendet, welches gemäß der beschriebenen Vorgehensweise prozessiert wurde. Über die Analyse unterschiedlicher KM-Gesamtpools wurden biologische Replikate generiert, deren individuelle Anzahl für jeden Versuch mit „n“ angegeben wird.

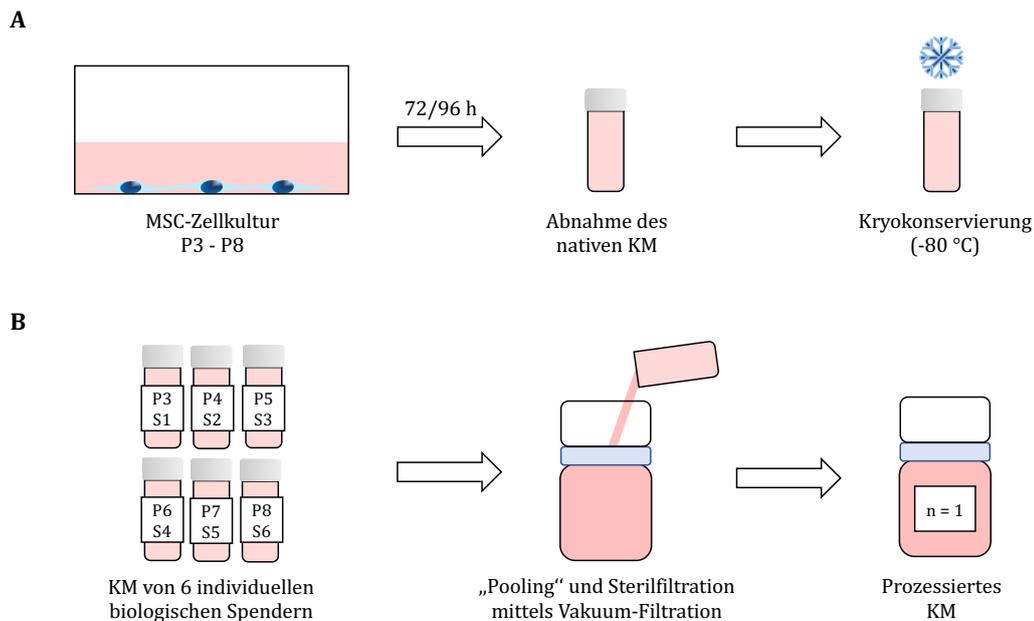


Abb. 6: Darstellung der schrittweisen Herstellung von KM. **A** Gewinnung: MSC-Kulturen in P3 bis P8 wurden für 72 h bzw. 96 h inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde das Nährmedium aus den Kulturen entnommen und vorübergehend kryokonserviert. **B** Prozessierung: Native KM-Proben von 6 individuellen biologischen Spendern (S1 - S6) und 6 unterschiedlichen Passagen (P3 - P8) wurden auf die Membran einer Filtrationseinheit aufgebracht und steril filtriert. Dadurch wurde ein individueller KM-Gesamtpool (n = 1) hergestellt, der für die Versuchsansätze verwendet werden konnte. S = Spender, P = Kulturpassage, n = Anzahl der KM-Gesamtpools/biologischen Replikate

3.3 Kultivierung humaner Urothelkarzinom-Zelllinien

3.3.1 Nährmedien und Kultivierung der UCC

Für die Kultivierung der UCC in 75 cm²-Zellkulturflaschen wurde ein Gesamtvolumen von 20 ml DMEM mit 4,5 g/L D-Glucose, 10 % FCS, Pen/Strep (10 000 U/ml/10 000 µg/ml) und GlutaMAX™-Supplement als Zellkulturmedium außerhalb der Versuchsansätze verwendet. Die Kulturen wurden alle 72 h bis 96 h passagiert. Das im Nährmedium enthaltene GlutaMAX™-Supplement verbessert die Zellviabilität der Zellen einer Kultur, da das enthaltene Dipeptid aus L-Alanin und L-Glutamin zur zusätzlichen Energiegewinnung genutzt werden kann und der Anfall toxischer Ammoniak-Zerfallsprodukte reduziert wird. Aus diesem Grund wird das Supplement häufig zur Kultivierung von Tumorzellen genutzt. Da das aus den MSC-Primärkulturen gewonnene KM standardgemäß kein

GlutaMAX™-Supplement enthielt, wurde im Rahmen aller Versuchsansätze für die UCC-Kontrollgruppen ausschließlich GlutaMAX™-freies Nährmedium verwendet. Das Medium der Kontrollgruppen ohne GlutaMAX™-Supplement wird im Folgenden mit „DMEM“ abgekürzt.

3.3.2 Aussäen der UCC im Well-Format

Für die Versuchsdurchführung wurden die UCC abgelöst und gemäß dem in Tab. 14 aufgeführten Schema auf Well-Platten unterschiedlicher Fläche ausgesät.

Tab. 14: Aussaat der UCC im Well-Format. Bei einer ähnlichen Verdopplungszeit erfolgte die Aussaat von VMCUB-1 und UMUC-3 nach identischem Schema. Die Zellzahlen pro Well von BFTC-905 weichen hiervon ab, da diese Zelllinie eine deutlich geringere Proliferationsgeschwindigkeit aufweist und zusätzlich empfindlich gegenüber intensiver Verdünnung ist.

| | Format | Zellzahl/Well | Aussaatvolumen |
|-----------------|---------|---------------|----------------|
| VMCUB-1, UMUC-3 | 6-Well | 24 000 | 3 ml |
| | 96-Well | 1 500 | 200 µl |
| BFTC-905 | 6-Well | 100 000 | 3 ml |
| | 96-Well | 2 500 | 200 µl |

3.4 Herstellung von Cisplatin-Lösungen

3.4.1 Berechnung von Cisplatin-Konzentrationen

Mit Hilfe der folgenden Rechnung wurden unterschiedlich konzentrierte Cisplatin-Lösungen, ausgehend von einer Ursprungslösung mit einer Konzentration von 1 mg Cisplatin pro ml, hergestellt:

$$VF = \frac{\text{Konzentration in } \mu\text{M UL}}{\text{Gewünschte Konzentration in } \mu\text{M}} \Rightarrow \text{Benötigte UL-Menge in } \mu\text{l} = \frac{AV \text{ in } \mu\text{l}}{VF}$$

VF = Verdünnungsfaktor, UL = Ursprungslösung, AV = Ansatzvolumen

3.5 Zellviabilitäts-Analysen

3.5.1 CellTiter®-Blue-Assay

Der CellTiter®-Blue-Assay ermöglicht über die Bestimmung der Zellviabilität einen Rückschluss auf die Zellzahl in einer Kultur. Die Methode basiert auf einer Reduktionsreaktion: Vitale Zellen reduzieren das im CellTiter-Blue® Reagenz enthaltende Resazurin zu Resorufin. Die Reaktion geht mit einer Änderung des Absorptionsmaximums einher (Resazurin 605 nm, Resorufin 573 nm). Die Reaktion verläuft in einem proportionalen Zusammenhang zur Anzahl der vitalen Zellen in der Kultur. Folglich gilt: Je höher die Zellviabilität einer Zellkultur ist, desto mehr Resazurin kann reduziert werden und desto stärker ist das messbare Signal durch das Produkt Resorufin.

Für die Durchführung des CellTiter®-Blue-Assays wurden die UCC 72 h bzw. 96 h vor Versuchsbeginn auf 96-Well-Platten ausgesät. Am Versuchstag wurde das CellTiter®-Blue-Reagenz im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und im Verhältnis 1:10 mit DMEM verdünnt. Nach der Abnahme des Mediums von den UCC-Platten wurden in jedes Well 200 µl der verdünnten CellTiter®-Blue-Lösung pipettiert. Die Platten wurden für exakt 2 h unter konstanten Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre in Dunkelheit inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden aus jedem Well 100 µl des Überstandes auf eine frische Mikrotiterplatte transferiert. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 573 nm wurde mit Hilfe eines Multiplatten-Spektralphotometers (Victor X3) gemessen. Zur späteren Normierung wurde ein Blank mitgeführt.

3.5.2 Untersuchung der Proliferation

Die Proliferation der UCC wurde in zwei verschiedenen Versuchskonzepten untersucht. Das erste Konzept beinhaltete einen Vergleich der Zellviabilität zwischen einer DMEM-Kontrolle und UCC, die in KM inkubiert wurden. Hierfür wurden die Zellen auf 96-Well-Platten in einem Volumen von 200 µl des entsprechenden Mediums ausgesät und für 72 h inkubiert. Danach wurde die Viabilität der UCC via CellTiter®-Blue-Assay ermittelt. Die Proben wurden in technischen Quadruplikaten bestimmt, deren Einzelwerte im Zuge der Auswertung gemittelt und auf den Blank normiert wurden. Insgesamt wurde so für jede UCC der Einfluss von 9 KM-Gesamtpools (n = 9) auf die Proliferation untersucht.

Im zweiten Versuchskonzept wurden die beschriebenen Abläufe modifiziert, indem zusätzlich 3 % FCS pro Well in das KM pipettiert wurde. Hierdurch sollte exploriert werden, ob die Nährstoffe im KM zu verbraucht waren und die Proliferation der UCC dadurch negativ beeinflusst wurde. Insgesamt wurden dafür 2 KM-Gesamtpools (n = 2) getestet.

3.5.3 Evaluation der Resistenzvermittlung durch KM

Mit dem folgenden Versuchsaufbau wurde der kurzfristige Effekt des KM auf die Cisplatin-Sensitivität der UCC untersucht. Zuerst wurden die Zellen in 300 µl Medium pro Vertiefung auf 96-Well-Platten ausgesät. Wie üblich wurden dabei zwei Gruppen unterschieden, zum einen eine DMEM-Kontrolle und zum anderen UCC in KM. Im Anschluss wurden die UCC-Platten für 24 h im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium mit aufsteigenden Cisplatin-Konzentrationen zwischen 0,4-16 µM versetzt. Für jede Gruppe wurden UCC ohne Cisplatin-Zusatz als Proliferationskontrolle mitgeführt. Die Inkubation wurde zunächst für 72 h fortgesetzt, um anschließend die Viabilität beider Gruppen für jede Cisplatin-Konzentration mittels CellTiter®-Blue-Assay zu messen. Analysiert wurden technische Triplikate, deren Mittelwerte auf den Blank und die Proliferationskontrolle der jeweiligen Gruppe normiert wurden. Die Resistenzuntersuchung wurde für jede UCC mit 9 KM-Gesamtpools (n = 9) wiederholt.

3.6 Funktionelle Versuche

3.6.1 Migrations-Assay

Die Migrationskapazität von Zellen kann mit Hilfe des Wundheilungs-Assays untersucht werden. Für diesen wurden spezielle Silikon-Zellkultureinsätze der Firma ibidi® verwendet, die eine kontrollierte Dokumentation und Evaluation der Motilität von Zellen erlauben. Die Einsätze bestehen aus zwei Kammern, die durch einen Mittelsteg voneinander getrennt werden. Mit der Unterseite haften sie auf der Oberfläche von Zellkulturgefäßen. Werden die beiden Kammern des Einsatzes mit Zellen belegt, bilden sich zwei isolierte einschichtige Zellrasen. Da im Bereich des Mittelstegs keine Zellen adhären können, wird nach Abnahme der Einsätze ein zellfreier Spalt mit einer Breite von 500 µm sichtbar. Die Migration der Zellen in den zellfreien Bereich kann mikroskopisch dokumentiert werden. Das grundlegende Prinzip des Migrations-Assays wird in Abb. 7 visualisiert.

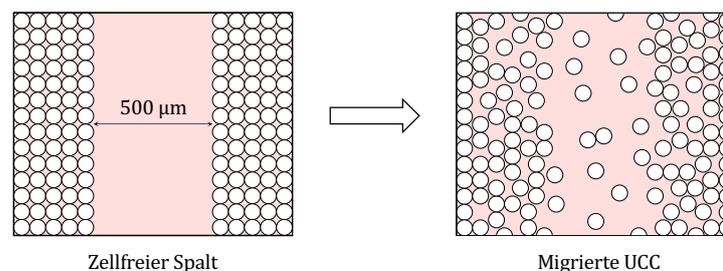


Abb. 7: Schematische Darstellung des Migrations-Assays. Nach der Abnahme der Zellkultureinsätze wurde die Migration der UCC in den zellfreien Spalt mikroskopisch dokumentiert.

Zur Durchführung des Migrations-Assays wurde eine 12-Well-Platte mit sterilen ibidi®-Einsätzen bestückt. Die Zellaussaat in die Kammern der Einsätze erfolgte gemäß dem Aussaat-Schema in

Tab. 15. Die UCC-Platten wurden für 20 h im Inkubator deponiert. Danach wurden die Einsätze abgenommen und die Wells mit den UCC mit 1,5 ml KM bzw. DMEM geflutet. Um den Einfluss von Cisplatin auf die migratorische Kapazität der UCC zu analysieren, wurden bei einer Auswahl der Wells zusätzlich 3 µM Cisplatin hinzugefügt. Nach der Entfernung der Einsätze erfolgte die Fotodokumentation der UCC in 10x Vergrößerung mit Hilfe eines inversen Mikroskops. Die zellfreie Gasse eines Einsatzes wurde hierfür an zwei Stellen fotografiert. Die Dokumentation wurde nach 4 h, 8 h, 10 h und im Falle der BFTC-905-Zellen nach 12 h wiederholt. Zwischenzeitlich wurden die UCC-Platten inkubiert.

Im Zuge der Auswertung wurden alle Einzelaufnahmen eines Bereiches einander zugeordnet und mit Hilfe des Freehand Selection Tools im Bildbearbeitungsprogramm ImageJ ausgewertet. Mit Hilfe des Tools wurde die Fläche ermittelt, die im jeweiligen Zeitraum, ausgehend vom Zustand nach Abnahme der Einsätze, mit migrierten Zellen besetzt wurde. Da jeder Einsatz an zwei Stellen fotografiert wurde, wurden diese Messdaten gemittelt. Insgesamt wurden für jede UCC 9 KM-Gesamtpools untersucht (n = 9).

Tab. 15: Aussaat der UCC im Migrations-Assay.

| | Zellzahl/Kammer | Aussaatvolumen |
|-----------------|-----------------|----------------|
| VMCUB-1 | 23 000 | 75 µl |
| UMUC-3 | 24 000 | 75 µl |
| BFTC-905 | 40 000 | 75 µl |

3.6.2 Invasions-Assay

3.6.2.1 Zellaussaat

Die Fähigkeit von Zellen, die ECM eines Gewebes zu infiltrieren, kann mit Hilfe des Invasions-Assays untersucht werden. Das Funktionsprinzip dieser Methode basiert auf speziellen Einsätzen, die in die Wells einer Zellkulturplatte eingehangen werden und deren Boden mit einem ECM-Äquivalent beschichtet wird. In den Innenraum des Einsatzes werden die zu untersuchenden Zellen ausgesät. Sofern sie über ein invasives Potential verfügen, gelangen sie durch die ECM-Schicht hindurch auf die Außenseite der Bodenmembran und können dort fixiert, angefärbt und gezählt werden. Das invasive Potential kann in Abhängigkeit vom eingesetzten Lockmedium im Well-Boden beeinflusst werden. Das Funktionsprinzip des Invasions-Assays wird in Abb. 8 verdeutlicht.

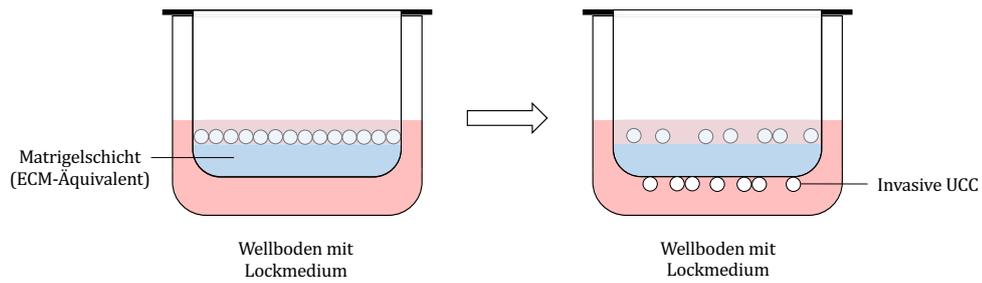


Abb. 8: Schematische Darstellung des Invasions-Assays. A Die UCC werden in ein Medium mit reduziertem Nährstoffgehalt in die Kammer des Well-Einsatzes ausgesät, dessen Bodenmembran mit 40 μ l Matrigel beschichtet ist. Nach Abschluss der Inkubationszeit erfolgt die Fixierung und Färbung der invasiven Zellen, die durch das Matrigel gewandert und an der Unterseite der Bodenmembran adhärenzhaft sind.

Um die invasive Kapazität der UCC zu bestimmen, wurden 24-Transwell-Einsätze (Porengröße 8 μ m) in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte eingehangen. Auf den Boden jeder Kammer wurden 20 μ l der eiskalten Matrigel-Gebrauchslösung (2,7 %) aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Die Einsätze wurden für 20 min bei 37 °C inkubiert. Der Beschichtungsschritt wurde mit weiteren 20 μ l der Matrigel-Gebrauchslösung wiederholt und die Inkubation für 60 min fortgesetzt. In der Zwischenzeit wurden die UCC abgelöst und die gewünschte Zellkonzentration entsprechend dem in Tab. 16 aufgeführten Aussatschema in Opti-MEM® Reduced-Serum Medium eingestellt. Dieses Medium weist einen reduzierten Nährstoffgehalt auf, wodurch ein Konzentrationsgefälle vom Inneren der Kammer zum Lockmedium im Wellboden entsteht. Nach Abschluss der Beschichtung erfolgte die Aussaat der UCC in die beschichteten Kammern und die Zugabe von 500 μ l KM bzw. DMEM auf den Wellboden. Die UCC-Platten wurden im Brutschrank deponiert.

Tab. 16: Aussaat der UCC im Invasions-Assay.

| | Zellzahl/Kammer | Inkubationszeit | Aussaatvolumen |
|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| VMCUB-1 | 30 000 | 20 h | 100 μ l |
| UMUC-3 | 30 000 | 20 h | 100 μ l |
| BFTC-905 | 50 000 | 24 h | 100 μ l |

3.6.2.2 Kristallviolett-färbung

Die invasiven Zellen auf der Unterseite der Bodenmembran wurden mit einer Kristallviolett-färbung visualisiert. Zur Entfernung nicht invasiver Zellen und Matrigelrückstände wurde die Innenseite der Kammern mit einem Wattestäbchen gereinigt. Die Reinigung wurde nach jedem Färbeschritt wiederholt. Die Kammern wurden in 4 °C kaltem PBS gewaschen und für 10 min in eiskaltem Methanol fixiert. Anschließend wurden sie für 25 min in 1 ml Kristallviolett-Fertiglösung (1 %) bei RT in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden Farbrückstände durch Waschen der Kammern in Leitungswasser

entfernt und diese für 20 min getrocknet. Mit Hilfe eines Einmalskalpells wurde die Bodenmembran aus den Kammern herausgetrennt und in Xylol getränkt. Es folgte die Positionierung der Membran auf dem Objektträger. Zur Einbettung wurde die Membran mit DePeX und einem Deckglas bedeckt. Jede Membran wurde während der Auswertung in repräsentativen Triplikaten in 10x Vergrößerung mit dem Auflichtmikroskop fotografiert. Die mit invasiven Zellen besetzte Fläche wurde mit dem Programm ImageJ berechnet. Die Einzelwerte eines Triplikats wurden gemittelt. Insgesamt wurden im Invasions-Assay für jede UCC 9 KM-Gesamtpools als Lockmedium eingesetzt und analysiert (n = 9).

3.7 Vorkonditionierung der UCC

3.7.1 Behandlungsschema

Die bisher beschriebenen Proliferations- und Resistenzuntersuchungen sowie die funktionellen Analysen der migratorischen und invasiven Kapazität (Abschnitte 3.5 und 3.6) fokussierten gezielt den kurzfristigen Einfluss des KM auf die UCC. In den genannten Versuchsansätzen waren innerhalb kürzester Zeit nach dem Kontakt der Tumorzellen mit dem KM deutliche Effekte erkennbar. Daher wurde auf eine ausgedehnte Vorbehandlung verzichtet. Im Gegensatz hierzu sollte in allen weiteren Versuchen auch der Einfluss einer längerfristigen Inkubation der UCC mit KM untersucht werden. Insbesondere für Analysen der Gen- und Proteinexpression sollte dadurch sichergestellt werden, dass das KM in ausreichendem Maße auf die Tumorzellen einwirken konnte. Daher wurde jedem der folgenden Versuchsansätze (Abschnitte 3.8 bis 3.13) eine sechstägige Vorkonditionierung vorangestellt, die entsprechend dem Ablauf in

Tab. 17 durchgeführt wurde. Bei jeder Vorkonditionierung wurden UCC in DMEM als Kontrolle mitgeführt.

Für einige Fragestellungen wurde das beschriebene Schema der Vorkonditionierung erweitert, um auch die längerfristigen Auswirkungen einer zusätzlichen Cisplatin-Behandlung auf die UCC zu analysieren. Nach der Passage am 3. Tag wurden jeweils 3 µM Cisplatin ins Medium der Tumorzellen pipettiert.

Tab. 17: Ablauf der Vorkonditionierungs-Behandlung der UCC mit KM.

| Versuchstag | Durchführung |
|-------------|---|
| Tag 1 | Aussaat der UCC im 6-Well-Format in 3 ml KM/DMEM pro Well |
| Tag 1-3 | Inkubation im Brutschrank |
| Tag 3 | Passagieren der Zellen, ggf. Zusatz von 3 µM Cisplatin pro Well |
| Tag 3-6 | Inkubation im Brutschrank |
| Tag 6 | Ansatz des Folgeversuchs (Abschnitte 3.8 bis 3.13) |

3.8 Zellmorphologische Analysen

3.8.1 Phänotyp-Bestimmung

Zur Analyse der Zellmorphologie wurden die UCC entsprechend dem Schema zur Vorkonditionierung ohne Cisplatin-Zusatz behandelt. Zur Dokumentation der zellulären Morphologie wurden die UCC nach Behandlungsende mit einem inversen Mikroskop unter Einsatz einer AxioCam in 10x Vergrößerung fotografiert. Im Zuge der Auswertung wurden repräsentative Aufnahmen der UCC in KM bzw. DMEM ausgewählt und zu Darstellungszwecken optimiert.

3.9 Molekularbiologische Analysen

3.9.1 RNA-Extraktion

Die Isolierung der RNA erfolgte aus vorkonditionierten UCC mit und ohne Cisplatin-Zusatz unter Verwendung des RNeasy Mini Kits® von Qiagen gemäß den Herstellerangaben. Die Zellyse wurde durch die Zugabe von 350 µl RLT-Puffer mit β-ME (1 %) durchgeführt. Zur Elution der RNA wurden 60 µl RNase-freies Wasser eingesetzt. Die Proben konnten bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

3.9.2 DNase-Verdau

Für den Desoxyribonuklease (DNase)-Verdau wurde das RNase free DNase Set® von Qiagen genutzt. Das Set ermöglicht es DNA-Kontamination zu eliminieren und optimiert dadurch die Voraussetzungen für spätere Genexpressions-Analysen mittels qRT-PCR (engl. quantitative reverse transcription Real-Time polymerase chain reaction). Die Durchführung des DNase-Verdaus erfolgte nach Angaben des Herstellers. Als Inkubationszeit im Thermoblock wurde ein Zeitraum von 30 min gewählt.

3.9.3 RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle

Für die Reverse Transkription der RNA in cDNA (engl. complementary DNA) wurden ausschließlich Proben verwendet, deren $A_{260/280}$ -Ratio zwischen 1,9 und 2,1 lag. Die Bestimmung der RNA-Konzentration und des Reinheitsgrades erfolgte mit Hilfe des NanoDrop™ 2000 Spektralphotometers. Bezogen auf das Gesamtreaktionsvolumen der Reversen Transkription von 20 µl, wurde 1 µg RNA eingesetzt.

3.9.4 Reverse Transkription und cDNA-Verdünnung

Für die Reverse Transkription der RNA in cDNA wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit® von Qiagen genutzt. Dabei wurden die Angaben im

Herstellerprotokoll befolgt. Zur Durchführung der qRT-PCR-Analysen wurden die cDNA-Proben im Verhältnis 1:20 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 ° gelagert.

3.9.5 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Für die qRT-PCR-Analysen wurde auf das StepOne™ Real-Time PCR System (48-Well) unter Einsatz des PowerUp™ SYBR® Green Master Mix zurückgegriffen. Die Polymerase-Kettenreaktion dient der in-vitro-Amplifikation eines Genprodukts: Eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert an gebundene Oligonukleotidprimer einen komplementären DNA-Strang anhand eines Matrizenstrangs. Die Reaktion wird nach der Aktivierung eines Fluorochroms als Fluoreszenzsignal messbar. Die Intensität des Signals steigt proportional zur Anzahl der amplifizierten Produkte. Der eingesetzte PowerUp™ Mastermix enthält neben dem Fluorochrom SYBR® Green eine hitzestabile Taq-Polymerase, die über einen Dual-Lock™-Mechanismus verfügt. Dieser verhindert eine unerwünschte Aktivierung des Enzyms bei niedrigen Temperaturen und somit unspezifische Amplifikationen.

Das Pipettieren der PCR-Mikrotiterplatten erfolgte auf Eis und unter aseptischen Bedingungen. Vor der Herstellung des qRT-PCR-Mastermix wurden die unverdünnten Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotidprimer (engl. primer forward, primer reverse) im Verhältnis 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Der Mastermix wurde aus 0,5 µl Primer Forward (10 pmol/µl), 0,5 µl Primer Reverse (10 pmol/µl) und 10 µl PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (2X) erstellt. Vervollständigt wurde die Mischung mit 7 µl RNase-freiem Wasser. Jedes mit einer Probe versehene Well der Mikrotiterplatte wurde mit 2 µl der verdünnten cDNA-Probe (1:20) befüllt. Die cDNA wurde im Anschluss um 18 µl qRT-PCR-Mastermix ergänzt.

3.9.5.1 Erstellung einer Standardreihe

Um die Amplifikation einer qRT-PCR-Analyse relativ zu quantifizieren, wurde für jedes Oligonukleotidprimer-Paar eine Standardreihe (SDR) miterfasst. Zur Herstellung der SDR wurde die cDNA des Standards im Verhältnis 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurde die cDNA-Konzentration mit dem NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer bestimmt. Basierend auf der 1:10 Verdünnung, wurden zwei weitere Verdünnungsstufen im Verhältnis 1:100 und 1:1000 erstellt. Die Verdünnungen der SDR wurden im Rahmen der qRT-PCR-Analysen in Triplikaten bestimmt.

3.9.5.2 Amplifikationsmodus

Für die Amplifikation mit dem StepOne™ Real-Time PCR System wurde der Fast cycling mode gewählt. Die einzelnen Schritte dieses Amplifikationsmodus richten sich nach den Herstellerangaben für den PowerUp™ SYBR® Green Master Mix. Die Annealing-Temperatur (AT) wurde anhand der verwendeten Oligonukleotidprimer gewählt. Zur Kontrolle der Homogenität der Amplifikate wurde eine Schmelzkurvenanalyse ergänzt. Die einzelnen Schritte des Amplifikationsmodus werden in Tab. 18 aufgeführt.

Tab. 18: Phasen des Fast cycling mode. Für jede Phase des Amplifikationsmodus ist neben der Einstellung für die Temperatur (T), die zeitliche Dauer (D) und den Zyklus (Z) eine kurze Erläuterung der funktionellen Bedeutung im Rahmen der qRT-PCR-Analyse aufgeführt.

| Phase | T | D | Z | Funktion |
|---------------------------------------|----------------------------------|---------------------------|---|---|
| UDG ¹ -Aktivierung | 50 °C | 2 min | Hold ² | UDG ist ein Enzym, das Kontaminationsvarianten im Reaktionsgemisch degradiert. |
| Dual-Lock™ DNA-Polymerase Aktivierung | 95 °C | 2 min | Hold ² | Die DNA-Polymerase synthetisiert an Primer-DNA-Hybride einen zum Matrizenstrang komplementären Tochterstrang. |
| Denaturierung Anlagerung | 95 °C AT ³ | 15 sec 1 min | 40 | In 40 Zyklen erfolgt die Amplifikation des Genprodukts und die kontinuierliche Detektion der Intensität des Fluoreszenzsignals. |
| Schmelzkurve | 95 °C 60 °C 95 °C 95 °C | 15 sec 1 min 15 sec | Hold ² Hold ² Cont ⁴ | Die Analyse der Schmelzkurve dient der Identifizierung unterschiedlicher Amplifikate im Reaktionsgemisch. |

¹UDG = Uracil-DNA-Glykosylase, ²Hold = Konstante Haltung eines Temperaturniveaus, ³AT = Annealing temperature, ⁴Cont = Kontinuierlicher Anstieg der Temperatur zwischen zwei Temperaturniveaus mit einer Steigung von 20 %

3.9.5.3 Maßnahmen zur Qualitätskontrolle

Um potenzielle Kontaminationen der qRT-PCR-Proben zu detektieren, wurde eine Negativprobe ohne Zugabe von cDNA mitgeführt. Die Bestimmung der cDNA-Proben erfolgte in Triplikaten, deren Einzelwerte im Zuge der Auswertung gemittelt wurden.

3.10 Western Blot-Analysen

3.10.1 Präparation von Proteinlysaten

Für die Proteinexpressions-Analysen mittels Western Blot (WB) wurden vorkonditionierte UCC ohne Cisplatin-Zusatz verwendet. Zu Beginn wurden die abgelösten Zellen pelletiert (300 g, 5 min). Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Das Zellpellet wurde in 30 µl eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert. Zum mechanischen Zellaufschluss wurde das Zelllysate mit der Sonicatorsonde eines Ultraschallprozessors durch 10 Impulse

homogenisiert (80 % Amplitude, Cycle 0,5 s). Im Anschluss wurde das sonifizierte Lysat zentrifugiert (15 000 g, 5 min, 4 °C), so dass mit Hilfe des proteinhaltigen Überstandes die Proteinbestimmung durchgeführt werden konnte.

3.10.2 Proteinbestimmung

Die Proteinmenge des präparierten Proteinlysats wurde kolorimetrisch mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits bestimmt. Die relative Quantifizierung der Proteinmenge einer Probe wurde mit einer SDR mit bekannter Proteinkonzentration realisiert. Dazu wurde das BCA Working Reagent gemäß Herstellerangaben angesetzt und das Proteinlysate im Verhältnis 1:6 mit PBS verdünnt. Eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurde mit 10 µl der einzelnen Verdünnungsstufen des Standards und 10 µl des verdünnten Lysats belegt. Die Bestimmung erfolgte in Duplikaten. Anschließend wurden jeweils 200 µl BCA Working Reagent auf jede Probe pipettiert und die Platte für 30 min im Brutschrank inkubiert. Mit einem Multiplatten-Spektralphotometer wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Im Zuge der Auswertung wurde mit den Messwerten der SDR eine Regressionsgerade (R^2 0,95-1) erstellt und die Proteinkonzentration der Proben relativ quantifiziert.

3.10.3 Western Blot-Analyse

Zur Durchführung der WB-Analysen wurde die gewünschte Menge des Proteinlysats mit 4 µl Laemmli-Puffer mit β-ME (20 %) und Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 14 µl aufgefüllt. Die Proben wurden zentrifugiert (13 800 g, 2 min) und danach für 5 min bei 95 °C in einer Heizplatte inkubiert. Die in der WB-Analyse eingesetzte proteinspezifische Antikörperverdünnung, Proteinmenge und Gel-Konfiguration ist in Tab. 19 aufgelistet. Die Katalognummern der verwendeten Antikörper werden in Tab. 9 aufgeführt.

Tab. 19: Primärantikörper und proteinspezifische Einstellungen der WB-Analysen.

| Antikörper | Verdünnung | Proteinmenge | Gel |
|------------|------------|--------------|----------|
| CXCR4 | 1:1000 | 20 µg | 7,5 % |
| E-Cadherin | 1:1000 | 20 µg | 7,5 % |
| SMAD4 | 1:2000 | 10 µg | 4 - 15 % |
| Vimentin | 1:1000 | 20 µg | 4 - 15 % |
| α-SMA | 1:4000 | 10 µg | 4 - 15 % |

Zu Beginn wurde die Gelelektrophoresekammer mit dem Gel beladen und mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Kämme wurden entfernt und jede Geltasche mit 12 µl einer einzelnen Probe geladen. Zur späteren Identifizierung der Proteinbanden wurden 5 µl des Markers aus dem ROTI®Mark WESTERN-Set der Firma Carl Roth® in die erste Tasche des Gels pipettiert.

Nach vollständiger Ladung wurden die Kammer verschlossen und die Proteine elektrophoretisch unter Anlage aufsteigender Spannungen von 80 V bis 200 V aufgetrennt. Zur Durchführung des Transfer-Blots wurden das Gel und die Blotting-Membran für 3 min in Blotting-Puffer äquilibriert und in die Kammer des Novex® Semi-Dry Blotters eingelegt. Der Transfer-Blot erfolgte für 20 min bei 2,5 A und 25 V. Danach wurden der Blot mit TBS gewaschen und 10 ml Blockierlösung auf die Membran gegeben. Diese wurde auf einem Rollentaumler positioniert und für 2 h bei RT inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und 10 ml der nach Herstellerangaben verdünnten Antikörperlösung hinzugefügt. Die Inkubation wurde bei 4 °C auf einem Rollentaumler fortgesetzt. Am Folgetag wurde der Blot dreimal für 5 min in 15 ml TBS-T-Waschpuffer gewaschen. Um indirekt gekoppelte Antikörper zu detektieren, wurden 4 ml der Lösung des Sekundärantikörpers auf den Blot für 1 h in Dunkelheit auf einem Rollentaumler gegeben. Nach der Kopplung des Primärantikörpers erfolgten drei weitere Waschschrte mit TBS-Puffer. Zur Darstellung der Antikörperfärbungen wurde der Blot mit 8 ml ECL-Lösung Pierce™ benetzt, im Einschub der Fotokammer positioniert und fotografisch dokumentiert. Mit Hilfe der Software Image Lab wurde die optische Dichte der spezifischen Proteinbande ermittelt und auf das Totalprotein normiert.

3.11 Immunzytochemie

3.11.1 Fixierung

Mit Hilfe der Immunzytochemie gelingt es durch eine Antikörperfärbung (AF), ausgewählte Proteine von fixierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch darzustellen. Zur Durchführung immunzytochemischer Analysen wurden die UCC zunächst ohne Cisplatin-Zusatz vorkonditioniert. In Abweichung zur beschriebenen Vorgehensweise in Tab. 17, erfolgte die Zellaussaat bei der Passage nach 72 h auf sterile Deckgläschen. Nach Abschluss der Vorkonditionierung wurden die UCC bei einer Konfluenz von 70 - 80 % fixiert. Dazu wurden die Zellen in den Wells mit 2 ml PBS gewaschen und danach für 30 min in 2 ml Roti®-Histofix (4 %) pro Well fixiert. Zwei weitere Waschschrte wurden angeschlossen. Bis zur Durchführung der AF wurden die fixierten Zellen in 3 ml PBS/Well bei 4 °C gelagert.

3.11.2 Antikörperfärbung

Für die AF wurde der Primärantikörper gemäß der in Tab. 20 genannten Verdünnung anhand der Herstellerangaben angesetzt. Nach der Abnahme des PBS aus den Wells wurden 1 ml Antikörper- sowie 1 ml PBSTA-Normal-Goat-Lösung hinzugefügt. Die PBSTA-Lösung enthielt Triton™ X-100, welches die Zellen

permeabilisierte und normales Ziegen Serum zur Blockade der unspezifischen Bindung. Die UCC wurden über Nacht bei 4 °C in der Lösung inkubiert. Am Folgetag wurden die Färbelösung sowie potenzielle Rückstände durch zwei Waschschriffe mit PBS entfernt. Zur Detektion der Primärantikörper wurden die Zellen mit 2 ml der Anti-Rabbit-IgG-Biotin-PBSTA-Lösung für 45 min bei RT inkubiert. Es wurden zwei weitere Waschschriffe mit PBS angeschlossen. Die Lösung enthielt einen Sekundärantikörper, der im nächsten Schritt mit Hilfe eines Fluorochroms visualisiert wurde. Dafür wurde das ausgewählte Fluorochrom in einer Verdünnung von 1:100 in PBS gelöst. Die eingesetzten Fluochrome werden in Tab. 20 aufgelistet. Anschließend wurden 1 ml der Fluorochrom-PBS-Lösung (1 %) pipettiert und die Inkubation der UCC für 30 min bei RT fortgesetzt. Nach einem erneuten Waschschriff wurde die AF um eine 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Färbung ergänzt, indem die Zellen für 15 min in 2 ml DAPI-Lösung (0,1 %) bei RT inkubiert wurden. Die Kernfärbung wurde mit zwei weiteren Waschschriffen vervollständigt und die Zellen mit Fluoromount™ Mounting Medium bedeckt.

Die Auswertung erfolgte durch die Aufnahme fluoreszenzmikroskopischer Bilder mit Hilfe des inversen Fluoreszenzmikroskops unter Einsatz einer Fluoreszenzlampe in 40x Vergrößerung. Im Rahmen der Auswertung wurden die Einzelbilder repräsentativer Bereiche der Antikörper- und DAPI-Färbung übereinander gelagert und zu Darstellungszwecken optimiert.

Tab. 20: Überblick über die eingesetzten Primärantikörper in der Immunzytochemie. Die angegebene Verdünnung bezieht sich auf die Primärantikörper.

| Primärantikörper | Verdünnung | Fluorochrom |
|------------------|------------|------------------------|
| E-Cadherin | 1:50 | Streptavidin Alexa-594 |
| Vimentin | 1:200 | Streptavidin Alexa-488 |

3.12 Enzymimmunoassay

3.12.1 PAI-ELISA

Enzymimmunoassays, kurz ELISA (engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay) genannt, werden zur Detektion und Quantifizierung löslicher Proteine eingesetzt. Zur Analyse von PAI-1 wurde das Human Serpin E1/PAI-1 Quantikine® ELISA Kit der Firma R&D Systems® verwendet. Analysiert wurden KM- bzw. DMEM-Überstände aus UCC-Kulturen, die ohne Cisplatin-Zusatz vorkonditioniert wurden. Dafür wurde das Zellkulturmedium im direkten Anschluss an die Vorkonditionierung in 500 µl aliquotiert und im Verhältnis 1:3 mit dem Reagent Diluent aus dem Kit verdünnt. Die einzelnen Schritte des PAI-ELISA sowie die Herstellung der SDR erfolgten gemäß den Vorgaben des Herstellers.

Im PAI-ELISA wird die Bindung zwischen dem zu analysierenden Antigen und dem Primärantikörper durch das Fluorochrom Streptavidin-HRP (engl. Streptavidin-Horseradish-Peroxidase) detektierbar. Daher wurde im Zuge der Auswertung die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Multiplatten-Spektralphotometer gemessen. Basierend auf den ermittelten Werten des Standards wurde eine Regressionsgerade (R^2 0,95-1) für eine relative Quantifizierung des Antigens in den Proben genutzt. Zusätzlich wurden die Einzelwerte auf eine Negativkontrolle normiert. Die Proben wurden in Duplikaten analysiert, deren Mittelwerte berücksichtigt wurden. Insgesamt wurden für jede UCC 3 KM-Gesamtpools ($n = 3$) im PAI-ELISA untersucht.

3.13 Durchflusszytometrische Analysen

3.13.1 FACS

Die Proteinexpression von CD44, PD-L1, PD-L2 und CXCR-4 wurde mit Hilfe der FACS-Methode (engl. fluorescence-activated cell scanning) bestimmt. Für die Analysen wurden vorkonditionierte UCC (s.

Tab. 17) aus 9 unterschiedlichen KM-Gesamtpools eingesetzt ($n = 9$). Pro untersuchte Probe wurden 20 000 Zellen durchflusszytometrisch analysiert. FACS-Analysen basieren auf einer Antikörperfärbung: Der zu untersuchende Oberflächenmarker wird durch die Bindung eines spezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörpers markiert. Die Vorgehensweise variiert zwischen primär und sekundär gekoppelten Antikörpern. Alle Antikörper wurden vor Verwendung entsprechend den Angaben des Herstellers verdünnt. Für die Auswertung wurde eine Kontrolle aus ungefärbten UCC in DMEM mitgeführt, die während der Auswertung zur Normierung genutzt wurde.

3.13.1.1 Nutzung konjugierter Antikörper (CD44, PD-L1, PD-L2)

Die vorkonditionierten UCC wurden abgelöst und die Zellsuspension pelletiert (300 g, 5 min). Das Zellpellet wurde in frischem Nährmedium resuspendiert und die Suspension in einem FACS-Röhrchen erneut zentrifugiert (300 g, 5 min). Die weiteren Schritte erfolgten im Eisbad. Der Überstand wurde ab- und das Pellet in 50 μ l FCS aufgenommen. Nach der Inkubation der Zellen für 30 min wurde der Antikörper hinzugefügt. Die eingesetzten Mengen der direkt gekoppelten Primärantikörper sind in Tab. 21 einsehbar. Die Inkubation der UCC wurde für 30 min in Dunkelheit fortgesetzt. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 4 ml FACS-Puffer (Zellwash + 3 % FBS), der durch eine weitere Zentrifugation beendet wurde (300 g, 4 °C, 5 min). Für die Analyse wurde das Zellpellet erneut in 200 μ l frischem FACS-Puffer aufgenommen.

Tab. 21: Direkt gekoppelte Antikörper in der FACS-Analyse. Neben dem Primärantikörper sind zusätzlich die verwendete Menge und das konjugierte Fluorochrom dargestellt.

| Antikörper | Menge | Konjugiertes Fluorochrom |
|------------|--------|--------------------------|
| CD44 | 2 µl | APC ¹ |
| PD-L1 | 2.5 µl | FITC ² |
| PD-L2 | 20 µl | R-PE ³ |

¹APC = Allophycocyanin, ²FITC = Fluorescein-Isothiocyanat, ³R-PE = R-Phycoerythrin

3.13.1.2 Nutzung unkonjugierter Antikörper (CXCR-4)

Die Färbung des sekundär gekoppelten Antikörpers CXCR-4 entsprach zunächst der Vorgehensweise für direkt gekoppelte Antikörper (Abschnitt 3.13.1.1), wobei jeweils 2 µl des Primärantikörpers eingesetzt wurden. Nach der 30 min Primärantikörper-Inkubation folgte ein Waschschriff mit nachfolgender Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Zunächst wurde 1 µl des APC-Sekundärantikörpers zu den Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 30 min im Eisbad in Dunkelheit inkubiert. Ein weiterer Waschriff mit FACS-Puffer wurde angeschlossen. Danach wurde das Zellpellet in 200 µl frischem FACS-Puffer aufgenommen und Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

3.14 Statistische Auswertung

Im Zuge der Auswertung wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Software GraphPad Prism® (Version 8) auf statistische Signifikanz geprüft. Für den Vergleich von zwei Gruppen (z. B. UCC in KM und DMEM-Kontrolle) wurde der statistische Hypothesentest (engl. paired student's *t*-Test) verwendet. Der Vergleich von mehr als zwei Gruppen (z. B. UCC in KM ± Cisplatin-Zusatz im Vergleich zur DMEM-Kontrolle ± Cisplatin-Zusatz) erfolgte mit einer zweifachen Varianzanalyse (engl. two way analysis of variance, kurz two way ANOVA). Dargestellt wurde in den jeweiligen Abbildungen der Mittelwert einer Gruppe + Standardabweichung (SD). Als statistisch signifikant wurden Testergebnisse angesehen, die einen p-Wert von $\leq 0,05$ (*) aufwiesen, somit wurde die Wahrscheinlichkeit eines α -Fehlers auf $\leq 5\%$ festgelegt. Weiterhin wurden höher signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert von $\leq 0,01$ (**) und hochsignifikante Ergebnisse mit einem p-Wert von $\leq 0,001$ (***) hervorgehoben. Statistisch nicht signifikante Testergebnisse wurden in der Ergebnisdarstellung sofern sinnvoll gekennzeichnet (ns = nicht signifikant).

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl der UCC

Zur Untersuchung der Fragestellung, inwiefern MSC als Bestandteil des TMM in der Harnblase die Tumorprogression von UC beeinflussen, wurden die drei heterogenen muskelinvasiven Zelllinien BFTC-905, UMUC-3 und VMCUB-1 ausgewählt. Die Wahl erfolgte anhand spezifischer Kriterien, die Aspekte der Karzinogenese, des Proliferationsverhaltens, der Cisplatin-Sensitivität und des zellulären Phänotyps berücksichtigten [55, 131]. Bezüglich des zellulären Phänotyps gilt es hervorzuheben, dass sich die UCC BFTC-905 und VMCUB-1 durch einen epithelialen und UMUC-3 durch einen mesenchymalen Phänotyp kennzeichnen. Die individuellen Charakteristika der UCC wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit vor dem Beginn der Versuchsansätze mit KM überprüft. Die Resultate der Überprüfung relevanter Eigenschaften der UCC für die in-vitro-Kultivierung in DMEM werden im Anhang (Abschnitt 7.2) dargestellt.

4.2 Behandlung der UCC mit KM

4.2.1 Überprüfung eines eventuellen Nährstoffmangels durch KM

Vor der Nutzung des KM zur Kultivierung der UCC im Rahmen der Versuchsansätze, galt es die folgende Fragestellung zu überprüfen: Konnte der Nährstoffbedarf der UCC im Zuge der Inkubation mit KM gedeckt werden, obwohl dieses Zellkulturmedium zuvor von den MSC konditioniert wurde? Wie in Abschnitt 3.2.2 erläutert, enthielt das Nährmedium der MSC, das später als KM weiterverwendet wurde, zu Kulturbeginn einen FCS-Gehalt von 10 %. Allerdings ist davon auszugehen, dass das Medium während der Inkubation nicht nur mit löslichen Faktoren der MSC angereichert wurde, sondern diese zugleich auch Nährstoffe verbrauchten. Zum Zeitpunkt der Nutzung des KM für die Kultivierungsversuche der UCC war der verbliebene Nährstoffgehalt unbekannt. Da zelluläre Eigenschaften durch einen Nährstoffmangel beeinflusst und dadurch Auswirkungen einer Behandlung mit KM verändert werden könnten, wurde diese Fragestellung untersucht [39]. Dies erfolgte, indem für jede UCC die Zellviabilität von zwei Gruppen verglichen wurde. Die erste Gruppe beinhaltete UCC, die wie üblich mit einem KM-Gesamtpool behandelt wurden (FCS-Gehalt ursprünglich 10 %). Die Zellen der zweiten Gruppe wurden zwar mit dem gleichen KM-Gesamtpool inkubiert, allerdings wurden diesem zusätzlich 3 % FCS hinzugefügt (FCS-Gehalt mind. 3 %). Die Ergebnisse der zuerst genannten Gruppe wurden im Rahmen der Auswertung zur Normierung genutzt. Der 3 %-FCS-Zusatz zum KM sollte einen eventuellen Nährstoffmangel kompensieren.

Die Ergebnisse der Nährstoffmangel-Untersuchung von BFTC-905 werden in Abb. 9 aufgeführt. Die Zellviabilität der gezeigten Gruppen unterschied sich nicht signifikant voneinander. Folglich blieb die Proliferationskapazität dieser Zelllinie durch die Zugabe von 3 % FCS zum KM unverändert. Ein Nährstoffmangel galt daher als unwahrscheinlich.

BFTC-905

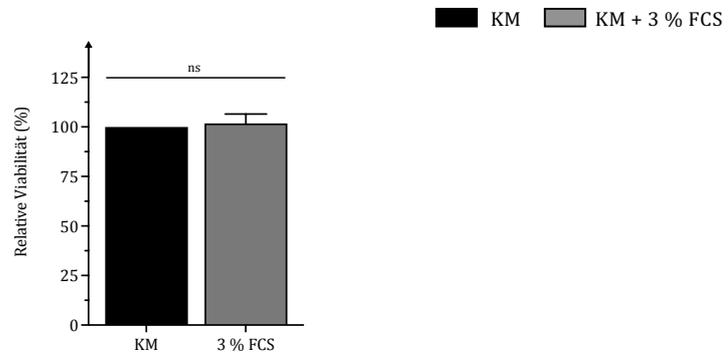


Abb. 9: Untersuchung eines etwaigen Nährstoffmangels im Zuge der Kultivierung von BFTC-905 in KM. Der Zusatz von 3 % FCS zum KM führte zu keiner signifikanten Änderung der Zellviabilität, somit scheint die Proliferation von BFTC-905 in KM nicht durch einen Mangel an Nährstoffen eingeschränkt gewesen zu sein. Aufgetragen ist der Mittelwert + SD der relativen Zellviabilität (n = 2; 8 technische Replikate) der KM + 3 % FCS-Gruppe, der auf die KM-Gruppe normiert wurde.

In Abb. 10 werden die Resultate der Nährstoffmangel-Untersuchung von UMUC-3 dargelegt. Es ist erkennbar, dass der Zusatz von 3 % FCS zum KM für diese Zelllinie tatsächlich zu einer signifikanten Steigerung der Zellviabilität um 14,2 % führte ($p \leq 0,01$). Entsprechend kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Proliferationskapazität von UMUC-3 durch einen zu geringen Nährstoffgehalt des KM eingeschränkt wurde. Trotz dieses Ergebnisses wurde auf eine weitere Modifikation des KM für die Kultivierung von UMUC-3 verzichtet, damit die Ergebnisse der verschiedenen UCC weiterhin miteinander verglichen werden konnten.

UMUC-3

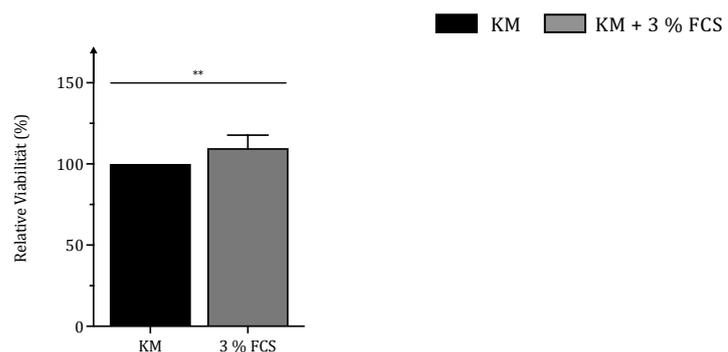


Abb. 10: Untersuchung eines etwaigen Nährstoffmangels im Zuge der Kultivierung von UMUC-3 in KM. Der Zusatz von 3 % FCS zum KM führte zu einer gesteigerten Zellviabilität, weshalb nicht auszuschließen ist, dass es bei der Kultivierung von UMUC-3 in KM zu einer Nährstoffmangel-Situation kam. Aufgetragen ist der Mittelwert + SD der relativen Zellviabilität (n = 2; 8 technische Replikate) der KM + 3 % FCS-Gruppe, der auf die KM-Gruppe normiert wurde.

Vervollständigt werden die Ergebnisse zur Untersuchung eines Nährstoffmangels durch die Analysen von VMCUB-1 in Abb. 11. Analog zu BFTC-905, resultierte auch für VMCUB-1 aus der Zugabe von 3 % FCS zum KM keine signifikante Änderung der Zellviabilität. Die

Proliferation von VMCUB-1 in KM wurde somit nicht durch einen Nährstoffmangel kompromittiert.

VMCUB-1

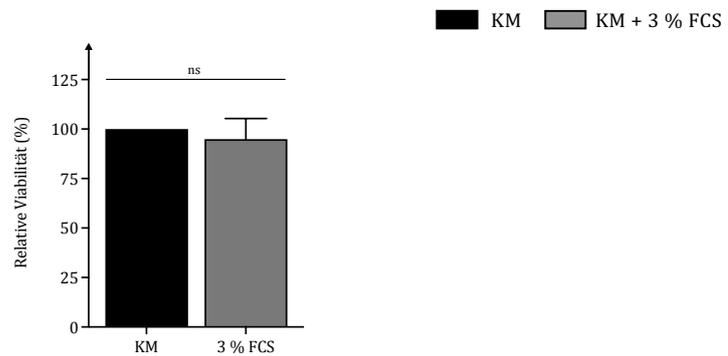


Abb. 11: Untersuchung eines etwaigen Nährstoffmangels im Zuge der Kultivierung von VMCUB-1 in KM. Der Zusatz von 3 % FCS zum KM führte zu keiner signifikanten Änderung der Zellviabilität, somit scheint die Proliferation der VMCUB-1-Zellen in KM nicht durch einen Mangel an Nährstoffen eingeschränkt gewesen zu sein. Aufgetragen ist der Mittelwert + SD der relativen Zellviabilität ($n = 2$; 8 technische Replikate) der KM + 3 % FCS-Gruppe, der auf die KM-Gruppe normiert wurde.

4.2.2 Einfluss von KM auf die Proliferation

Im Anschluss an die Untersuchungen zum Nährstoffgehalt des KM (Abschnitt 4.2.1) wurden in den weiteren Versuchsansätzen in der Regel für jede UCC zwei Gruppen miteinander verglichen: Zum einen Tumorzellen, die mit KM inkubiert wurden und zum anderen solche, die DMEM als Zellkulturmedium erhielten. Im Rahmen der Proliferationsanalysen wurde ermittelt, ob die löslichen Faktoren im KM die proliferative Kapazität der UCC im Vergleich zu einer DMEM-Kontrolle modifizierten.

Mit Abb. 12 wird belegt, dass die Zellviabilität von BFTC-905 nach der Inkubation mit KM, das 5-fache der DMEM-Kontrolle betrug ($p \leq 0,001$). Dementsprechend wurde die Proliferationsgeschwindigkeit von BFTC-905 durch das KM signifikant gefördert.

BFTC-905

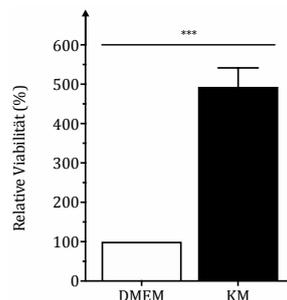


Abb. 12: Auswirkungen der Inkubation von BFTC-905 mit KM auf die Proliferation durch Bestimmung der Zellviabilität. Durch die Inkubation mit KM nahm die Proliferationsgeschwindigkeit der BFTC-905-Zellen signifikant zu. Dargestellt ist der Mittelwert + SD ($n = 6$, 6 technische Replikate) der KM-Gruppe, der auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Analog hierzu ging die Kultivierung von UMUC-3 im KM ebenfalls mit einem signifikanten Anstieg der Proliferationskapazität um das 2,3-fache der DMEM-Kontrolle einher (siehe Abb. 13, $p \leq 0,001$).

UMUC-3

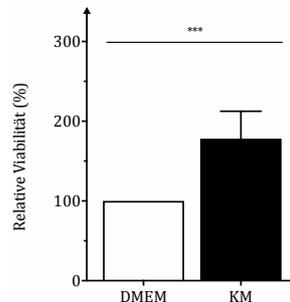


Abb. 13: Auswirkungen der Inkubation von UMUC-3 mit KM auf die Proliferation durch Bestimmung der Zellviabilität. Durch die Inkubation mit KM nahm die Proliferationsgeschwindigkeit der UMUC-3-Zellen signifikant zu. Dargestellt ist der Mittelwert + SD ($n = 6$, 6 technische Replikate) der KM-Gruppe, der auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Auch für VMCUB-1 war die Zellviabilität nach der Behandlung mit KM signifikant höher als in der DMEM-Kontrolle (Abb. 14). Die proliferative Kapazität der Tumorzellen stieg dabei im KM um das 1,8-fache ($p \leq 0,001$) an.

VMCUB-1

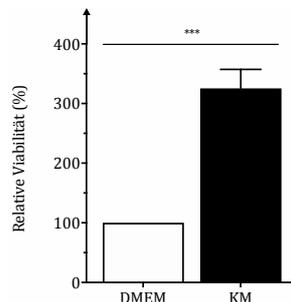


Abb. 14: Auswirkungen der Inkubation von VMCUB-1 mit KM auf die Proliferation durch Bestimmung der Zellviabilität. Durch die Inkubation mit KM nahm die Proliferationsgeschwindigkeit der VMCUB-1-Zellen signifikant zu. Dargestellt ist der Mittelwert + SD ($n = 6$, 6 technische Replikate) der KM-Gruppe, der auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse für alle untersuchten UCC eine Steigerung der Zellviabilität durch die Inkubation mit KM. Der Effekt auf das Wachstum der BFTC-905-Zellen war am stärksten ausgeprägt.

4.2.3 Einfluss von KM auf die Cisplatin-Sensitivität

Im Zuge der Resistenzanalysen wurde die Fragestellung untersucht, inwiefern die Signalmediatoren im KM die Sensitivität der UCC gegenüber der in-vitro-Behandlung mit Cisplatin modifizierten. Verglichen wurden UCC, die in KM inkubiert wurden, mit einer DMEM-Kontrolle in aufsteigenden Cisplatinkonzentrationen.

Die Resultate der Resistenzanalysen von BFTC-905 werden in Abb. 15 wiedergegeben. Wie zu erwarten, sinkt die Viabilität beider Gruppen mit aufsteigender Cisplatin-Konzentration ab. Der direkte Vergleich zeigt aber, dass die BFTC-905-Zellen im KM über ein breites Konzentrationspektrum eine signifikant höhere Viabilität aufwiesen als die Zellen der DMEM-Kontrolle. Insbesondere im hohen Konzentrationsbereich wird dieser Unterschied deutlich: Während in der Kontrolle nach der Behandlung mit 16 μM Cisplatin keine Viabilität mehr messbar war, überlebten im KM 5 % der Ausgangszellen die Behandlung mit Cisplatin ($p \leq 0,001$). Der beschriebene Unterschied ist auch für die Konzentrationen von 0,4 μM und 1 μM sowie im Bereich zwischen 4 μM bis 12 μM signifikant. Dementsprechend förderte die Inkubation mit KM die Überlebenswahrscheinlichkeit und folglich die Resistenz von BFTC-905 gegenüber Cisplatin.

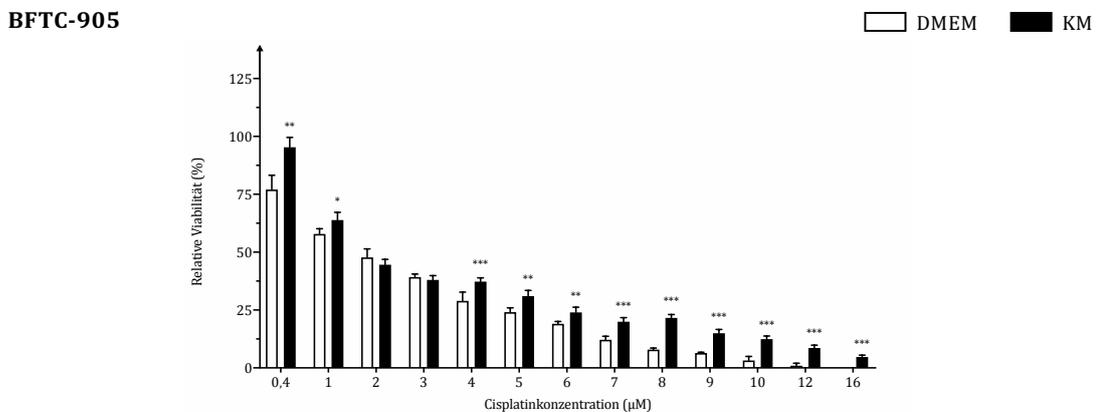


Abb. 15: Untersuchung der Auswirkungen von KM auf die Cisplatin-Sensitivität von BFTC-905 durch Bestimmung der Zellviabilität. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert + SD ($n = 6$, 3 technische Replikate), der auf eine Proliferationskontrolle desselben Nährmediums ohne Cisplatin-Zusatz normiert wurde (nicht dargestellt). Für ein breites Konzentrationspektrum überlebten im KM mehr BFTC-905-Zellen als in der DMEM-Kontrolle.

Wie Abb. 16 verdeutlicht, konnte für UMUC-3 ebenfalls ein resistenzfördernder Effekt des KM demonstriert werden. Für alle untersuchten Konzentrationen waren im KM signifikant mehr überlebende Zellen nachweisbar als in der DMEM-Kontrolle. Am stärksten wirkte sich der Effekt auf die Behandlung mit 2 μM bzw. 3 μM Cisplatin ($p \leq 0,001$) aus.

UMUC-3

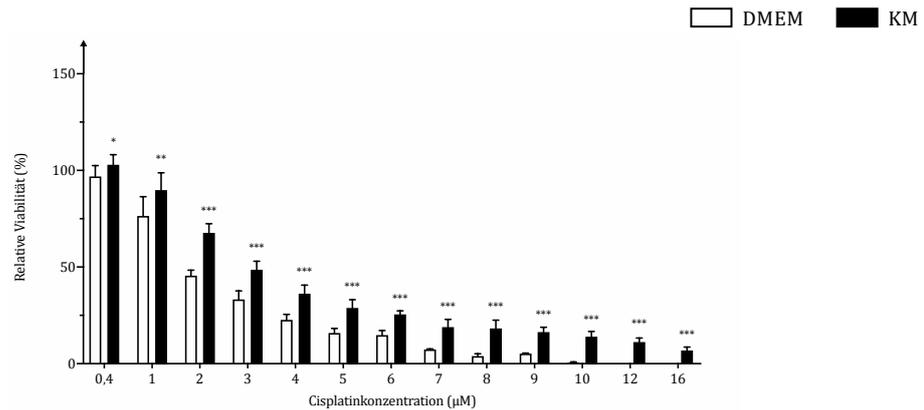


Abb. 16: Untersuchung der Auswirkungen von KM auf die Cisplatin-Sensitivität von UMUC-3 durch Bestimmung der Zellviabilität. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert + SD (n = 9, 3 technische Replikate), der auf eine Proliferationskontrolle desselben Nährmediums ohne Cisplatin-Zusatz normiert wurde (nicht dargestellt). Für alle analysierten Konzentrationen überlebten im KM mehr UMUC-3-Zellen als in der DMEM-Kontrolle.

Auch auf die Resistenzeigenschaften der VMCUB-1-Zellen wirkte sich das KM förderlich aus (Abb. 17). Dieser Effekt war für die Konzentrationen von 0,4 µM und 1 µM Cisplatin mit einer erhöhten Viabilität im Vergleich zur DMEM-Kontrolle verbunden ($p \leq 0,05$). Entsprechend war der resistenzfördernde Effekt des KM auf diese UCC am schwächsten ausgeprägt.

VMCUB-1

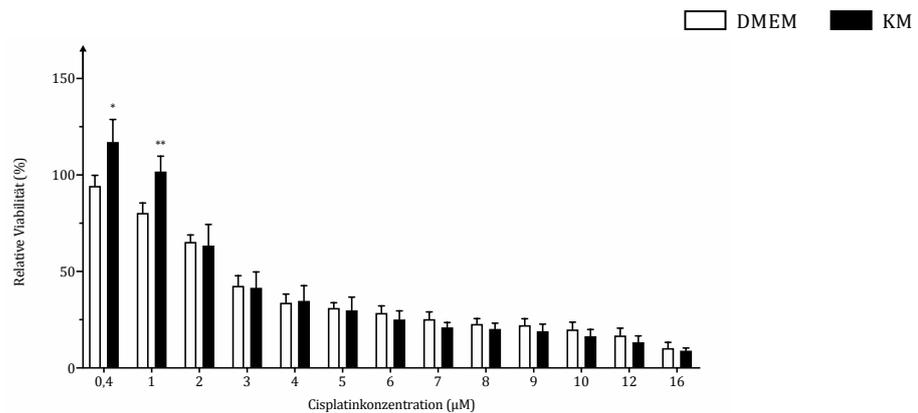


Abb. 17: Untersuchung der Auswirkungen von KM auf die Cisplatin-Sensitivität von VMCUB-1 durch Bestimmung der Zellviabilität. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert + SD (n = 6, 3 technische Replikate), der auf eine Proliferationskontrolle desselben Nährmediums ohne Cisplatin-Zusatz normiert wurde. Die Inkubation der VMCUB-1-Zellen mit KM führte für die Behandlung mit 0,4 µM und 1 µM Cisplatin zu einer Erhöhung der Resistenz.

4.2.4 Effekte von KM auf die Zelldifferenzierung

4.2.4.1 Veränderungen der Proteinexpression von CK14

Die CSC stellen eine Subpopulation von Tumorzellen mit stammzelltypischen Eigenschaften dar, denen eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression und der Entstehung von Tumorrezidiven zugeschrieben wird (Abschnitt 1.1.3.2) [53]. Das Protein CK14 wird in diesem Kontext als CSC-Marker für UC verwendet [55]. Um die Auswirkungen des KM auf den Stammzellcharakter der UCC zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression von CK14

analysiert. Bereits in einer Vorgängerarbeit von Skowron und Hoffman et al. (2015) stellte sich heraus, dass CK14 nur von UCC mit epithelialem Phänotyp exprimiert wird [55]. In Kongruenz hierzu konnte in der vorliegenden Arbeit für die mesenchymale Zelllinie UMUC-3 in keinem Zellkulturmedium eine CK14-Expression detektiert werden. Für die Analysen von BFTC-905 und VMCUB-1 wurden vorkonditionierte UCC verwendet. Neben der Wirkung des KM wurde auch der Einfluss einer Cisplatin-Behandlung erforscht.

Aus Abb. 18 wird ersichtlich, dass die löslichen Faktoren im KM ohne Cisplatin-Zusatz keine Veränderung des CK14-Expressionsniveaus der BFTC-905-Zellen bewirkten. Die Cisplatin-Therapie hingegen ging sowohl in DMEM als auch in KM mit einer signifikanten Erhöhung der CK14-Expression von BFTC-905 einher ($p \leq 0,001$). Das Expressionsniveau stieg in DMEM um das 4-fache und im KM sogar um das 5,5-fache im Vergleich zur DMEM-Kontrolle. Folglich exprimierte die Zelllinie BFTC-905 am stärksten den CSC-Marker, nachdem sie mit Cisplatin behandelt und in KM kultiviert wurde.

BFTC-905

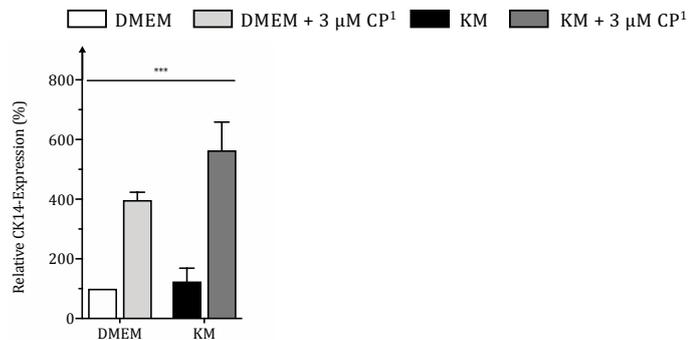


Abb. 18: Evaluation der CK14-mRNA-Expression für BFTC-905 nach Vorkonditionierung mit KM und Cisplatin¹-Zusatz. Der Cisplatin-Zusatz zu den Zellen bewirkte eine Steigerung der CK14-Expression, wobei dieser Effekt durch die gleichzeitige Inkubation mit KM weiter verstärkt wurde. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert + SD (n = 3, 3 technische Replikate), der auf die DMEM-Kontrolle ohne Cisplatin normiert wurde.

Analoge Ergebnisse ließen sich auch für VMCUB-1 generieren (Abb. 19). Die Cisplatin-Behandlung resultierte für die Zellen in DMEM in einem tendenziellen und in KM in einem signifikanten Anstieg des CK14-Expressionsniveaus um das 5-fache ($p \leq 0,001$).

VMCUB-1

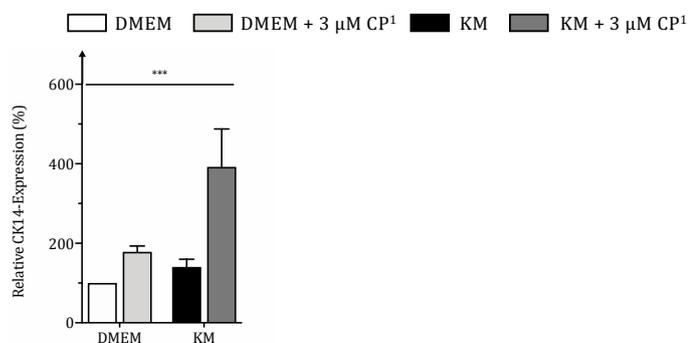


Abb. 19: Evaluation der CK14-mRNA-Expression für VMCUB-1 nach Vorkonditionierung mit KM und Cisplatin¹-Zusatz. Der Cisplatin-Zusatz zu den Zellen bewirkte eine Steigerung der CK14-Expression, wobei dieser Effekt durch die gleichzeitige Inkubation mit KM weiter verstärkt wurde. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert + SD (n = 3, 3 technische Replikate), der auf die DMEM-Kontrolle ohne Cisplatin normiert wurde.

4.2.5 Einfluss von KM auf die Apoptose

Die Entwicklung der Apoptoseresistenz ist ein wichtiger Schritt der Tumorgenese, da die Tumorzellen auf diesem Weg immortalisieren, weitere genetische Mutationen akkumulieren und sich der Kontrolle des körpereigenen Immunsystems entziehen [40, 61]. Um zu untersuchen, inwiefern die Apoptose-Eigenschaften der UCC durch das KM modifiziert werden, wurde die mRNA-Expression der antiapoptotisch wirkenden Gene Bcl-XL, Bcl-2 und Survivin analysiert. Eine Senkung der Expression wurde als pro- und eine Steigerung als antiapoptotischer Effekt gewertet (Abschnitt 1.1.3.3). Ergänzend wurde untersucht, ob der Zusatz von Cisplatin zu den UCC die Wirkung des KM modifizierte. Die Ergebnisse der Apoptose-Analysen für BFTC-905 werden in Abb. 20 (A-C) aufgeführt. Die Kultivierung der Zellen im KM wirkte sich ohne Cisplatin-Zusatz lediglich auf die Bcl-2-Expression signifikant aus. Diese sank im Vergleich zur DMEM-Kontrolle um 37 % (A, $p \leq 0,001$), was einer geringen proapoptotischen Wirkung des KM entsprach. Die Auswirkungen der Cisplatin-Therapie waren ausgeprägter: Bei gleichzeitiger Inkubation mit KM sank die Bcl-XL-Expression nach Cisplatin-Zusatz um 21 % (A, $p \leq 0,05$). Dieser proapoptotische Effekt zeigte sich auch dadurch, dass die Zellen unabhängig vom Zellkulturmedium nach der Zugabe von Cisplatin 80 % weniger Bcl-2 exprimierten (B, $p \leq 0,001$). Im Gegensatz dazu wurde die Survivin-Expression weder durch die Behandlung mit KM noch durch Cisplatin relevant modifiziert (C).

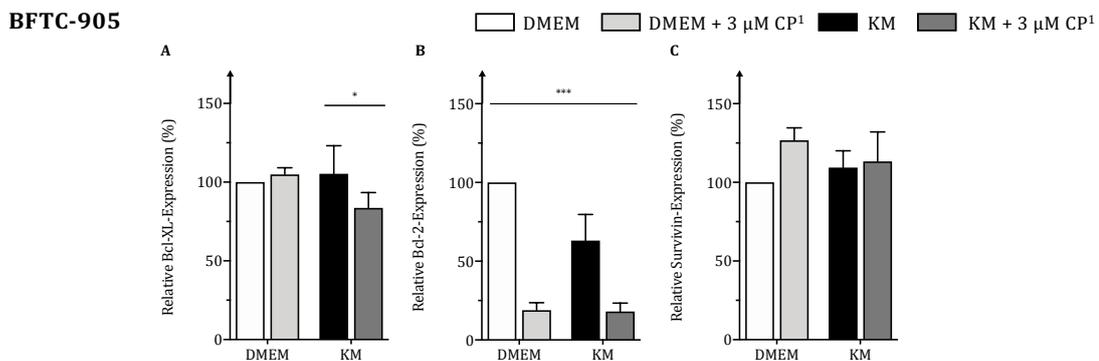


Abb. 20: Einfluss von KM und Cisplatin¹ auf die mRNA-Expression von Bcl-XL (A), Bcl-2 (B) und Survivin (C) für BFTC-905. Insbesondere die Bcl-2-Expression von BFTC-905 wurde durch die Inkubation mit KM bzw. die Behandlung mit Cisplatin reduziert. Abgebildet ist der jeweilige Mittelwert + SD (n = 3, 3 technische Replikate), der auf die DMEM-Kontrolle ohne Cisplatin normiert wurde.

Gemäß Abb. 21 (A-C) waren die Effekte auf die apoptotischen Eigenschaften von UMUC-3 ausgeprägter. Im Vergleich zur DMEM-Kontrolle exprimierten die UMUC-3-Zellen nach der Vorkonditionierung im KM tendenziell mehr Bcl-XL und signifikant mehr Bcl-2, was einer antiapoptotischen Wirkung des KM entsprach. Das Bcl-2-Expressionsniveau (A) stieg in diesem Kontext um das 1,5-fache an (B, $p \leq 0,001$). Die Cisplatin-Therapie wirkte sich auf

die Expression aller untersuchten Zielgene aus. Der Cisplatin-Zusatz reduzierte die Bcl-XL-Expression um ca. 50 % (A, $p \leq 0,001$) und auch das Expressionsniveau von Bcl-2 sank durch die Chemotherapie tendenziell ab. Somit konnte auch für UMUC-3 ein partieller proapoptotischer Effekt des Cisplatin belegt werden. Allerdings bewirkte die Zugabe von Cisplatin eine Erhöhung des Survivin-Expressionsniveaus um 25 % (C, $p \leq 0,05$).

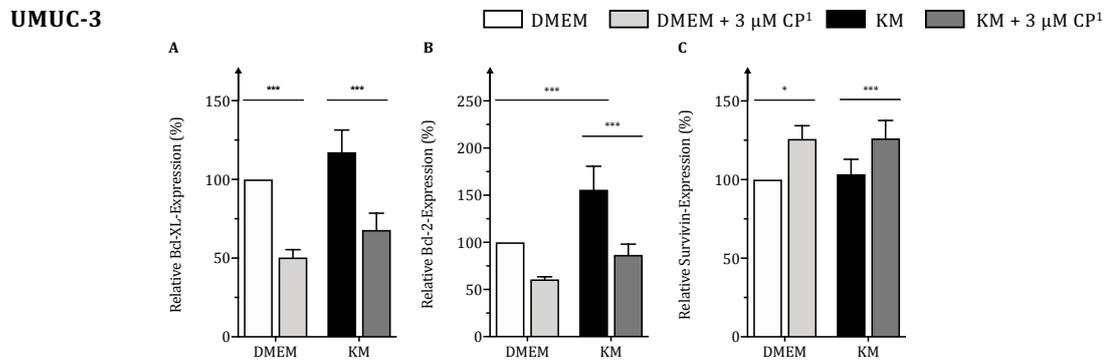


Abb. 21: Einfluss von KM und Cisplatin¹ auf die mRNA-Expression von Bcl-XL (A), Bcl-2 (B) und Survivin (C) für UMUC-3. Während sich die Behandlung mit Cisplatin auf alle untersuchten Zielgene auswirkte, wurde ein Effekt der Inkubation mit KM ohne Cisplatin-Zusatz insbesondere für Bcl-2 in Form einer signifikanten Anhebung des Expressionsniveaus deutlich. Abgebildet ist der jeweilige Mittelwert + SD ($n = 3$, 3 technische Replikate), der auf die DMEM-Kontrolle ohne Cisplatin normiert wurde.

Für die Zelllinie VMCUB-1 wirkte sich die Inkubation mit KM auf keines der untersuchten Zielgene aus (Abb. 22, A-C). Die Cisplatin-Behandlung hingegen hatte einen proapoptotischen Effekt in Form einer signifikanten Reduktion des Expressionsniveaus von Bcl-XL um 50 % ($p \leq 0,01$). Die Wirkung blieb unbeeinflusst vom verwendeten Zellkulturmedium (A).

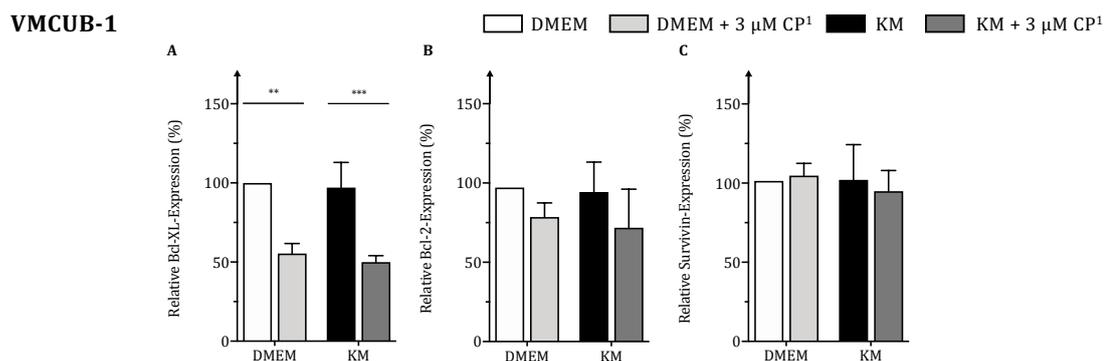


Abb. 22: Einfluss von KM und Cisplatin¹ auf die mRNA-Expression von Bcl-XL (A), Bcl-2 (B) und Survivin (C) für VMCUB-1. Während die Behandlung mit Cisplatin zu einer signifikanten Reduktion der Bcl-XL-Expression der VMCUB-1-Zellen führte, blieb das Expressionsniveau von Bcl-2 und Survivin sowohl vom KM als auch von der Cisplatin-Therapie unbeeinflusst. Abgebildet ist der jeweilige Mittelwert + SD ($n = 3$, 3 technische Replikate), der auf die DMEM-Kontrolle ohne Cisplatin normiert wurde.

Die Zusammenschau der Ergebnisse ergibt, dass die Auswirkungen des KM und der Cisplatin-Behandlung auf die untersuchten antiapoptotisch wirkenden Faktoren Gen- und UCC-spezifisch sowie teilweise konträr waren.

4.2.6 Effekte von KM auf die Zellmotilität

Die zelluläre Motilität oder Eigenbeweglichkeit stellt eine wichtige Voraussetzung für das invasive Potential und die Metastasierung von Tumorzellen dar (Abschnitt 1.1.3.4) [68]. Daher wurde der Einfluss des KM auf die Migration der UCC über einen Zeitraum von 10 h untersucht. Ergänzend wurden die Auswirkungen des Zusatzes von Cisplatin zum Zellkulturmedium eruiert. Da das Cisplatin erst zu Beginn des Beobachtungszeitraumes hinzugefügt wurde, konnte für diese zeitlich sehr begrenzte Einwirkzeit kein Effekt festgestellt werden. Deswegen werden die Resultate der Cisplatin-Behandlung im Anhang aufgeführt (Abschnitt 7.2).

Die Ergebnisse der Migrations-Analysen für BFTC-905 in Abb. 23 belegen, dass die migratorische Kapazität der Tumorzellen nach der Inkubation mit KM im Vergleich zur DMEM-Kontrolle sichtbar gesteigert war. Im Bildvergleich nach 10 h war die Schließung der zuvor zellfreien Lücke im KM bereits deutlich weiter fortgeschritten (A). Zu diesem Zeitpunkt lag die Anzahl der migrierten Zellen im KM um 66 % höher als in der DMEM-Kontrolle (B, $p \leq 0,001$). Dieser migrationsfördernde Effekt durch die löslichen Faktoren des KM war auch für den Zeitpunkt nach 8 h signifikant ($p \leq 0,001$).

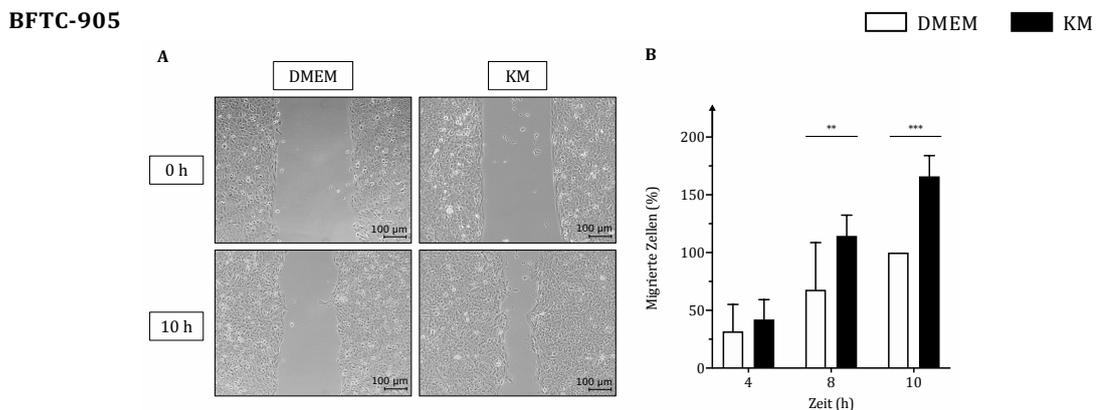


Abb. 23: Migration der BFTC-905-Zellen im KM. Dargestellt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen zu Beginn (0 h) und zum Abschluss des Beobachtungszeitraums (10 h) für die DMEM-Kontrolle und die Inkubation mit KM (A). Ergänzend werden die Ergebnisse zu den einzelnen Messzeitpunkten gezeigt (B). Beide Darstellungsvarianten verdeutlichen, dass die Migrationskapazität der BFTC-905-Zellen durch die Inkubation mit KM sichtbar gesteigert wurde. Abgebildet sind die Mittelwerte + SD ($n = 9$, 2 technische Replikate), die auf die DMEM-Kontrolle nach 10 h normiert wurden. 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 μm .

Die migrationsfördernde Wirkung des KM ließ sich auch für die UMUC-3-Zellen nachweisen (Abb. 24). Zum Abschluss der Beobachtungsdauer nach 10 h war im KM nahezu keine zellfreie Lücke mehr erkennbar, wohingegen die Migration in DMEM weniger weit vorangeschritten war (A). Dieser migrationsfördernde Effekt des KM war zu jedem Messzeitpunkt signifikant (B). Der beobachtete Unterschied der beiden Gruppen stieg bis zum Abschluss der Inkubation auf 63 % an ($p \leq 0,01$).

UMUC-3

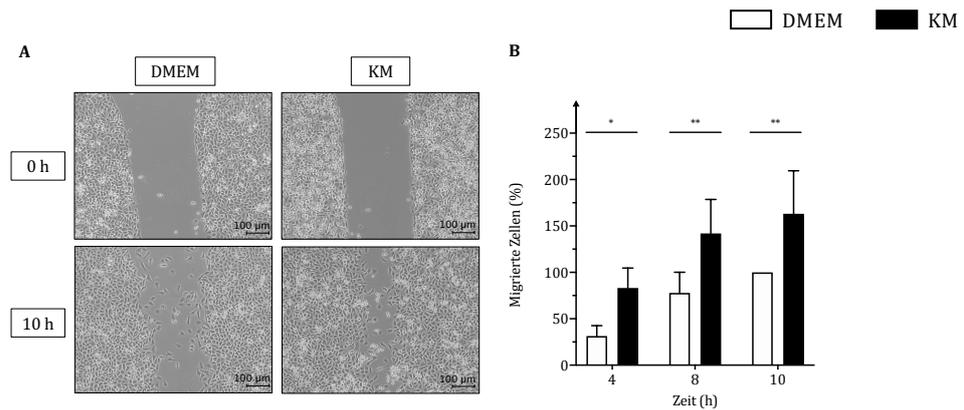


Abb. 24: Migration der UMUC-3-Zellen im KM. Dargestellt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen zu Beginn (0 h) und zum Abschluss des Beobachtungszeitraums (10 h) für die DMEM-Kontrolle und die Inkubation mit KM (A). Ergänzend werden die Ergebnisse zu den einzelnen Messzeitpunkten gezeigt (B). Beide Darstellungsvarianten verdeutlichen, dass die Migrationskapazität der UMUC-3-Zellen durch die Inkubation mit KM gesteigert wurde. Abgebildet sind die Mittelwerte + SD (n = 9, 2 technische Replikate), die auf die DMEM-Kontrolle nach 10 h normiert wurden. 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 μ m.

Auch für die Zelllinie VMCUB-1 lässt sich den Bildaufnahmen in Abb. 25 entnehmen, dass die Migrationsfähigkeit der Zellen nach 10 h im KM sichtbar gesteigert war (A). Der migrationsfördernde Effekt war ebenfalls zu allen Messzeitpunkten signifikant (B). Der größte Unterschied der beiden Gruppen wurde nach 10 h erreicht und betrug 48 % ($p \leq 0,001$).

VMCUB-1

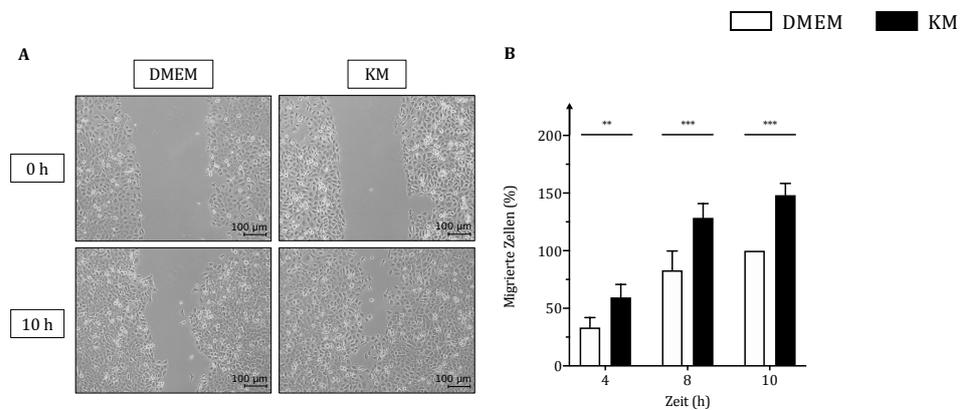


Abb. 25: Migration der VMCUB-1-Zellen im KM. Dargestellt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen zu Beginn (0 h) und zum Abschluss des Beobachtungszeitraums (10 h) für die DMEM-Kontrolle und die Inkubation mit KM (A). Ergänzend werden die Ergebnisse zu den einzelnen Messzeitpunkten gezeigt (B). Beide Darstellungsvarianten verdeutlichen, dass die Migrationskapazität der VMCUB-1-Zellen durch die Inkubation mit KM gesteigert wurde. Abgebildet sind die Mittelwerte + SD (n = 9, 2 technische Replikate), die auf die DMEM-Kontrolle nach 10 h normiert wurden. 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 μ m.

4.2.7 Einfluss von KM auf die Invasivität

Die Fragestellung, ob die Invasivität der UCC durch das KM beeinflusst wird, wurde mit zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen exploriert. Im Invasions-Assay wurde der chemotaktische Effekt des KM auf die invasive Kapazität der UCC durch eine ECM-Schicht analysiert. Ergänzend wurde die Expression des CSC- und Invasivitätsmarkers CD44 von UCC bestimmt, die mit KM vorkonditioniert wurden [78].

4.2.7.1 Funktionelle Invasions-Analyse

Für UMUC-3 und VMCUB-1 konnte bereits nach einer Expositionszeit gegenüber dem KM von 20 h ein deutlicher Effekt der löslichen Faktoren auf die Invasion der Zellen durch die ECM-Schicht beobachtet werden. Für die Zelllinie BFTC-905 stellte sich der Unterschied deutlich schwächer dar. Aus diesem Grund wurde für BFTC-905 zum einen die Expositionszeit gegenüber dem KM auf 24 h verlängert und zum anderen das beschriebene Versuchskonzept erweitert, indem die Invasions-Analysen zusätzlich mit vorkonditionierten BFTC-905-Zellen wiederholt wurden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von BFTC-905 werden in Abb. 26 (A, B) aufgeführt. Zuerst werden repräsentative Bildaufnahmen der (Transwell-) Membranen aus den Invasions-Assays dargestellt (A). Die violett-gefärbten Areale entsprechen den erfolgreich invadierten Zellen. Es ist erkennbar, dass der kurzfristige Einsatz (24 h) des KM als Lockmedium nur in einer geringen Erhöhung der invadierten Zellen im Vergleich zur DMEM-Kontrolle resultierte. Durch die vorherige Vorkonditionierung war die Invasivität hingegen so weit gesteigert, dass nahezu die gesamte Membran besetzt war. Die nebenstehende Graphik (B) visualisiert diesen invasivitätsfördernden Effekt. Der kurzfristige Einsatz des KM verdoppelte die Anzahl invadierter Zellen, die vorherige Vorkonditionierung resultierte sogar in einem exponentiellen Anstieg. Für beide Gruppen war der beobachtete Effekt signifikant im Vergleich zur DMEM-Kontrolle ($p \leq 0,001$).

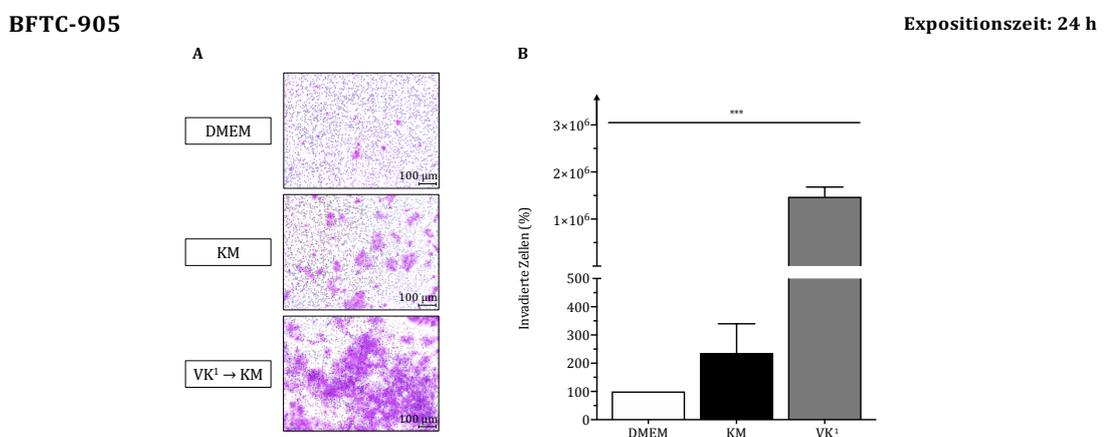


Abb. 26: Einfluss des KM auf die Invasivität von BFTC-905. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Anzahl an invadierten Zellen im Vergleich zur DMEM-Kontrolle, durch den Einsatz von KM als Lockmedium leicht und durch die vorherige Vorkonditionierung¹ der Zellen massiv zunahm (A). Der invasionsfördernde Effekt war in beiden Fällen signifikant (B). Kristallviolett-Färbung, 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD ($n=9$, 6 technische Replikate), die auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden.

Wie erwähnt reichte die kurzfristige Exposition der UMUC-3-Zellen gegenüber dem KM als Lockmedium bereits aus, um deutliche Effekte auf die Invasivität zu beobachten. Abb. 27 (A, B) belegt, dass im KM nach 20 h beinahe eine flächendeckende Schicht aus adhärenenten, invadierten Zellen auf der Membran entstanden war. Im Gegensatz hierzu blieb die

Membran in DMEM nahezu frei (A). Graphisch ließ sich dieser Effekt in einer 2,5-fach gesteigerten invasiven Kapazität der Zellen im KM festhalten (B, $p \leq 0,001$).

UMUC-3

Expositionszeit: 20 h

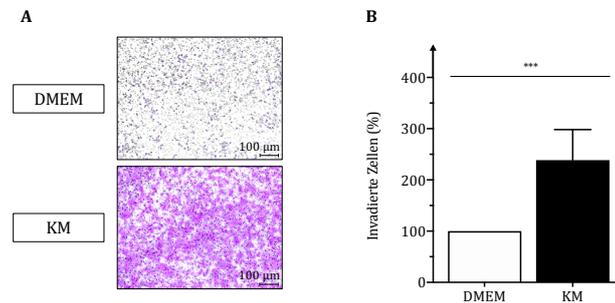


Abb. 27: Einfluss des KM auf die Invasivität von UMUC-3. Der Einsatz von KM als Lockmedium resultierte in einer signifikanten Erhöhung invadierter Zellen. (A) Kristallviolett-Färbung, 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm. (B) Dargestellt ist der Mittelwert + SD ($n = 9$, 6 technische Replikate), der auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Ähnliche Resultate ließen sich auch für die UCC VMCUB-1 demonstrieren (Abb. 28 A, B). Hier waren im KM ebenfalls deutlich mehr invadierte Zellen auf der Membran sichtbar als in der DMEM-Kontrolle (A). Die Invasivität der Zellen war dabei nach der Inkubation mit KM um das 3,3-fache höher (B, $p \leq 0,001$).

VMCUB-1

Expositionszeit: 20 h

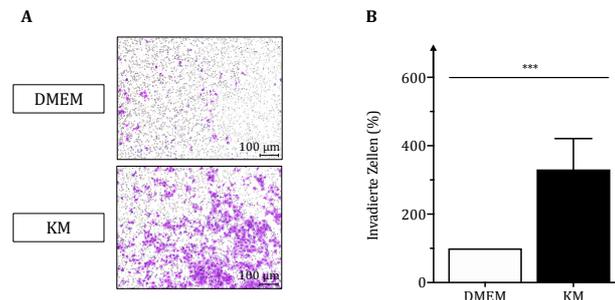


Abb. 28: Einfluss des KM auf die Invasivität von VMCUB-1. Der Einsatz von KM als Lockmedium resultierte in einer signifikanten Erhöhung invadierter Zellen. (A) Kristallviolett-Färbung, 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm. (B) Dargestellt ist der Mittelwert + SD ($n = 9$, 6 technische Replikate), der auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

4.2.7.2 Veränderungen der Proteinexpression von CD44

Die Expression des CSC- und Invasivitätsmarkers CD44 wurde mit Hilfe von durchflusszytometrischen Untersuchungen vorkonditionierter UCC analysiert. Die Inkubation der BFTC-905-Zellen mit KM bewirkte eine signifikante Zunahme des Expressionsniveaus von CD44 um das 7,5-fache der DMEM-Kontrolle (Abb. 29, $p \leq 0,01$).

BFTC-905

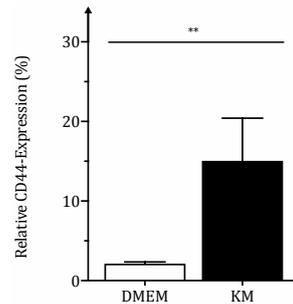


Abb. 29: CD44-Expression für BFTC-905 nach der Vorkonditionierung in KM. Die Inkubation der BFTC-905-Zellen mit KM bewirkte eine signifikante Steigerung der Proteinexpression von CD44. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert + SD (n = 7).

Im Gegensatz hierzu führte die Vorkonditionierung der mesenchymalen UMUC-3-Zellen in KM zu einer signifikanten Reduktion der CD44-Expression (Abb. 30, $p \leq 0,001$).

UMUC-3

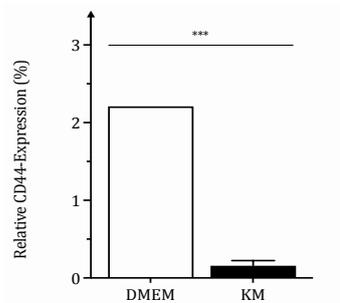


Abb. 30: CD44-Expression für UMUC-3 nach der Vorkonditionierung in KM. Die Inkubation der UMUC-3-Zellen mit KM bewirkte eine signifikante Reduktion der Proteinexpression von CD44. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert + SD (n = 3).

Analog zu den Ergebnissen von BFTC-905 war auch die Kultivierung der UCC VMCUB-1 in KM mit einer Zunahme der CD44-Expression assoziiert (Abb. 31). Diese umfasste das 3-fache der DMEM-Kontrolle ($p \leq 0,05$).

VMCUB-1

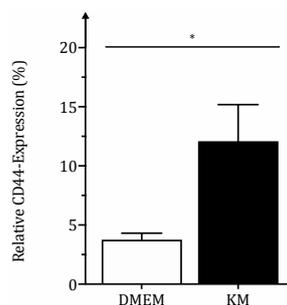


Abb. 31: CD44-Expression für VMCUB-1 nach der Vorkonditionierung in KM. Die Inkubation der VMCUB-1-Zellen mit KM bewirkte eine signifikante Steigerung der Proteinexpression von CD44. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert + SD (n = 4).

4.2.8 Effekte von KM auf die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse zu den Auswirkungen des KM auf den zellulären Phänotyp der UCC zusammengefasst, mit deren Hilfe die Fragestellung untersucht wurde, inwiefern das KM die EMT als Schlüsselereignis der Metastasierung beeinflusst (Abschnitt 1.1.3.5) [84,88]. Vor Beginn der verschiedenen Versuchsansätze wurde der zelluläre Phänotyp der UCC zunächst in DMEM überprüft (Abschnitt 7.2). Zusammengefasst bestätigte die Überprüfung, dass sich die UCC BFTC-905 und VMCUB-1 durch einen epithelialen und die UCC UMUC-3 durch einen mesenchymalen Phänotyp kennzeichneten.

Im Kontext der Versuchsansätze wurden verschiedene Methoden angewendet, wobei stets vorkonditionierte UCC analysiert wurden. Zu Beginn wurde die Morphologie der UCC in DMEM bzw. KM lichtmikroskopisch verglichen. Danach wurde der zelluläre Phänotyp unter Berücksichtigung der differentiellen Expression des epithelialen Adhäsionsmoleküls E-Cadherin und des mesenchymalen Markers Vimentin charakterisiert. Die genannten Parameter wurden zuerst auf Gen- und anschließend auf Proteinexpressionsebene nachvollzogen.

4.2.8.1 Veränderungen der Zellmorphologie

Die Auswirkungen des KM auf die Zellmorphologie der UCC wurde lichtmikroskopisch im Anschluss an die Vorkonditionierung dokumentiert. Die Bildausschnitte in Abb. 32 illustrieren die Morphologie der BFTC-905-Zellen in DMEM und KM. Es ist auffällig, dass das charakteristische koloniale Wachstum der Zellen nicht wesentlich durch die Kultivierung in KM verändert wurde. Allerdings wirkten die Kolonien in DMEM kompakter und die interzellulären Kontakte, die hier als weiße Linien zwischen den Zellen erscheinen, waren deutlicher ausgeprägt als in KM. Zusätzlich ließen sich nach der Vorkonditionierung in KM vermehrt Zellen erkennen, die sich aus dem Zellverbund gelöst und eine eher spindelförmige, mesenchymale Morphologie angenommen haben.

BFTC-905

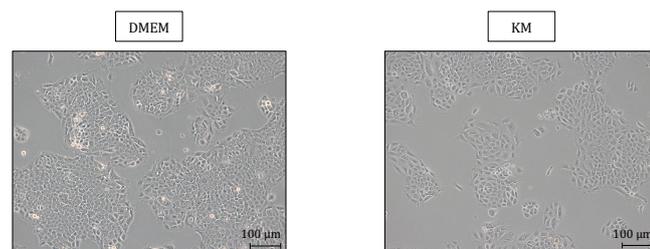


Abb. 32: Lichtmikroskopischer Vergleich von BFTC-905 nach Vorkonditionierung mit KM. Die repräsentativen Bildausschnitte verdeutlichen, dass die Zellen nach der Vorkonditionierung mit KM eine tendenziell stärker mesenchymale Morphologie aufweisen. 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm.

Für die UMUC-3-Zellen resultierte aus der Vorkonditionierung mit KM keine sichtbare Veränderung der mesenchymalen Zellmorphologie (Abb. 33).

UMUC-3

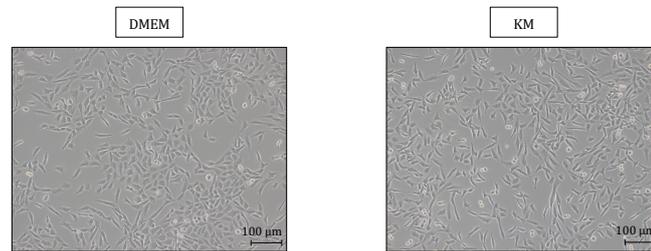


Abb. 33: Lichtmikroskopischer Vergleich von UMUC-3 nach Vorkonditionierung mit KM. Den repräsentativen Bildausschnitten lassen sich keine morphologischen Veränderungen der Zellen durch die Vorkonditionierung mit KM entnehmen. 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm.

Auch nach der Kultivierung der VMCUB-1-Zellen in KM blieben Veränderungen des epithelialen Erscheinungsbildes im Vergleich zur DMEM-Kontrolle aus (Abb. 34).

VMCUB-1

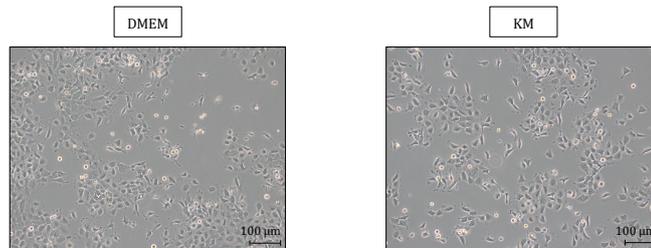


Abb. 34: Lichtmikroskopischer Vergleich von VMCUB-1 nach der Vorkonditionierung mit KM. Den repräsentativen Bildausschnitten lassen sich keine morphologischen Veränderungen der Zellen durch die Vorkonditionierung mit KM entnehmen. 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm.

4.2.8.2 Veränderungen der Genexpression von E-Cadherin und Vimentin

An die zellmorphologischen Untersuchungen schlossen sich die Analysen der mRNA-Expression von E-Cadherin und Vimentin an. Die UCC wurden zunächst wie üblich in KM vorkonditioniert (Abschnitt 3.7). Um ergänzend den Einfluss einer Cisplatin-Therapie auf den zellulären Phänotyp zu erfassen, wurde ein Teil der UCC gemäß dem in Tab. 17 geschilderten Ablauf mit Cisplatin behandelt. Eine DMEM-Kontrolle wurde mitgeführt. Eine Erhöhung der E-Cadherin-Expression wurde als Verstärkung epithelialer Eigenschaften gewertet. Die Zunahme der Vimentin-Expression entsprechend als Steigerung mesenchymaler Charakteristika. Um die antagonistische Wirkung der beiden Marker hervorzuheben, wurde ergänzend ein Vimentin/E-Cadherin-Quotient gebildet. Die Vergrößerung des Quotienten entsprach einer EMT-, eine Verkleinerung einer MET-Induktion (Abb. 4).

Der Abb. 35 (A-C) lassen sich die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen für BFTC-905 entnehmen. Werden zunächst ausschließlich die Resultate für die Wirkung des KM ohne

Cisplatin-Zusatz betrachtet, fällt auf, dass dieses die E-Cadherin-Expression nicht wesentlich beeinflusste (A). Im Gegensatz hierzu war das Expressionsniveau von Vimentin in BFTC-905 nach der Vorkonditionierung mit KM um das 4,5-fache höher als in DMEM (B, $p \leq 0,001$). Aus dieser Konstellation ergab sich eine signifikante Vergrößerung des Vimentin/E-Cadherin-Quotienten, woraus sich eine EMT-induzierende Wirkung der löslichen Faktoren des KM ableiten ließ.

Die ergänzende Behandlung der Zelllinie BFTC-905 mit Cisplatin induzierte eine weitere Erhöhung des Expressionsniveaus für E-Cadherin in DMEM um 68 % und in KM um mildere 40 % im Vergleich zur DMEM-Kontrolle ohne Cisplatin-Zugabe (A, $p \leq 0,001$). Interessanterweise bewirkte Cisplatin ebenfalls eine Zunahme der Vimentin-Expression, dieser Effekt war allerdings nur für die Zellen in KM signifikant und betrug hier eine Erhöhung um das 5,5-fache der DMEM-Kontrolle ($p \leq 0,001$). Zusammenfassend zeigte sich die höchste Vimentin-Expression somit für BFTC-905-Zellen, die mit KM inkubiert und zusätzlich mit Cisplatin behandelt wurden. Da die Cisplatin-behandelten Zellen sowohl mehr E-Cadherin, als auch mehr Vimentin exprimierten, resultierte in DMEM keine relevante Änderung des Vimentin/E-Cadherin-Quotienten. Für die UCC BFTC-905 dämpfte die Cisplatin-Zugabe zu dem KM den EMT-induzierenden Effekt hingegen leicht ($p \leq 0,01$).

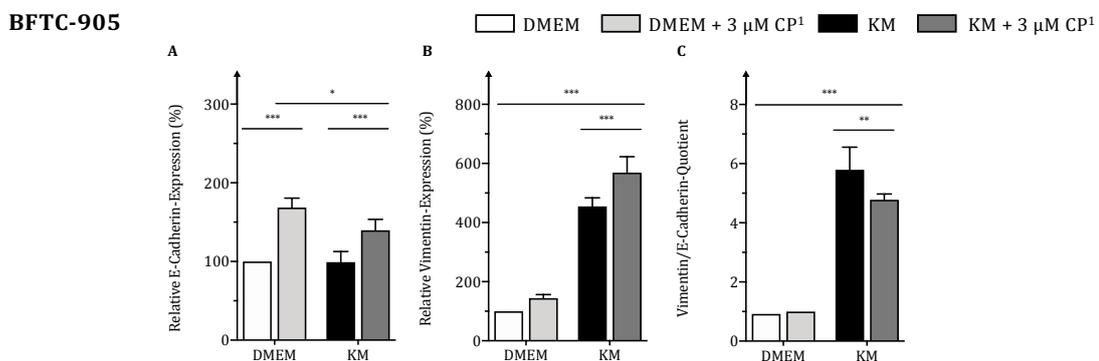


Abb. 35: Einfluss von KM und Cisplatin¹ auf den zellulären Phänotyp von BFTC-905. Abgebildet sind die Ergebnisse der Expressionsanalysen für E-Cadherin (A) und Vimentin (B). Als Effektmaß wurde der jeweilige Vimentin/E-Cadherin-Quotient gebildet (C). Es ist erkennbar, dass die Vorkonditionierung der BFTC-905-Zellen mit KM eine EMT induzierte, die durch Cisplatin leicht reduziert wurde. Der abgebildete Mittelwert + SD (n = 3, 3 technische Replikate) jeder Gruppe wurde auf die DMEM-Kontrolle ohne Cisplatin normiert.

Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten UCC gestaltete sich die Analyse der mRNA-Expression von E-Cadherin für die UMUC-3-Zellen problematisch. Wie zuvor erwähnt kennzeichnet sich diese UCC durch einen mesenchymalen Phänotyp und weist dementsprechend ein sehr niedriges E-Cadherin-Expressionsniveau auf. Dies führte dazu, dass nach der zusätzlichen Behandlung mit Cisplatin keine aussagekräftige E-Cadherin-Expression mehr detektiert werden konnte. Daher wurde für die UMUC-3-Zellen als Alternative zu E-Cadherin die mRNA-Expression von ZEB-1 bestimmt. Bei ZEB-1 handelt es

sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Expression von E-Cadherin herunterreguliert und dessen Anstieg ähnlich wie von Vimentin eine EMT-Induktion anzeigt (Abb. 5) [95]. Zusammengefasst werden die Ergebnisse für UMUC-3 in Abb. 36 (A, B). Ohne Cisplatin-Zusatz exprimierten die UMUC-3-Zellen nach der Vorkonditionierung im KM signifikant mehr ZEB-1 im Vergleich zur DMEM-Kontrolle (A). Das Expressionsniveau stieg dabei um 70 % an ($p \leq 0,01$). Auch wenn die Vimentin-Expression unbeeinflusst von den löslichen Faktoren des KM blieb, entsprach dies einer Verstärkung mesenchymaler Eigenschaften der UMUC-3-Zellen (B). Bei gleichzeitiger Cisplatin-Behandlung war zwar eine tendenzielle Zunahme der ZEB-1-Expression in DMEM zu beobachten, diese stellte sich allerdings als nicht signifikant heraus (A). Im Unterschied hierzu bewirkte der Cisplatin-Zusatz zu den UMUC-3-Zellen sowohl in DMEM als auch in KM eine signifikante Verdopplung der Vimentin-Expression (B, $p \leq 0,01$). Zusammenfassend schien somit auch die Cisplatin-Behandlung die mesenchymalen Eigenschaften der UMUC-3 zu fördern.

UMUC-3

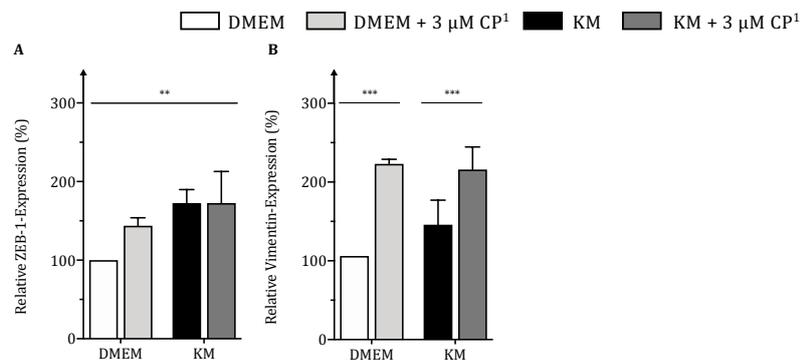


Abb. 36: Einfluss von KM und Cisplatin¹ auf den zellulären Phänotyp von UMUC-3. Abgebildet sind die Ergebnisse der Expressionsanalysen für ZEB-1 (A) und Vimentin (B). Es wurde eine partielle Verstärkung mesenchymaler Eigenschaften der UMUC-3-Zellen durch KM und Cisplatin nachgewiesen. Der abgebildete Mittelwert + SD ($n = 3$, 3 technische Replikate) jeder Gruppe wurde auf die DMEM-Kontrolle ohne Cisplatin normiert.

Ähnlich wie für die Zelllinie BFTC-905, konnten die E-Cadherin-mRNA-Analysen von VMCUB-1 erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 37, A-C). Die Vorkonditionierung der VMCUB-1-Zellen im KM ohne Zugabe von Cisplatin modulierte die E-Cadherin-Expression kaum. Im Vergleich hierzu exprimierten die Zellen nach der Inkubation mit KM ca. 60 % weniger Vimentin als die DMEM-Kontrolle ($p \leq 0,001$). Dies schlug sich in einer signifikanten Reduktion des Vimentin/E-Cadherin-Quotienten nieder, was entsprechend als Abnahme mesenchymaler Eigenschaften der VMCUB-1-Zellen durch das KM gewertet wurde. Die Wirkung der Cisplatin-Therapie bestand ebenfalls in einer Reduktion mesenchymaler Charakteristika, da der Cisplatin-Zusatz zu einer Senkung der Vimentin-Expression um 45 % führte. Dieser MET-induzierende Effekt durch Cisplatin bestand nur für die VMCUB-1-Zellen in DMEM ($p \leq 0,001$). Im KM schien der Effekt des Cisplatin hingegen aufgehoben zu sein. Durch die Zusammenführung der Beobachtungen im

Vimentin/E-Cadherin-Quotienten wird deutlich, dass auch die Abnahme der mesenchymalen Eigenschaften durch Cisplatin signifikant war.

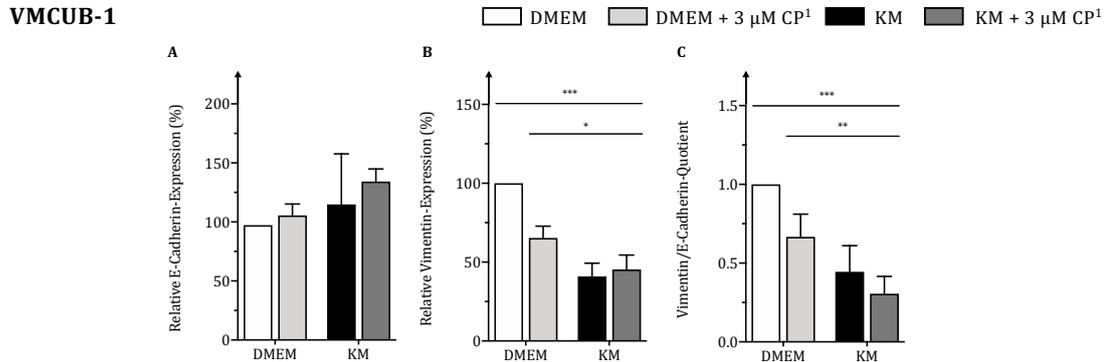


Abb. 37: Einfluss von KM und Cisplatin¹ auf den zellulären Phänotyp von VMCUB-1. Dargestellt werden die Ergebnisse der Expressionsanalysen für E-Cadherin (A) und Vimentin (B). Als Effektmaß wurde zudem der jeweilige Vimentin/E-Cadherin-Quotient gebildet (C). Es ist erkennbar, dass die Vorkonditionierung der VMCUB-1-Zellen mit KM eine MET induzierte. Der abgebildete Mittelwert + SD (n = 3, 3 technische Replikate) jeder Gruppe wurde auf die DMEM-Kontrolle ohne Cisplatin normiert.

Zusammengefasst demonstrieren die Ergebnisse, dass sich die löslichen Mediatoren der MSC im KM in Abhängigkeit der untersuchten UCC entweder auf mesenchymale (BFTC-905, UMUC-3) oder epitheliale (VMCUB-1) Eigenschaften fördernd auswirkten. Diese Beobachtungen wurden im nächsten Schritt auf Proteinebene verifiziert.

4.2.8.3 Veränderungen der Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin

Um die beschriebenen Auswirkungen des KM auf die E-Cadherin- und Vimentin-Expression der UCC auf Proteinebene nachzuvollziehen, wurden die Zellen wie üblich vorkonditioniert (Abschnitt 3.7) und eine DMEM-Kontrolle mitgeführt. Zur Generierung biologischer Replikate wurden wie immer unterschiedliche KM-Gesamtpools analysiert (Abschnitt 3.2.3). Ergänzend zur Bestimmung der Proteinexpression via Western Blot (WB) wurden die Proteine immunzytochemisch visualisiert. Hier wurde neben der Färbung von E-Cadherin und Vimentin auch eine DAPI-Färbung zur Beurteilung der Kernmorphologie durchgeführt.

Die auf Genexpressionsebene beobachtete EMT-Induktion durch die Vorkonditionierung der BFTC-905-Zellen im KM, lässt sich mit Abb. 38 (A, B) auch auf Proteinebene nachvollziehen. Während die E-Cadherin-Expression keiner signifikanten Veränderung unterlag (A), exprimierte BFTC-905 im KM 63 % mehr Vimentin im Vergleich zur DMEM-Kontrolle (B, $p \leq 0,05$).

BFTC-905

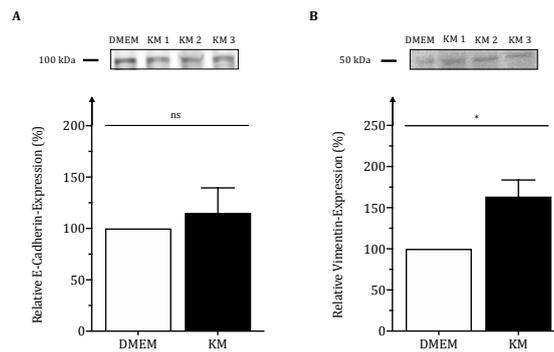


Abb. 38: Evaluation der Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin für BFTC-905 nach Vorkonditionierung mit KM. Aufgeführt ist jeweils eine repräsentative Bildaufnahme eines WB sowie die densitometrische Auswertung. Die Ergebnisse belegen, dass das KM auch auf Proteinebene keine Änderung der E-Cadherin- (A), dafür aber eine gesteigerte Vimentin-Expression (B) der Zellen vermittelte. Dargestellt wird der jeweilige Mittelwert + SD (n = 3), der auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Der beobachtete Effekt des KM auf BFTC-905 spiegelt sich auch in der immunzytochemischen Färbung von E-Cadherin und Vimentin in Abb. 39 wider (A, B). In der E-Cadherin-Färbung ließ sich kein eindeutiger Unterschied feststellen (A). Dagegen imponierte die Vimentin-Färbung im KM deutlich intensiver im Vergleich zur DMEM-Kontrolle (B).

BFTC-905

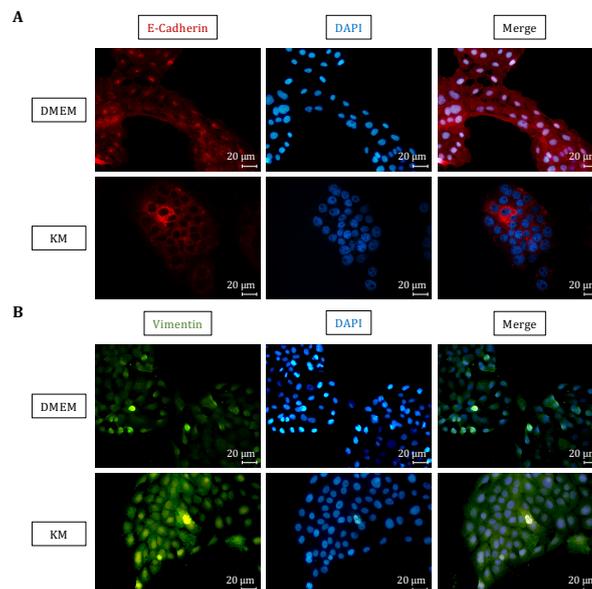


Abb. 39: BFTC-905-Fluoreszenzfärbung von E-Cadherin, Vimentin und DAPI. Repräsentative Bildausschnitte von vorkonditionierten BFTC-905-Zellen in KM bzw. DMEM, gefärbt mit E-Cadherin, Vimentin und DAPI sowie zusätzlicher Merge-Darstellung. Im KM zeigte sich eine deutliche Zunahme der Intensität der Vimentin-Färbung. 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken 20 μm . Merge = Überlagerung aus E-Cadherin/Vimentin und DAPI.

Die densitometrische Auswertung in Abb. 40 (A) belegt eine signifikante Reduktion der Proteinexpression von E-Cadherin um 10 % nach der Inkubation der UMUC-3-Zellen in KM ($p \leq 0,05$). Die Proteinexpression von Vimentin blieb hingegen unbeeinflusst vom verwendeten Zellkulturmedium (B).

UMUC-3

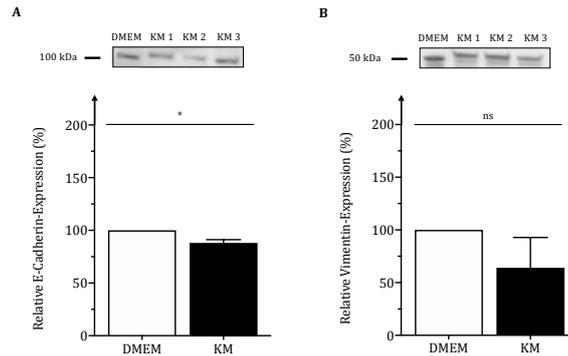


Abb. 40: Evaluation der Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin für UMUC-3 nach Vorkonditionierung mit KM. Aufgeführt ist jeweils eine repräsentative Bildaufnahme eines WB sowie die densitometrische Auswertung. Die Ergebnisse ließen eine minimale Verringerung der E-Cadherin- (A) und keine signifikante Änderung der Vimentin-Expression (B) durch die Behandlung der Zellen mit KM erkennen. Dargestellt wird der jeweilige Mittelwert + SD (n = 3), der auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Die in Abb. 40 dargestellten Ergebnisse für Analyse der E-Cadherin- und Vimentin-Expression von UMUC-3 ließen sich fluoreszenzmikroskopisch nicht bestätigen (Abb. 41). Allerdings stellte sich die E-Cadherin-Färbung insgesamt nur sehr schwach dar. In Kongruenz zum mesenchymalen Phänotyp dieser UCC wies die Vimentin-Färbung in beiden Zellkulturmedien eine hohe Farbintensität auf.

UMUC-3

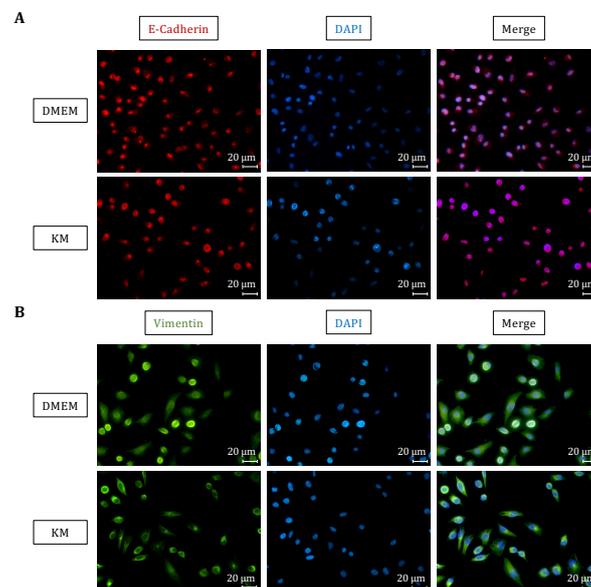


Abb. 41: UMUC-3-Fluoreszenzfärbung von E-Cadherin, Vimentin und DAPI. Repräsentative Bildausschnitte von vorkonditionierten UMUC-3-Zellen in KM bzw. DMEM, gefärbt mit E-Cadherin, Vimentin und DAPI sowie zusätzlicher Merge-Darstellung. Es waren keine eindeutigen Auswirkungen des KM auf die UMUC-3 erkennbar. 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken 20 μ m. Merge = Überlagerung aus E-Cadherin/Vimentin und DAPI.

Wie sich Abb. 42 (A, B) entnehmen lässt, konnte auch für VMCUB-1 der auf mRNA-Ebene beobachtete fördernde Effekt des KM auf die epithelialen Eigenschaften dieser UCC bestätigt werden (Abschnitt 4.2.8.2). Erwähnenswert ist, dass auf Proteinebene nach der Inkubation mit KM nicht nur eine signifikante Senkung der Vimentin-Expression (B) um 75 % zu beobachten war, sondern gleichzeitig das Expressionsniveau von E-Cadherin (A)

um 75 % anstieg ($p \leq 0,01$). Der zuletzt genannte Effekt war in den mRNA-Analysen auf Grund einer hohen Variabilität zwischen den analysierten biologischen Replikaten nicht erkennbar (Abb. 37), unterstützt aber zusätzlich den MET-induzierenden Effekt des KM auf die VMCUB-1-Zellen.

VMCUB-1

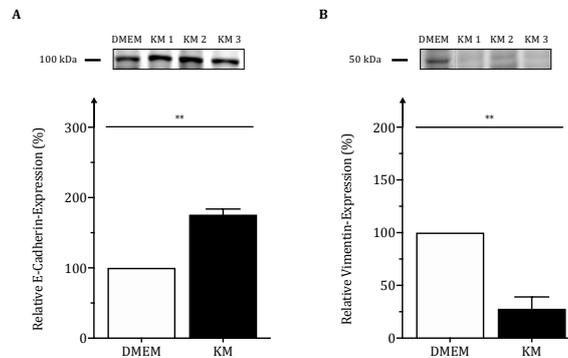


Abb. 42: Evaluation der Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin für VMCUB-1 nach Vorkonditionierung mit KM. Aufgeführt ist jeweils eine repräsentative Bildaufnahme eines WB sowie die densitometrische Auswertung. Die Ergebnisse belegen, dass die Vorkonditionierung der Zellen mit KM eine Betonung epithelialer Eigenschaften in Form einer erhöhten E-Cadherin- (A) bei zugleich erniedrigter Vimentin-Expression (B) bewirkte. Dargestellt wird der jeweilige Mittelwert + SD ($n = 3$), der auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Bestätigt wurden die beobachteten Veränderungen der Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin der VMCUB-1-Zellen mit den Immunfluoreszenzaufnahmen in Abb. 43 (A-B). Die E-Cadherin-Färbung präsentierte sich im KM deutlich intensiver als in der DMEM-Kontrolle (A). Umgekehrt waren im KM weniger immunfluoreszierende Zellen in der Vimentin-Färbung zu erkennen (B).

VMCUB-1

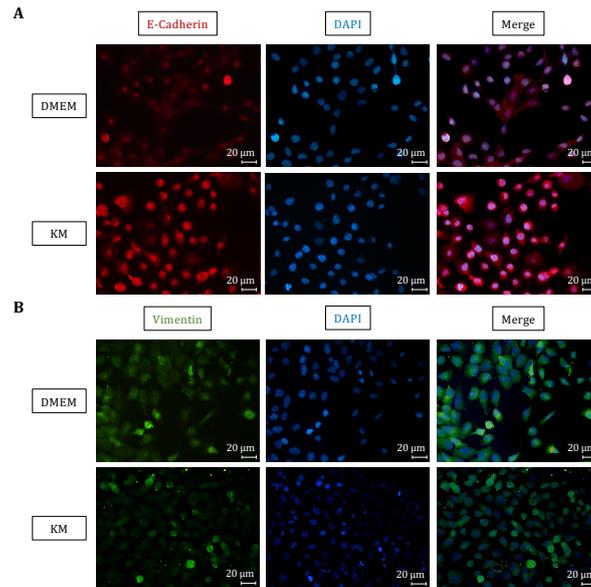


Abb. 43: VMCUB-1-Fluoreszenzfärbung von E-Cadherin, Vimentin und DAPI. Repräsentative Bildausschnitte von vorkonditionierten VMCUB-1-Zellen in KM bzw. DMEM, gefärbt mit E-Cadherin, Vimentin und DAPI sowie zusätzlicher Merge-Darstellung. Es ließ sich eine Verstärkung epithelialer Charakteristika im KM in Form einer Intensitätszunahme der E-Cadherin-Färbung bei gleichzeitiger -abnahme der Vimentin-Färbung feststellen. 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken 20 µm. Merge = Überlagerung aus E-Cadherin/Vimentin und DAPI.

4.2.8.4 Veränderungen der α -SMA-Proteinexpression

Ähnlich wie Vimentin stellt α -SMA ein Protein dar, dessen Erhöhung eine Zunahme mesenchymaler Eigenschaften signalisiert [85, 93]. Auch im Zuge der α -SMA-Expressionsanalysen wurden UCC mit KM vorkonditioniert und mit einer DMEM-Kontrolle verglichen.

Die Ergebnisse der WB-Analyse von α -SMA unterstützen die zuvor nachgewiesene EMT-induzierende Wirkung des KM auf die BFTC-905-Zellen (Abb. 44). Im Vergleich zur DMEM-Kontrolle exprimierten die Zellen im KM nahezu doppelt so viel α -SMA ($p \leq 0,01$).

BFTC-905

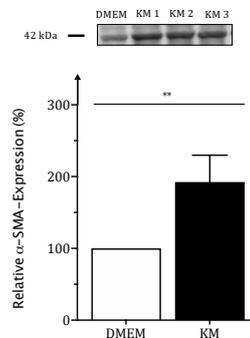


Abb. 44: Evaluation der Proteinexpression von α -SMA für BFTC-905 nach Vorkonditionierung mit KM. Abgebildet ist eine repräsentative Bildaufnahme eines WB sowie die densitometrische Auswertung. Die EMT-induzierende Wirkung des KM auf die BFTC-905-Zellen spiegelte sich in einer erhöhten α -SMA-Expression wider. Dargestellt wird der Mittelwert + SD ($n = 6$) der aus den Einzelwerten der analysierten biologischen Replikate gebildet und auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Für die UMUC-3-Zellen konnte zwar keine Veränderung der α -SMA-Proteinexpression detektiert werden, dies bestätigte jedoch die bereits beschriebenen Ergebnisse zum Einfluss des KM auf den zellulären Phänotyp (Abb. 45).

UMUC-3

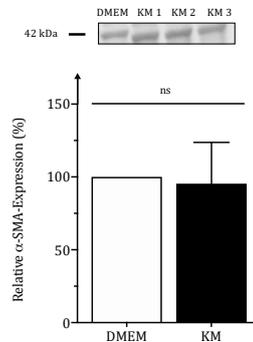


Abb. 45: Evaluation der Proteinexpression von α -SMA für UMUC-3 nach Vorkonditionierung mit KM. Abgebildet ist eine repräsentative Bildaufnahme eines WB sowie die densitometrische Auswertung. Das KM bewirkte keine signifikante Veränderung der α -SMA-Expression. Dargestellt wird der Mittelwert + SD (n = 6) der aus den Einzelwerten der analysierten biologischen Replikate gebildet und auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Alleinig für die VMCUB-1-Zellen ergab die Detektion der α -SMA-Expression konträre Ergebnisse zu den bisherigen Untersuchungen des zellulären Phänotyps. Bis dato wurde durch die Vorkonditionierung mit KM eine Verstärkung epithelialer Eigenschaften dieser UCC erzielt (Abschnitte 4.2.8.2 und 4.2.8.3). Allerdings lässt sich Abb. 46 entnehmen, dass in diesem Versuchsansatz die Proteinexpression des mesenchymalen Markers α -SMA nach der Kultivierung in KM um 45 % anstieg ($p \leq 0,001$).

VMCUB-1

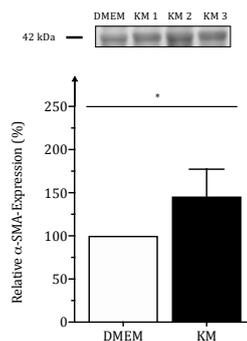


Abb. 46: Evaluation der Proteinexpression von α -SMA für VMCUB-1 nach Vorkonditionierung mit KM. Abgebildet ist eine repräsentative Bildaufnahme eines WB sowie die densitometrische Auswertung. Interessanterweise führte die Vorkonditionierung der Zellen in KM zu einer Zunahme der α -SMA-Expression. Dargestellt wird der Mittelwert + SD (n = 6) der aus den Einzelwerten der analysierten biologischen Replikate gebildet und auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

4.2.8.5 Modulation des TGF- β -Signalwegs

Die TGF- β -Zytokinfamilie stellt einen der potentesten EMT-Induktoren fortgeschrittener Tumorstadien dar und ist somit insbesondere im Kontext der Metastasierung von

Bedeutung [58,93]. Um zu untersuchen, ob das KM eine Modulation der Aktivität der TGF- β -Signaltransduktion der UCC bewirkt, wurden zwei Komponenten des Signalwegs analysiert. Zum einen wurde die Expression von PAI-1 bestimmt. Dieses Protein wird im Rahmen der Aktivierung des TGF- β -Signalwegs vermehrt exprimiert und sekretiert (Abb. 5). Weiterhin wurde die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors SMAD4 untersucht, dessen erhöhte Expression ebenfalls für eine verstärkte Signaltransduktion von TGF- β spricht.

4.2.8.5.1 Veränderungen der PAI-1-Expression

Die Messung der PAI-1-Konzentration erfolgte in Zellkulturüberständen von UCC, die gemäß der Vorgehensweise in Tab. 17 in KM vorkonditioniert wurden (s. Abschnitt 3.7). Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde in dem zur Vorkonditionierung verwendeten KM die PAI-1-Konzentration gemessen. Verglichen wurden die Ergebnisse mit der PAI-1-Konzentration aus den Überständen von UCC, die parallel in DMEM inkubiert wurden.

Aus Abb. 47 wird deutlich, dass nach der Kultivierung der BFTC-905-Zellen in KM signifikant mehr PAI-1 im Überstand nachgewiesen werden konnte als in der DMEM-Kontrolle. Die relative PAI-1-Konzentration stieg in diesem Zusammenhang um das 3,3-fache an ($p \leq 0,01$). Diese Beobachtung wurde als Hinweis auf eine verstärkte Aktivierung des TGF- β -Signalwegs gewertet.

BFTC-905

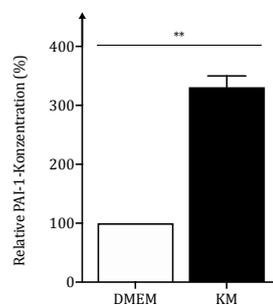


Abb. 47: Bestimmung der PAI-1-Konzentration in Zellkulturüberständen für BFTC-905 nach der Vorkonditionierung mit KM. In den KM-Überständen ließ sich nach Inkubation der Zellen signifikant mehr PAI-1 detektieren als nach der Kultivierung in DMEM. Dargestellt ist der Mittelwert + SD ($n = 3$, 3 technische Replikate), der auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Eine aktivierende Wirkung auf die TGF- β -Signaltransduktion konnte auch für die Zelllinie UMUC-3 nach der Inkubation mit KM detektiert werden (Abb. 48). Die KM-Überstände wiesen im Vergleich zu den Tumorzellen in DMEM eine signifikante, doppelt so hohe PAI-1-Konzentration auf ($p \leq 0,001$).

UMUC-3

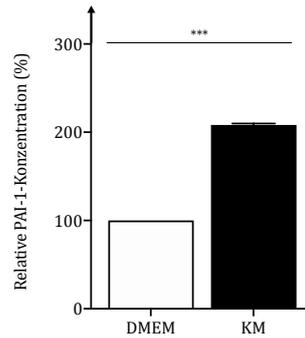


Abb. 48: Bestimmung der PAI-1-Konzentration in Zellkulturüberständen für UMUC-3 nach der Vorkonditionierung mit KM. In den KM-Überständen ließ sich nach Inkubation der Zellen signifikant mehr PAI-1 detektieren als nach der Kultivierung in DMEM. Abgebildet ist der Mittelwert + SD (n = 3, 3 technische Replikate), der auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Der größte Effekt der Inkubation mit KM auf die PAI-1-Konzentration war für VMCUB-1 zu erkennen (Abb. 49). Die relative Konzentration von PAI-1 war nach Abschluss der Vorkonditionierung in den KM-Überständen 5,5-fach so hoch wie in DMEM ($p \leq 0,01$).

VMCUB-1

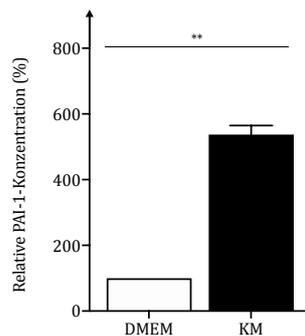


Abb. 49: Bestimmung der PAI-1-Konzentration in Zellkulturüberständen für VMCUB-1 nach der Vorkonditionierung mit KM. In den KM-Überständen ließ sich nach Inkubation der Zellen signifikant mehr PAI-1 detektieren als nach der Kultivierung in DMEM. Abgebildet ist der Mittelwert + SD (n = 3, 3 technische Replikate), der auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

4.2.8.5.2 Veränderungen der Proteinexpression von SMAD4

Eine Aktivierung des TGF- β -Signalwegs resultiert neben einer Erhöhung von PAI-1 auch in einer Zunahme des Transkriptionsfaktors SMAD4 [96]. Als Ergänzung zu den PAI-1-Analysen wurde daher die Proteinexpression von SMAD4 von vorkonditionierten UCC in KM ermittelt und in Referenz zu einer DMEM-Kontrolle analysiert.

Abb. 50 unterstützt die bisher nachgewiesene aktivierende Wirkung der löslichen Faktoren der MSC auf den TGF- β -Signalweg von BFTC-905, da das SMAD4-Niveau der Zellen im KM um das 3,3-fache höher lag als in der DMEM-Kontrolle ($p \leq 0,01$).

BFTC-905

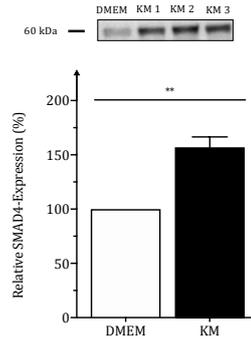


Abb. 50: Evaluation der SMAD4-Proteinexpression für BFTC-905 nach Vorkonditionierung mit KM. Abgebildet ist eine repräsentative Bildaufnahme eines WB sowie die densitometrische Auswertung. Nach der Vorkonditionierung im KM exprimierten die Zellen signifikant mehr SMAD4. Dargestellt wird der Mittelwert + SD (n = 3), der aus den Einzelwerten der analysierten biologischen Replikate gebildet und auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Für die UMUC-3-Zellen gelang kein weiterer Nachweis einer aktivierenden Wirkung des KM auf die TGF- β -Signalkaskade, da keine signifikante Veränderung der Proteinexpression von SMAD4 zwischen den vorkonditionierten Zellen in KM und der DMEM-Kontrolle demonstriert werden konnte (Abb. 51).

UMUC-3

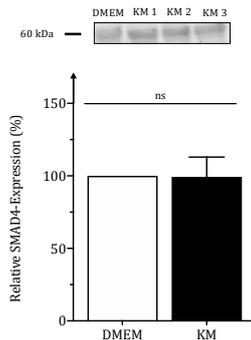


Abb. 51: Evaluation der SMAD4-Proteinexpression für UMUC-3 nach Vorkonditionierung mit KM. Abgebildet ist eine repräsentative Bildaufnahme eines WB sowie die densitometrische Auswertung. Es konnte keine Veränderung der Proteinexpression von SMAD4 durch die Inkubation der Zellen mit KM detektiert werden. Dargestellt wird der Mittelwert + SD (n = 3), der aus den Einzelwerten der analysierten biologischen Replikate gebildet und auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

Ähnlich wie für UMUC-3 konnte auch für die UCC VMCUB-1 nach der Inkubation mit KM kein adäquater Nachweis eines veränderten Expressionsniveaus für SMAD4 gemessen werden (Abb. 52). Zwischen den unterschiedlichen biologischen Replikaten wurde allerdings eine auffällig große Streubreite detektiert, die sich in einer hohen Standardabweichung widerspiegelte.

VMCUB-1

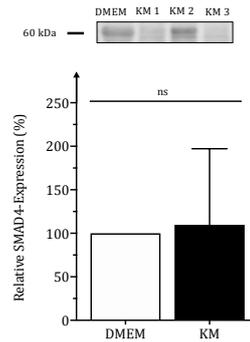


Abb. 52: Evaluation der SMAD4-Proteinexpression für VMCUB-1 nach Vorkonditionierung mit KM. Abgebildet ist eine repräsentative Bildaufnahme eines WB sowie die densitometrische Auswertung. Es konnte keine Veränderung der Proteinexpression von SMAD4 durch die Inkubation der Zellen mit KM detektiert werden. Dargestellt wird der Mittelwert + SD (n = 3) der aus den Einzelwerten der analysierten biologischen Replikate gebildet und auf die DMEM-Kontrolle normiert wurde.

4.2.9 Einfluss von KM auf die Metastasierung

Die verschiedenen Untersuchungen zum Einfluss des KM auf den zellulären Phänotyp der UCC (Abschnitt 4.2.8) und die Expressionsanalysen von CD44 (Abschnitt 4.2.7.2) stehen im engen inhaltlichen Zusammenhang mit dem zellulären Potential zu metastasieren [90]. Im vorliegenden Kapitel werden die Ergebnisse weiterführender Untersuchungen im Kontext der Metastasierung zusammengefasst.

4.2.9.1 Veränderungen der Proteinexpression von CXCR-4

Nachgewiesenermaßen ist die Expression des CXCR-4-Rezeptors sowie dessen Interaktion mit dem bisher einzig bekannten Liganden CXCL-12 im Gewebe primärer UC der Harnblase insbesondere mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Metastasierung assoziiert (Abschnitt 1.1.3.5) [101, 132]. Mit Hilfe der Bestimmung der Gesamt-Proteinexpression via WB- und durchflusszytometrischen Analysen der Oberflächenexpression wurde daher untersucht, ob die Vorkonditionierung der UCC mit KM in einer Änderung der CXCR-4-Expression resultierte.

In Abhängigkeit der angewandten Methode ergaben sich für BFTC-905 unterschiedliche Ergebnisse für den Vergleich der Zellen im KM mit der DMEM-Kontrolle (Abb. 53; A, B). In der WB-Analyse wurde für die Zellen im KM eine Anhebung des Expressionsniveaus von CXCR-4 um 35 % erfasst (A, $p \leq 0,05$). Durchflusszytometrisch wurde hingegen nur eine tendenzielle Steigerung der Proteinexpression von CXCR-4 nach der Inkubation mit KM registriert (B).

BFTC-905

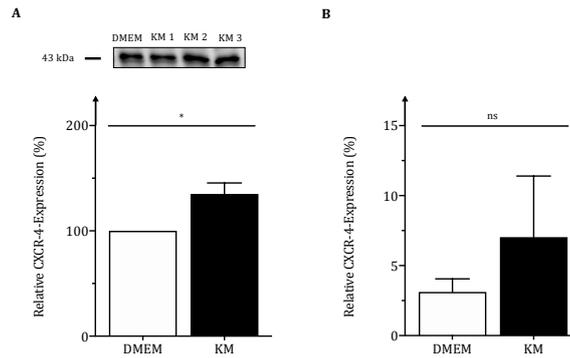


Abb. 53: Evaluation der Proteinexpression von CXCR-4 für BFTC-905 nach Vorkonditionierung mit KM. Aufgeführt ist eine repräsentative Bildaufnahme eines WB sowie die densitometrische Auswertung (A) und die Ergebnisse der FACS-Analyse (B). In der WB-Analyse wurde eine erhöhte CXCR-4-Proteinexpression der UCC im KM gemessen. Aufgeführt ist der jeweilige Mittelwert + SD (A: n = 3, B: n = 8). Im Falle der WB-Analyse wurde die DMEM-Kontrolle zur Normierung genutzt.

Abb. 54 (A, B) demonstriert, dass für UMUC-3 mit keiner der angewandten Methoden ein signifikanter Unterschied zwischen den eingesetzten Zellkulturmedien registriert werden konnte.

UMUC-3

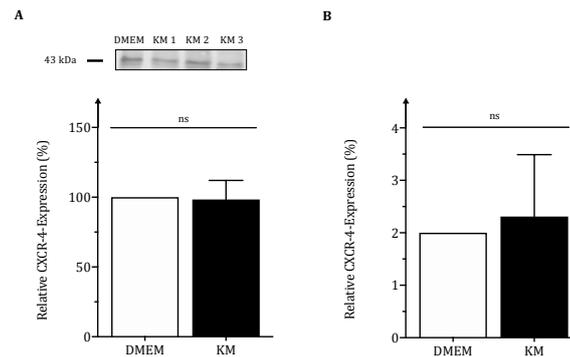


Abb. 54: Evaluation der Proteinexpression von CXCR-4 für UMUC-3 nach Vorkonditionierung mit KM. Aufgeführt ist eine repräsentative Bildaufnahme eines WB sowie die densitometrische Auswertung (A) und die Ergebnisse der FACS-Analyse (B). Es wurde keine signifikante Änderung der Proteinexpression von CXCR-4 festgestellt. Aufgeführt ist der jeweilige Mittelwert + SD (A: n = 3, B: n = 3). Im Falle der WB-Analyse wurde die DMEM-Kontrolle zur Normierung genutzt.

Für die UCC VMCUB-1 konnte nur eine tendenzielle Zunahme der CXCR-4-Expression nach der Kultivierung im KM festgestellt werden (Abb. 55; A, B).

VMCUB-1

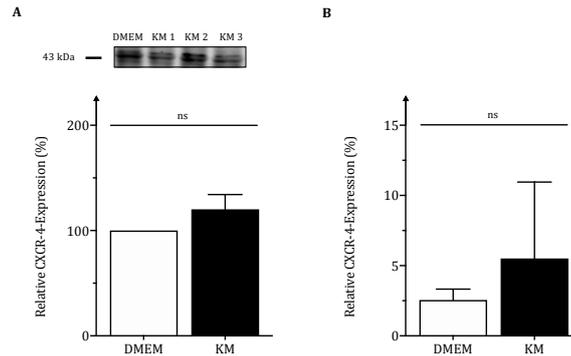


Abb. 55: Evaluation der Proteinexpression von CXCR-4 für VMCUB-1 nach Vorkonditionierung mit KM. Aufgeführt ist eine repräsentative Bildaufnahme eines WB sowie die densitometrische Auswertung (A) und die Ergebnisse der FACS-Analyse (B). Es wurde keine signifikante Änderung der Proteinexpression von CXCR-4 festgestellt. Dargestellt wird der jeweilige Mittelwert + SD (A: n = 3, B: n = 8). Im Falle der WB-Analyse wurde die DMEM-Kontrolle zur Normierung genutzt.

Beim Vergleich der durchflusszytometrischen Resultate der untersuchten UCC fällt auf, dass die Messergebnisse der einzelnen biologischen Replikate variierten, auch wenn sie eine ähnliche Tendenz wie die Ergebnisse der WB-Analyse zeigten.

4.2.10 Effekte von KM auf den zellulären Immunphänotyp

Abschließend werden die Ergebnisse der Untersuchungen zum zellulären Immunphänotyp der UCC vorgestellt. Mit Hilfe der Expression von PD-L1 und PD-L2 entziehen sich maligne Zellen der antitumoralen Wirkung von T-Zellen (Abschnitt 1.1.3.6) [107]. Um den Einfluss des KM auf den Immunphänotyp der UCC nachzuvollziehen, wurde die Expression von PD-L1 und PD-L2 von vorkonditionierten Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Eine erhöhte Expression der genannten Proteine wurde als verstärkte Immunevasion der Tumorzellen gewertet.

Aus Abb. 56 (A, B) lässt sich schließen, dass die Zelllinie BFTC-905 nach der Inkubation mit KM tendenziell mehr PD-L1 (A) und PD-L2 (B) auf ihrer Zelloberfläche exprimierte. Die Ergebnisse stellten sich jedoch als nicht signifikant heraus.

BFTC-905

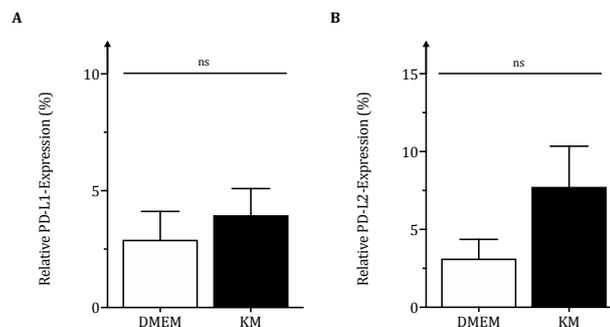


Abb. 56: PD-L1- und PD-L2-Proteinexpression für BFTC-905 nach Vorkonditionierung mit KM. Die Kultivierung der Zellen in KM wirkte sich nicht signifikant auf das Expressionsniveau von PD-L1 (A) und PD-L2 (B) aus. Aufgeführt ist der jeweilige Mittelwert + SD (n = 8).

Die Inkubation der UMUC-3-Zellen mit KM resultierte ebenfalls in keiner statistisch relevanten Veränderung der Expression von PD-L1 und PD-L2 (Abb. 57; A, B).

UMUC-3

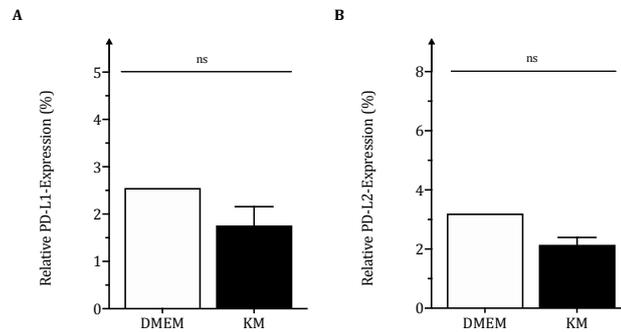


Abb. 57: PD-L1- und PD-L2-Proteinexpression für UMUC-3 nach Vorkonditionierung mit KM. Die Kultivierung der Zellen in KM wirkte sich nicht signifikant auf das Expressionsniveau von PD-L1 (A) und PD-L2 (B) aus. Aufgeführt ist der jeweilige Mittelwert + SD (n = 3).

Auch die Vorkonditionierung der Zelllinie VMCUB-1 im KM bewirkte keine relevante Änderung des Expressionsniveaus von PD-L1 und PD-L2 im Vergleich zur DMEM-Kontrolle (Abb. 58; A, B).

VMCUB-1

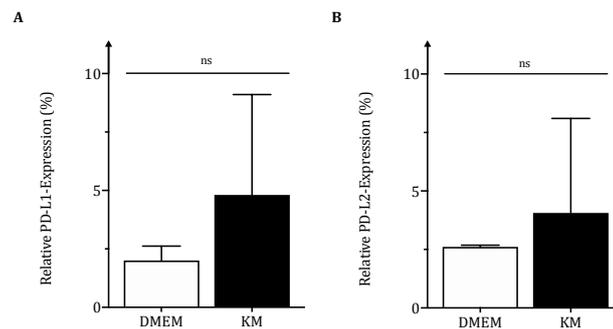


Abb. 58: PD-L1- und PD-L2-Proteinexpression für VMCUB-1 nach Vorkonditionierung mit KM. Die Inkubation der Zellen mit KM bewirkte keine signifikante Änderung der Proteinexpression von PD-L1 (A) und PD-L2 (B). Aufgeführt ist der Mittelwert + SD (n = 10).

5 Diskussion

5.1 Methodische Einschränkungen

5.1.1 Konditioniertes Medium

Der Einsatz von KM stellt eine häufig angewandte Methode zur Untersuchung der Auswirkungen parakriner Signalgebung dar [12, 13, 77]. In der vorliegenden Arbeit wurde das Zellkulturmedium aus MSC-Primärkulturen verwendet, um den Einfluss des KM auf die progressiven Eigenschaften von UCC zu analysieren. Trotz der Eleganz und der breiten Anwendung, birgt die genannte Methode Limitationen, die ihre Aussagekraft einschränken und in der Betrachtung etwaiger Ergebnisse berücksichtigt werden sollten. Einige dieser Schwachpunkte ließen sich bereits im Kontext der Herstellung des KM, das für diese Arbeit verwendet wurde, minimieren. Um potenzielle Schwankungen durch Inter-Donor- und Inter-Passagen-Variabilität auszugleichen, wurde nicht das native KM eines einzigen Spenders verwendet, sondern ein KM-Gesamtpool aus 6 individuellen biologischen Spendern und 6 unterschiedlichen Passagen erstellt (Abschnitt 3.2.3). Zudem wurden für die Kultivierung der MSC und die Gewinnung des KM standardisierte Rahmenbedingungen geschaffen, wobei spezifische Wachstumscharakteristika von Primärkulturen in die Überlegungen einbezogen wurden. Die Eingrenzung der verwendeten Passagen erfolgte bspw. vor dem Hintergrund, dass frisch isolierte Primärkulturen initial häufig einen noch heterogenen Phänotyp besitzen und sich *in vitro* erst an die Zellkulturbedingungen assimilieren müssen [133, 134]. Ältere Primärkulturen verfügen hingegen über einen homogenen Phänotyp, weisen aber häufig Veränderungen in Form einer reduzierten Zellteilungsrate und Erscheinungen der zellulären Seneszenz auf [135, 136]. Um ein möglichst repräsentatives Bild der Wirkung der MSC zu generieren, wurde das KM daher ausschließlich aus Kulturen in P3 bis P8 bezogen. Neben der Eingrenzung der Passagen erfolgte auch die Aussaat der MSC für die Gewinnung des KM in einer etablierten Zellzahl, wodurch eine gleichmäßige Konditionierung des Mediums erzielt werden sollte (Abschnitt 3.2.2). Die Zellzahl wurde dabei so gewählt, dass die Zellen optimal proliferieren konnten, ohne durch eine zu niedrige oder zu hohe Zelldichte in ihrem Wachstum kompromittiert zu werden [133].

Auch wenn durch die beschriebene Vorgehensweise einige potenzielle Schwachstellen des KM reduziert werden konnten, blieben andere Einschränkungen bestehen. Diese betreffen insbesondere die Nährstoffkonstitution. Da das KM bereits für die Kultivierung der MSC eingesetzt wurde, ergab sich hieraus die Fragestellung, ob die notwendigen Nährstoffe zu verbraucht waren, um den Bedarf der UCC zu decken. In den entsprechenden Untersuchungen konnte für die Kultivierung von BFTC-905 und VMCUB-1 ein

Nährstoffmangel ausgeschlossen werden, wohingegen für die UMUC-3-Zellen eine Restriktion der proliferativen Kapazität im KM nachgewiesen wurde. Der vermutete Nährstoffmangel muss in die Betrachtung der Ergebnisse der UMUC-3-Zellen einbezogen werden, da durch diesen nachweislich die Tumorprogression beeinflusst werden kann [39, 137, 138]. U. a. ist eine Nährstoffrestriktion mit einem veränderten Sekretom, einer reduzierten migratorischen Kapazität und einer EMT-Induktion von Zelllinien aus Mamma-Karzinomen assoziiert [138].

Auch die gewählte Isolierungsquelle für die primären MSC, deren Kulturen zur Gewinnung des KM genutzt wurden, schränkt die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Arbeit ein. Denn inzwischen gilt es als gesichert, dass sich die Eigenschaften und die Wirkung der MSC in der direkten Tumorumgebung durch den ständigen Austausch mit den neoplastischen Zellen im Laufe des Tumorfortschritts verändern [41, 42]. Aus diesem Prozess gehen pathologisch modifizierte CA-MSC hervor, die nachweislich über ein verändertes Sekretom sowie ein breiteres Differenzierungsspektrum verfügen und einen stärkeren progressionsfördernden Effekt auf Tumorzellen ausüben, als MSC aus tumorfernen Geweben [16, 42, 48]. Da die MSC-Primärkulturen dieser Arbeit jedoch mit Zellen generiert wurden, die dem subkutanen Fettgewebe von Bauchdeckenpräparaten entstammten, sind diese MSC nicht in Kontakt mit den Tumorzellen eines muskelinvasiven UC der Harnblase gekommen. Folglich wäre es sinnvoll zukünftig den parakrinen Einfluss von CA-MSC auf UCC zu analysieren, um die bisherigen Ergebnisse zu vervollständigen. Die dynamische Interaktion zwischen UCC und MSC könnte z. B. durch direkte Co-Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitraum realisiert werden [6, 42].

Der Einsatz von Co-Kulturen könnte zugleich eine weitere Einschränkung der Verwendung von KM kompensieren, denn durch die gemeinsame Kultivierung könnten nicht nur Aspekte der parakrinen Signaltransduktion, sondern auch die Auswirkungen der Kommunikation über direkte interzelluläre Kontakte analysiert werden [44]. Dies wäre von Interesse, da einige progressionsfördernden Effekte nachweislich nur durch die direkte Interaktion der Zellen vermittelt werden. Takigawa et al. (2017) demonstrierten bspw., dass Tumorzellen aus kolorektalen Karzinomen nach dem direkten Kontakt mit MSC zellmorphologische Veränderungen aufwiesen, die nach der reinen Behandlung mit KM nicht auftraten [139]. Ein zusätzlicher Vorteil der direkten Co-Kultivierung von MSC und UCC wäre, dass das numerische Verhältnis aus Tumorzellen und Stammzellen realistischer gestaltet werden könnte. Während die zuvor beschriebene Vorgehensweise der Gewinnung des KM auf eine optimale Anreicherung des Mediums mit den löslichen Faktoren der MSC abzielte, ist davon auszugehen, dass die tatsächliche Konzentration der Botenstoffe innerhalb des TMM von

UC deutlich niedriger ist. Der prozentuale Anteil der MSC in der Mikroumgebung von Prostatakarzinomen umfasst bspw. lediglich 0,01-1,1 % der Gesamtzellzahl [140].

5.1.2 Die Heterogenität der MSC

Bezüglich der Isolierungsquelle der MSC dieser Arbeit sollte noch ein weiterer Aspekt bedacht werden: Nachweislich weisen selbst MSC, die nicht dem TMM eines Tumors entstammen, in Abhängigkeit von ihrem Ursprungsgewebe relevante Unterschiede auf [31, 141]. U. a. variieren die MSC verschiedener Gewebe in ihrer proliferativen Kapazität, ihrem Differenzierungspotential und ihrem mRNA-Expressionsprofil [31, 141]. Selbst die Wahl der Isolierungsmethode scheint Einfluss darauf zu nehmen, welcher MSC-Subtyp aus einem Gewebe isoliert wird [29]. Entsprechend umfasst der MSC-Begriff keine einheitliche, sondern eine heterogene Stammzellpopulation [15, 22]. Dies stellt einen möglichen Erklärungsansatz für die teils kontroversen Beobachtungen zum Einfluss der MSC auf die Aggressivität von Tumoren dar. Z. B. fanden Yang et al. (2014) in diesem Kontext heraus, dass MSC aus menschlicher Nabelschnur progressionsrelevante Eigenschaften wie die Apoptoserate der Glioblastom-Zelllinie U-251 stärker beeinflussten als MSC, die aus Fettgewebe isoliert wurden [142]. Daher ist eine Generalisation der vorliegenden Ergebnisse für MSC anderer Ursprungsgewebe nur bedingt möglich.

5.2 Einfluss der MSC auf die Aggressivität von UCC

5.2.1 Förderung der Proliferation

Für das UC der Harnblase und viele weitere Tumorentitäten stellt die Proliferationsrate einen entscheidenden Parameter der Progression dar, denn eine erhöhte Proliferation ist häufig mit einer verkürzten Überlebenszeit, einem erhöhten Rezidivrisiko und einer verschlechterten Prognose der Patienten assoziiert [43, 143, 144]. Dieser Zusammenhang betont die Relevanz der Identifizierung von Einflussfaktoren, die das Wachstum von UC regulieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die MSC der Tumorumgebung einen dieser potenziellen Einflussfaktoren repräsentieren, denn die Inkubation mit KM resultierte für alle untersuchten UCC in einer signifikant gesteigerten Zellviabilität. Dieser proliferationsfördernde Effekt ist kongruent mit den beschriebenen Auswirkungen der MSC auf andere Tumorentitäten [42, 45, 46, 112]. Für den Einfluss von MSC auf das UC der Harnblase existiert bis heute hingegen nur wenig Evidenz, die zudem auch noch heterogen ist. Erste Ergebnisse diesbezüglich wurden durch die Arbeitsgruppe von Maj et al. (2017-2019) veröffentlicht. In einer ersten Arbeit (2017) stellten sie fest, dass die Inkubation der

muskelinvasiven UCC T24 mit KM eine Hemmung der Proliferationsrate bewirkte [10]. Im Gegensatz hierzu wurde in einer Folgearbeit von 2018 demonstriert, dass die Behandlung der muskelinvasiven UCC 5637, HB-CLS-1 und HT-1376 mit KM die proliferative Kapazität nicht relevant beeinflusste [116]. Interessanterweise wurde durch die selbe Arbeitsgruppe in einer aktuelleren Untersuchung (2019) ein proliferationsfördernder Effekt von MSC-KM auf die Zellen der UCC 5637 beschrieben [57]. Für die Inkonsistenz der genannten Ergebnisse und die Abweichungen zu den Beobachtungen dieser Arbeit kommen verschiedene Erklärungsansätze in Betracht. Zuerst gilt es die jeweilige Isolierungsquelle der verwendeten MSC zu berücksichtigen. Während die vorliegende Arbeit subkutanes Fettgewebe aus Bauchdeckenpräparaten nutzte, wurde das KM in der Arbeit von Maj et al. (2017) aus Primärkulturen von MSC gewonnen, die aus Liposuktionspräparaten isoliert wurden [10]. In den nachfolgenden Arbeiten wurde nicht mehr auf primäre MSC zurückgegriffen, stattdessen wurden immortalisierte ASC52telo-Zellen verwendet [57, 116]. Die Vergleichbarkeit der Wirkung primärer MSC mit den immortalisierten ASC52telo-Zellen bleibt fraglich [145]. Weitere Erklärungsansätze für die inkonsistenten Beobachtungen könnten methodische Unterschiede in der Herstellung des KM sowie die jeweils unterschiedlichen untersuchten UCC darstellen [10, 57, 116].

Die Ergebnisse demonstrieren, dass es unbedingt weiterer Untersuchungen zum Einfluss von MSC auf die Proliferation von UCC bedarf. Insbesondere sollte weiterführend analysiert werden, welche Mediatoren der MSC den in dieser Arbeit nachgewiesenen proliferationsfördernden Effekt vermitteln. Für andere Tumorarten konnte gezeigt werden, dass MSC u. a. einen immortalisierenden Effekt auf Tumorzellen ausüben, den Zellzyklus der malignen Zellen beeinflussen oder proangiogenetisch wirken, so dass die Tumolvaskularisation verdichtet und die Zellteilungsrate erhöht wird [39, 48, 146]. Weiterhin sollte differenzierter erforscht werden, ob MSC gezielt die Proliferation spezifischer zellulärer Subtypen von UC fördern, wie bspw. die progressionsrelevante CSC-Population [57].

5.2.2 Erhöhung der Cisplatin-Resistenz

Eine häufige klinische Komplikation in der Therapie des UC der Harnblase besteht in einem geringen Ansprechen auf verfügbare Chemotherapeutika auf Grund einer hohen Resistenzrate [147]. Seit Jahren stellt das Alkylanz Cisplatin einen festen Bestandteil dieser Therapie dar, doch selbst für dieses potente Zytostatikum ist die Ansprechrate der Patienten mit 30-40 % gering [147, 148]. Die Beobachtung, dass MSC der lokalen Tumorumgebung über die Fähigkeit verfügen die Resistenz verschiedener Tumore gegenüber Cisplatin zu erhöhen, ist daher von höchster klinischer Relevanz [36, 111, 114]. U. a.

beobachteten Wen et al. (2017) für Ovarialkarzinom-Zelllinien nach der Inkubation mit KM und Cisplatin eine erhöhte Zellviabilität sowie eine reduzierte Anzahl apoptotischer Zellen und eine verringerte intrazelluläre Akkumulation des Pharmakons [36]. Der Einfluss von MSC auf die Therapieresistenz von UC gegenüber der Behandlung mit Cisplatin ist derweil noch unklar. Lediglich für die muskelinvasive UCC T24 konnte eine resistenzfördernde Wirkung durch KM gegenüber dem Antibiotikum Ciprofloxacin registriert werden [10]. Auch wenn eine zytostatische Wirkung von Ciprofloxacin auf UCC beschrieben wurde, ist die klinische Aussagekraft dieses Ergebnisses begrenzt, da der Wirkstoff kein Bestandteil der etablierten Chemotherapie-Regime ist [149].

Um die bisher begrenzten Erkenntnisse zu erweitern, wurde in der vorliegenden Arbeit daher der Einfluss von KM auf die Resistenzeigenschaften der UCC ermittelt. Überraschenderweise wiesen alle untersuchten UCC nach der Inkubation mit KM eine signifikant höhere Zellviabilität im Zuge der in-vitro-Behandlung mit Cisplatin im Vergleich zu DMEM-Kontrolle auf. Für BFTC-905 und UMUC-3 war der resistenzfördernde Effekt über ein breites Spektrum an Cisplatin-Konzentrationen nachzuweisen. Für VMCUB-1 hingegen wirkte sich das KM nur für die Konzentrationen von 0,4 μM und 1 μM Cisplatin signifikant aus. In den Resistenzanalysen wurde das untersuchte Konzentrationsspektrum gezielt breit gewählt, da eine realistische Gewebekonzentration von Cisplatin im Rahmen einer Chemotherapie nur schwer abzuschätzen ist. Diese ist von einer Vielzahl verschiedener Faktoren abhängig, zu denen z. B. die gewählte Cisplatin-Dosis, die Infusionsgeschwindigkeit und die Nierenfunktion des Patienten gehören [150].

Der resistenzfördernde Effekt der löslichen Faktoren im KM wirft die Frage auf, welche Mechanismen ursächlich für diese Resistenzerhöhung sind. Eine erhöhte Therapieresistenz könnte bspw. auf die gesteigerte Expression der CSC-Marker CK14 und CD44 oder die verstärkte Aktivität der TGF- β -Signaltransduktion zurückzuführen sein, die zum Teil für die untersuchten UCC in anderen Versuchsansätzen dieser Arbeit belegt werden konnten (Abschnitte 5.2.3. und 5.2.5.2) [77, 151]. Am ehesten korrelieren aber die erfassten Auswirkungen des KM auf den zellulären Phänotyp der UCC mit der jeweiligen Cisplatin-Sensibilität. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Förderung mesenchymaler Eigenschaften nach der Kultivierung im KM für die BFTC-905- und UMUC-3-Zellen beobachtet werden (Abschnitt 5.2.6). Eine solche Veränderung des zellulären Phänotyps ist assoziiert mit einer verstärkten zellulären Plastizität, die mit einer erhöhten Therapieresistenz gegenüber Cisplatin verknüpft ist [97, 152]. Hiermit korreliert die Beobachtung, dass für die genannten UCC auch der resistenzfördernde Effekt des KM am stärksten ausgeprägt war. Die VMCUB-1-Zellen wiesen im Gegensatz hierzu keine Verstärkung mesenchymaler Eigenschaften nach der Inkubation mit KM auf. Dies könnte

somit erklären, weshalb für diese UCC auch nur ein sehr begrenzter resistenzfördernder Effekt nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse belegen, dass der resistenzfördernde Effekt der MSC auf die UCC weiterer Exploration bedarf. Es sollten die Resistenz-induzierenden Faktoren ermittelt und der Einfluss direkter Zellkontakte zwischen den Tumorzellen und den MSC fokussiert werden [36, 66, 153, 154]. Klinisch sind diese Erkenntnisse von besonderem Interesse, da eine potenzielle MSC-modifizierende Therapie die Sensibilität von UC gegenüber Cisplatin erhöhen könnte [35].

5.2.3 Förderung des Stammzellcharakters

Namensgebend für die heterogene CSC-Population von Tumoren sind die stammzellähnlichen Eigenschaften dieser speziellen neoplastischen Zellen. Sie verfügen über ein breiteres Differenzierungspotential im Vergleich zu den übrigen Tumorzellen und besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung [52]. Aktuelle Vermutungen gehen davon aus, dass die CSC einen Hauptregulator in der Steuerung der Tumorinitiation, Proliferation, Invasivität und Metastasierung darstellen [54]. Zusätzlich scheinen sie die Therapieresistenz und Rezidiv-Wahrscheinlichkeit eines Tumors zu erhöhen [51, 55]. Auch für das UC der Harnblase konnten spezifische CSC-Oberflächenmarker identifiziert werden, die die Erforschung dieses besonderen Tumorzell-Subtyps ermöglichen. Hierzu zählen u. a. CD133, CD44, CK14, ALDH1 (engl. Aldehyde dehydrogenase 1) und die Proteine der SOX-Familie (engl. sex determining region Y (SRY)-box) [50]. Die prognostische Aussagekraft dieser Marker ist zwar noch nicht abschließend geklärt, doch auch für Patienten mit einem UC der Harnblase konnte ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression der CSC-Marker mit einer verschlechterten Prognose belegt werden [155, 156]. Um zu untersuchen, inwiefern die löslichen Faktoren im KM die CSC-Population der UCC beeinflussen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Expression von CK14 und CD44 analysiert.

Eine erhöhte Expression des zytoskelettalen Proteins CK14 korreliert Tumorstadium-übergreifend mit einem reduzierten Gesamtüberleben der Patienten mit einem UC der Harnblase [147, 156, 157]. Bereits in einer Vorgängerarbeit erbrachten Skowron, Hoffmann et al. (2015) den Nachweis, dass CK14 nicht von UCC mit einem mesenchymalen Phänotyp (UMUC-3) exprimiert wird [55]. In Kongruenz hierzu konnte auch in dieser Arbeit lediglich für die epithelialen Zelllinien BFTC-905 und VMCUB-1 eine generelle CK14-Expression detektiert werden. Die Ergebnisse zum Einfluss des KM auf die Expression des CSC-Markers CK14 bedürfen besonderer Aufmerksamkeit, denn sie belegen, dass die Wirkung des KM auf die UCC durch eine zusätzliche Behandlung mit Cisplatin moduliert wird. Während die alleinige Inkubation der UCC BFTC-905 und VMCUB-1 in KM zu keiner signifikanten Veränderung des CK14-Expressionsniveaus führte, exprimierten die Tumorzellen

unabhängig vom Zellkulturmedium nach Cisplatinzugabe signifikant mehr CK14. Dieser CSC-fördernde Effekt des Cisplatins war bei gleichzeitiger Inkubation mit KM noch um ein Vielfaches stärker ausgeprägt als bei der Kultivierung in DMEM, was auf eine synergistische Wirkung der löslichen Faktoren im KM mit Cisplatin schließen lässt. Trotz dieses Effekts muss betont werden, dass die Ergebnisse der Cisplatin-Behandlung für die CK14-Expression in DMEM von der genannten Vorgängerarbeit abwichen [55]. In dieser bewirkte weder eine kurzfristige noch eine langfristige Therapie von UCC mit Cisplatin eine Veränderung des Expressionsniveaus von CK14 [55].

Für den membranständigen HA-Rezeptor CD44 konnte eine erhöhte Expression auch ohne Cisplatin-Zusatz für BFTC-905 und VMCUB-1 nach der Kultivierung im KM im Sinne eines CSC-fördernden Effekts registriert werden. Da CD44 nicht nur einen CSC-Marker darstellt, sondern ein erhöhtes Expressionsniveau mit einer relevant gesteigerten Invasivität der malignen Zellen einhergeht, gilt der Rezeptor zugleich auch als aussagekräftiger Invasivitätsmarker [115, 158]. Daher wird die Bedeutung der gesteigerten CD44-Expression für die Aggressivität der UCC im Kontext der Invasivität in Abschnitt 5.2.5 detaillierter diskutiert. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass MSC der Tumorumgebung als potenzieller Einflussfaktor auf die CSC-Population von UC der Harnblase in Betracht gezogen werden sollten. Der beschriebene fördernde Effekt des KM auf die Expression der CSC-Marker ist kongruent zu den Ergebnissen, die für andere Tumorsubtypen demonstriert werden konnten [42, 159].

5.2.4 Effekte auf die Apoptose

Die Apoptose-Analysen erfolgten vor dem Hintergrund, dass Tumorzellen im Laufe der Tumorprogression eine zunehmende Fehlregulation der Expression pro- und antiapoptotisch-wirkender Faktoren aufweisen, wodurch sie der Apoptose-Induktion entgehen können und resistenter gegenüber Chemotherapeutika werden [59, 160, 161, 162]. Daher wurden die Auswirkungen des KM auf die Expression der antiapoptotisch-wirkenden Proteine Bcl-XL, Bcl-2, und Survivin überprüft. Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss des KM sowie einer Cisplatin-Behandlung auf die apoptotischen Eigenschaften der UCC stellten sich insgesamt als inkonsistent, Zelllinien-abhängig und nur bedingt aussagekräftig heraus. Um festzustellen, ob MSC letztlich eine pro- oder antiapoptotische Wirkung auf UCC entfalten, sind somit weitere Untersuchungen in diesem Bereich notwendig [66, 163]. Bspw. könnten Expressionsanalysen der Effektorproteine BAX, BAK oder Caspase 9 (Abb. 2) sinnvoll sein, da sich in diesen Abschnitten der intrinsischen Apoptose, die Wirkung der pro- und antiapoptotischen Signale bündeln [63]. Schließlich

sollte auch in Erwägung gezogen werden, dass MSC nicht nur die intrinsische, sondern auch die extrinsische Apoptose-Induktion der Tumorzellen beeinflussen könnten [164].

5.2.5 Förderung der Migration und Invasivität

5.2.5.1 Steigerung der migratorischen und invasiven Kapazität

Die migratorischen und invasiven Eigenschaften von Tumorzellen sind eng miteinander verknüpft, da sie über ähnliche Mechanismen reguliert werden. Bspw. können Chemokine wie CXCL-12, CCL-5 und CCL-9 zu einer verstärkten Sekretion von MMP führen [89,165]. Die proteolytische Wirkung der MMP resultiert in einer ECM-Degradation, die wiederum eine verringerte Adhäsion der Tumorzellen zur Folge hat. Dadurch wird die Beweglichkeit der Zellen erhöht [89,165]. Daneben geht auch eine EMT-Induktion mit einer gesteigerten zellulären Migration und Invasivität einher [166,167]. Da eine Zunahme der migratorischen und invasiven Kapazität Zeichen einer erhöhten Aggressivität der Tumorzellen ist und zudem den Weg einer metastatischen Dissemination ebnet, wurde der Einfluss des KM auf diese progressionsrelevanten Charakteristika untersucht [47]. Im Zuge der Migrations-Analysen wurde bereits für einen Beobachtungszeitraum von 10 h für alle untersuchten UCC eine signifikante Steigerung des Migrationspotentials durch die Inkubation mit KM erfasst. Ein derartiger migrationsfördernder Effekt von MSC wurde u. a. auch für Tumorzellen aus Glioblastomen, malignen Melanomen und Ösophaguskarzinomen beobachtet [84,70,165].

Auch auf die invasive Kapazität der UCC wirkte sich die Inkubation mit KM förderlich aus. Im Zuge der Invasionsanalysen wurde für die Zelllinien UMUC-3- und VMCUB-1 schon nach kurzfristiger Exposition gegenüber dem KM eine signifikante Zunahme der invadierten Zellen gemessen. Da der Effekt für BFTC-905 weniger stark ausgeprägt war, wurden die Untersuchungen für diese UCC mit vorkonditionierten Zellen wiederholt. Im Anschluss an die Vorkonditionierung war der Effekt des KM sogar noch um ein Vielfaches größer. Aus diesen Beobachtungen lassen sich zwei Schlussfolgerungen ziehen. Zum einen scheint das KM chemotaktisch wirksame Faktoren zu beinhalten, da die invasionsfördernde Wirkung des KM für alle UCC höher war als das DMEM der entsprechenden Kontrollen [168]. Eine chemotaktische Wirksamkeit von KM wurde u. a. auch für Zelllinien aus Mammakarzinomen belegt [72]. Zum anderen scheint die zelluläre Invasivität durch eine längerfristige Inkubation der Tumorzellen in KM zusätzlich gesteigert zu werden. Auch der nachgewiesene invasionsfördernde Effekt der MSC steht im Einklang mit den Erkenntnissen zu diversen anderen Tumorarten [47,69,70,71]. Im Kontext der Auswirkungen von MSC auf die Invasivität von UC der Harnblase wurden bisher nur wenige Zelllinien untersucht. U. a. detektierten Maj et al. (2018) einen invasionsfördernden Effekt von MSC

auf die muskelinvasiven UCC HB-CLS-1 und HT-1376, stellten aber auch eine Hemmung der UCC 5637 fest [116]. Um die Wirkung der MSC auf die UCC therapeutisch nutzen zu können, sollte daher das Spektrum an untersuchten Zelllinien ausgeweitet werden. Zudem sollten die Signalwege, über die die Faktoren des KM die Invasivität beeinflussen, weitergehend eruiert werden. Ein potentieller Faktor könnte in diesem Zusammenhang TGF- β darstellen, da für alle untersuchten UCC eine Aktivierung der TGF- β -Signaltransduktion demonstriert werden konnte und dieser Signalweg nachweislich mit einer gesteigerten Migration und Invasivität von UC verbunden ist (Abschnitt 4.2.8.5) [169].

5.2.5.2 Effekte auf die Expression von CD44

Das membranständige Glykoprotein CD44 ist in erster Linie ein Rezeptor für HA, interagiert aber auch mit weiteren Komponenten der ECM und wurde ursprünglich als erster CSC-Oberflächenmarker erfasst [52]. Ob progressive Eigenschaften ausschließlich durch CD44⁺-CSC beeinflusst werden oder der HA-Rezeptor auch eine CSC-unabhängige Wirkung besitzt, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Fest steht allerdings, dass eine erhöhte Expression von CD44 für viele Tumore mit einer verschlechterten Prognose assoziiert ist [79]. Dies könnte damit zusammenhängen, dass ein Anstieg des CD44-Expressionsniveaus mit einer erhöhten Chemotherapie-Resistenz von Tumorzellen verbunden ist [77, 83]. Insbesondere scheint eine verstärkte CD44-Expression eine relevant gesteigerte Invasivität neoplastischer Zellen anzuzeigen [115, 158].

Die vorliegende Arbeit befasste sich daher mit den Auswirkungen des KM auf die CD44-Oberflächenexpression der UCC. Interessanterweise induzierten die löslichen Faktoren der MSC im KM für die untersuchten epithelialen UCC BFTC-905 und VMCUB-1 eine signifikante Erhöhung des Expressionsniveaus von CD44. Für die mesenchymalen UMUC-3-Zellen konnte hingegen eine geringe Reduktion der CD44-Expression gezeigt werden. Die CD44-Signaltransduktion sollte als möglicher Vermittler einiger der in dieser Arbeit gezeigten progressionsfördernden Effekte des KM in Betracht gezogen werden. Denn für UCC scheinen insbesondere die Spleißvarianten CD44v6 und CD44v3 über intrazelluläre Signalmediatoren (PI3K/AKT, pERK (engl. extracellular-signal-regulated-kinase), pSTAT3 (engl. signal transducers and activators of transcription)) eine gesteigerte Resistenz gegenüber Cisplatin, ein verstärktes Zellwachstum sowie eine erhöhte Migration und Invasion zu bewirken [82, 170]. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass durch die Hemmung der HA-Synthese mittels 4-MU (4-Methylumbelliferone) und die daraus resultierende Verringerung der HA-CD44-Interaktion eine Reduktion der Tumorprogression von UCC belegt wurde, sollte dieses potenzielle Therapieziel in Zukunft intensiver erforscht werden [82]. Ergänzend sollte eine detailliertere Analyse der exprimierten Spleißvarianten

von CD44 erfolgen, da einige Varianten sich stärker auf die Tumorprogression von UC auszuwirken scheinen [82].

5.2.6 Effekte auf den zellulären Phänotyp und die Metastasierung

5.2.6.1 Effekte auf den zellulären Phänotyp

Der Einfluss der MSC auf den zellulären Phänotyp der UCC wurde auf lichtmikroskopischer, mRNA- und Proteinexpressionsebene umfassend untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind von besonderem Interesse, denn der Prozess der EMT und die damit einhergehende Veränderung des zellulären Phänotyps von Tumorzellen stellt ein Schlüsselereignis im Prozess der Metastasierung dar [85, 90, 171]. Der Einsatz des KM in den EMT-Untersuchungen ermöglichte die Betrachtung zweier Perspektiven. Auf der einen Seite ließen sich potenzielle Effekte von MSC der direkten Tumorumgebung auf die Initiation der Metastasierung des Primärtumors ableiten. Auf der anderen Seite könnte die beobachtete Wirkung aber auch eine Bedeutung im Bereich der metastatischen Nische von UC haben [172]. Denn in häufigen Zielgeweben der Metastasen von UC der Harnblase, wie dem Knochen, befinden sich ebenfalls MSC, die Teil der metastatischen Mikroumgebung sind und die Kolonialisierung der Zellen vor Ort beeinflussen [172, 173, 174]. Um die EMT der UCC in der vorliegenden Arbeit zu detektieren, wurde die differentielle Expression epithelialer und mesenchymaler Marker bestimmt. Als epitheliales Adhäsionsmolekül wurde E-Cadherin gewählt. Als mesenchymale Marker wurden Vimentin, α -SMA und für die UMUC-3-Zellen zusätzlich ZEB-1 bestimmt. Eine Zunahme mesenchymaler Eigenschaften wurde als EMT-Induktion gewertet, wohingegen eine Steigerung epithelialer Marker entgegengesetzt als MET-Induktion angesehen wurde [85]. Neben dem Einfluss des KM wurde auf Ebene der mRNA-Expression auch der zusätzliche Effekt einer Cisplatinbehandlung mit einbezogen.

Die ursprünglich epitheliale Zelllinie BFTC-905 wies nach der Inkubation mit KM sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene eine signifikant erhöhte Vimentin-Expression auf, wohingegen das Expressionsniveau von E-Cadherin weitestgehend unverändert blieb. In Kongruenz hierzu war auch eine verstärkte Expression von α -SMA für die BFTC-905-Zellen zu beobachten. Die Ergebnisse indizieren, dass die löslichen Faktoren der MSC im KM eine EMT-induzierende Wirkung auf BFTC-905 ausübten. Gestützt wird diese These durch die lichtmikroskopisch dokumentierte Reduktion interzellulärer Kontakte der Zellen nach der Inkubation mit KM (Abb. 32) [171]. Die Wirkung von MSC als EMT-Induktoren wurde u. a. bereits für Zelllinien aus Glioblastomen, Ovarial- sowie Endometriumkarzinomen und malignen Melanomen beschrieben [70, 84, 88]. Speziell für die Wirkung von MSC auf den zellulären Phänotyp von UCC existiert aktuell nur wenig Evidenz. Erste Ergebnisse konnten

aber belegen, dass die Co-Kultivierung von MSC mit den muskelinvasiven UCC 5637 und HT-1376 eine verstärkte Aktivierung der AKT- und ERK-Signalwege der Tumorzellen bewirkte [116]. Diese Signalwege sind nicht nur mit einer EMT-Induktion assoziiert, sondern scheinen multifunktional die Aggressivität der Tumorzellen zu fördern [175, 176, 177]. Dementsprechend ist die demonstrierte EMT-induzierende Wirkung des KM auf die BFTC-905-Zellen gut vereinbar mit den Ergebnissen für andere Tumorarten sowie mit aktuellen Untersuchungen zum Einfluss von MSC auf UCC.

Der Effekt des KM auf die Zelllinie UMUC-3 muss vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass diese UCC durch einen mesenchymalen Phänotyp gekennzeichnet ist [55]. Entsprechend war eine klassische EMT-Induktion nicht zu erwarten. Nichtsdestotrotz konnte auch für UMUC-3 wenigstens teilweise eine weitere Reduktion epithelialer Eigenschaften beobachtet werden, da die Zellen nach der Inkubation mit KM weniger E-Cadherin und stattdessen mehr ZEB-1 und tendenziell auch mehr Vimentin exprimierten. Folglich reagierten die UMUC-3 ähnlich wie die BFTC-905 auf die Vorkonditionierung mit KM. Für die Zelllinien UMUC-3 und BFTC-905 stellt die Verstärkung mesenchymaler Charakteristika bzw. die Reduktion epithelialer Eigenschaften eine potenzielle Erklärung für die in Abschnitt 5.2.5 beschriebene Invasivitäts-fördernde Wirkung des KM dar. Denn eine reduzierte E-Cadherin-Expression erhöht u. a. die Motilität und Invasivität der Zellen durch eine erhöhte zytoskelettale Instabilität sowie eine verringerte epitheliale Zelladhäsion [178].

Entgegen vorherigen Erwartungen bestand der Effekt der MSC auf den ursprünglich epithelialen Phänotyp von VMCUB-1 in einer umgekehrten Wirkung, denn nach der Inkubation mit KM, exprimierten die Zellen dieser UCC signifikant mehr E-Cadherin und weniger Vimentin [55]. Somit scheinen die löslichen Faktoren des KM eine weitere Verstärkung des epithelialen Charakters dieser UCC, im Sinne einer MET-Induktion bewirkt zu haben. Überraschenderweise zeigten die Proteinexpressionsanalysen von α -SMA eine tendenzielle Erhöhung durch die Inkubation mit KM. Die Zunahme dieses mesenchymalen Markers steht im scheinbaren Widerspruch zu den übrigen Untersuchungen. Da die Änderung nur geringfügig war und die Expression ausschließlich mittels WB-Analysen bestimmt wurde, sollten die Ergebnisse zukünftig mit weiteren Methoden verifiziert werden. Die Bedeutung der MET bzw. die Förderung epithelialer Eigenschaften von Tumorzellen ist bislang noch umstritten. Auf der einen Seite scheint die MET im Sinne einer Hemmung der Progression, mit einer verringerten Invasivität und Migration assoziiert zu sein [179]. Auf der anderen Seite existiert zunehmende Evidenz dafür, dass sie ähnlich wie die EMT fester Bestandteil der metastatischen Kaskade ist [91, 180]. Im Gegensatz zur EMT scheint der MET aber keine Bedeutung in der Initiation, sondern im letzten Abschnitt der

Metastasierung zuzukommen^[180]. Es wird vermutet, dass Tumorzellen nach der Extravasation in der metastatischen Nische die MET vollziehen müssen, um hier zu kolonialisieren und zu proliferieren^[181]. Dies wiederum entspräche einer progressionsfördernden Wirkung der MET. Interessanterweise stellten McConkey et al. (2009) in diesem Kontext fest, dass die Zunahme epithelialer Eigenschaften muskelinvasiver UCC sogar mit einer noch schlechteren Prognose verbunden war als eine EMT-Induktion^[182]. Letztendlich ist dieser Aspekt bis heute aber nicht abschließend geklärt und sollte zunächst weiter erforscht werden, um die Wirkung des KM auf VMCUB-1 in diesem Kontext als progressionsfördernd oder -hemmend einordnen zu können. Zur Evaluation der Bedeutung der MET in der metastatischen Nische, könnte bspw. eine molekulare Charakterisierung der Metastasen von UC der Harnblase erfolgen. Dadurch könnte erforscht werden, ob die metastatischen Zellen ihren erworbenen mesenchymalen Phänotyp nach der Ankunft im Zielgewebe wieder zu Gunsten eines epithelialen Phänotyps aufgeben. Für Metastasen kolorektaler Karzinome wurde z. B. festgestellt, dass die Zellen im metastatischen Kern wieder über einen epithelialen Phänotyp verfügen und nur die Zellen an der invasiven Front ihren mesenchymalen Charakter beibehalten^[183]. Die beobachteten Ergebnisse werfen insbesondere die Frage auf, weshalb die beiden UCC BFTC-905 und VMCUB-1 trotz eines initial gemeinsamen epithelialen Phänotyps unterschiedlich auf die Wirkung des KM reagierten. Mögliche Unterschiede in der Rezeptorausstattung, der Aktivität relevanter Signalkaskaden sowie in genetischen Aberrationen sollten zukünftig analysiert werden, um die unterschiedliche molekulare Reaktion der UCC prognostizieren zu können.

Abschließend muss auch der Einfluss von Cisplatin auf die UCC in die Überlegungen zu den Analysen des zellulären Phänotyps miteinbezogen werden. Welche Effekte in diesem Fall überwogen, lässt sich anhand der jeweiligen E-Cadherin/Vimentin-Quotienten erkennen. Die Cisplatin-Behandlung der BFTC-905-Zellen führte zu keiner relevanten Änderung des besagten Quotienten für die DMEM-Kontrolle. Bei gleichzeitiger Kultivierung in KM reduzierte die Cisplatin-Wirkung die EMT-induzierende Wirkung des KM geringfügig. Für UMUC-3 hingegen zeigte sich für die Cisplatin-Behandlung unabhängig vom gewählten Zellkulturmedium eine Verstärkung mesenchymaler Eigenschaften. Entgegengesetzt ergab sich für VMCUB-1 sowohl in DMEM als auch in KM eine Reduktion der Expression mesenchymaler Marker. Auffällig an diesen Ergebnissen ist, dass zumindest UMUC-3 und VMCUB-1 in Bezug auf ihren zellulären Phänotyp tendenziell ähnlich auf die Cisplatin-Therapie reagierten, wie auf die zuvor beschriebene Inkubation mit KM. Auf Grund mangelnder Evidenz lässt sich die Wirkung des Cisplatin in diesem Kontext nur schwer einordnen. Eine Vorgängerarbeit von Skowron, Hoffmann et al. (2015) demonstrierte einen

EMT-induzierenden Effekt von Cisplatin auf die UCC RT-112 und J82, allerdings wurde dieser Effekt nach einer Langzeitbehandlung mit aufsteigenden Dosen über 8 bis 10 Monate dokumentiert [55]. Da in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen einer festen Konzentration von 3 μM Cisplatin aber bereits nach 72 h konstatiert werden konnten, ist ein Vergleich der Ergebnisse nicht direkt möglich. Dennoch gilt es festzuhalten, dass Cisplatin den zellulären Phänotyp der UCC beeinflussen kann und auch die Wirkung der löslichen Faktoren im KM teilweise durch das Chemotherapeutikum moduliert wird.

5.2.6.2 Aktivierung des SMAD-abhängigen kanonischen TGF- β -Signalwegs

Die Wirkung der Zytokine der TGF- β -Familie auf die Tumorprogression scheint sich im Laufe des Tumorfortschritts zu verändern [184, 185]. In frühen Tumorstadien scheint TGF- β die Progression und Proliferation der Tumorzellen eher zu supprimieren [186]. Für fortgeschrittene Tumorstadien stellt TGF- β hingegen einen Hauptinduktor der EMT dar und scheint zusätzlich die Tumormetastasierung durch einen proangiogenetischen Effekt zu unterstützen [95, 184, 186]. Darüber hinaus erhöht TGF- β die Cisplatin-Resistenz von Tumorzellen durch Förderung der CSC-Population [185]. Da MSC im TMM von UC einen wichtigen TGF- β -Produzenten darstellen, wurde der Einfluss des KM auf die Aktivität der SMAD-abhängigen TGF- β -Signaltransduktion der UCC erforscht [70]. Hierzu wurde im Anschluss an die Inkubation von UCC in KM die Konzentration des Proteins PAI-1 im KM gemessen und mit einer DMEM-Kontrolle verglichen. Das Protein PAI-1 stellt einen geeigneten Indikator für eine verstärkte Aktivität der TGF- β -Signaltransduktion dar (Abschnitt 1.1.3.5). Für alle untersuchten UCC wurde nach der Kultivierung in KM eine signifikant erhöhte PAI-1-Konzentration gemessen, was als Hinweis auf einen aktivierenden Effekt des KM auf die TGF- β -Signaltransduktion gewertet wurde. Eingeschränkt werden die beschriebenen Ergebnisse dadurch, dass initial keine Ausgangskonzentration von PAI-1 im KM vor der Kultivierung der UCC bestimmt wurde. Folglich könnte das PAI-1 sowohl durch die MSC als auch durch die UCC ins Medium sekretiert worden sein. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse zusätzlich um Analysen der Proteinexpression von SMAD4 ergänzt [187]. Hier wurde allerdings nur für die BFTC-905-Zellen im KM eine Erhöhung des SMAD4-Expressionsniveaus registriert. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung des TGF- β -Signalwegs als mögliche Erklärung für andere Effekte des KM auf die UCC in Erwägung gezogen werden sollten. Hierzu zählen u. a. die nachgewiesene Förderung der Cisplatin-Resistenz aller UCC (Abschnitt 5.2.2) und die Erhöhung mesenchymaler Eigenschaften von BFTC-905 und UMUC-3 (Abschnitt 5.2.6). Um die Bedeutung der Aktivierung der Signaltransduktion via TGF- β weitergehend zu

evaluieren, sollten die verschiedenen Versuchsansätze dieser Arbeit unter einer spezifischen Blockade des besagten Signalwegs wiederholt werden. Dadurch könnten kausale Zusammenhänge zwischen der Förderung progressiver Eigenschaften der UCC und der aktivierenden Wirkung des KM auf den TGF- β -Signalweg aufgedeckt werden.

5.2.6.3 Effekte auf die Expression des Invasivitätsmarkers CXCR-4

Eine erhöhte Expression des membranständigen Rezeptors CXCR-4 ist nachweislich mit einer gesteigerten Zellproliferation, Migration, Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen verbunden [104, 100]. Die einzigen bisher bekannten Liganden des Rezeptors sind die drei Isoformen des Chemokins CXCL-12, die insbesondere von MSC sekretiert und in der Umgebung von UC detektiert werden konnten [99, 188, 189]. Mit dem fortlaufendem Tumorprogress eines UC der Harnblase nimmt die Expression des CXCR-4-Rezeptors zu und auch in Tumorrezidiven wurde ein erhöhtes Expressionsniveau ermittelt [101, 188, 190]. Da die verstärkte CXCL-12-CXCR-4-Interaktion von UC zudem mit einer reduzierten 5J-ÜW der Patienten assoziiert ist, ist dieser progressionsrelevante Aspekt auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit [188]. In den entsprechenden Untersuchungen wurde zum einen die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche nach der Inkubation der UCC mit KM durchflusszytometrisch analysiert. Da die Regulation von CXCR-4 u. a. über die β -Arrestin-vermittelte Internalisierung des Rezeptors erfolgt, wurde ergänzend die Gesamtproteinkonzentration via WB-Analyse bestimmt [104, 191]. Auffällig in Bezug auf die Ergebnisse war für alle drei Zelllinien eine starke Abweichung der gemessenen Extinktionen der verschiedenen biologischen Replikate in den durchflusszytometrischen Analysen. Da im WB keine derartigen Schwankungen auffielen, ist eine methodische Ursache naheliegend. Dies könnte bspw. auf eine erhöhte Instabilität des CXCR-4-Rezeptors gegenüber der Trypsinierung im Zuge der Zellpräparation für die Durchflusszytometrie zurückzuführen sein. Eine Wiederholung der Analysen mit einer verkürzten Trypsinierungszeit oder nach vorheriger mechanischer Ablösung der Zellen könnte zukünftig zu aussagekräftigeren Ergebnissen führen. Trotz dieser Problematik wiesen die BFTC-905-Zellen nach der Vorkonditionierung mit KM im Vergleich zur DMEM-Kontrolle eine signifikant erhöhte CXCR-4-Expression auf. Mögliche Mediatoren, die von MSC sekretiert werden und eine gesteigerte CXCR-4-Expression von Tumorzellen bewirken sind z. B. Zytokine wie IL-2, IL-10 und TGF- β sowie Wachstumsfaktoren wie VEGF [70, 192, 193, 194]. Das erhöhte Expressionsniveau von CXCR-4 stellt eine mögliche Ursache der beobachteten ausgeweiteten migratorischen und invasiven Kapazität von BFTC-905 dar, die in Abschnitt 5.2.5 erörtert wird. Eine Korrelation der genannten progressionsrelevanten

Eigenschaften mit einer erhöhten CXCR-4-Expression wurde bereits für diverse andere UCC belegt [190].

Besonders interessant ist der CXCR-4-Rezeptor aber auch aus dem Grund, dass der Interaktion mit CXCL-12 eine entscheidende Bedeutung in der Extravasation der Tumorzellen innerhalb der metastatischen Nische zukommt [99]. Um weitere Auskünfte zum Stellenwert der MSC in der metastatischen Mikroumgebung von UCC zu erhalten, sollte die Konzentration von CXCL-12 im KM ermittelt werden. Weiterführend könnte erforscht werden, ob eine gesteigerte Interaktion mit einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen der UCC assoziiert ist, die an der Extravasation beteiligt sind [195]. Müller et al. (2001) konnten vor diesem Hintergrund einen Zusammenhang zwischen erhöhten CXCL-12-Konzentrationen im Zielgewebe und dem Organotropismus der Metastasen von Mamma-Karzinomen aufdecken [99]. Für die vorliegende Arbeit könnte dies bedeuten, dass zumindest für die BFTC-905-Zellen ein Einfluss der CXCL-12-CXCR-4-Interaktion auf die Metastasierung und den Tropismus dieser UCC besteht.

5.2.7 Effekte auf den Immunphänotyp

Mit Hilfe ihres ausgeprägten immunmodulatorischen Potentials partizipieren MSC in der Regulation der antitumoralen Immunantwort im TMM verschiedener Tumore [196, 197]. Bspw. wurde eine Modifikation des Immunphänotyps durch MSC für Zelllinien akuter B-Zell-Leukämien beschrieben [196]. Um den Einfluss der parakrinen Mediatoren der MSC im KM auf den immunologischen Phänotyp der UCC zu verifizieren, wurde die Expression von PD-L1 und PD-L2 bestimmt. Die genannten Proteine werden von UC-Zellen der Harnblase exprimiert und interagieren mit den zugehörigen Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen [106]. Die Interaktion wirkt immunsuppressiv, sodass die Tumorzellen der natürlichen antitumoralen Wirkung des Immunsystems entgehen [106]. Für keine der untersuchten UCC konnte in den Analysen zum Einfluss des KM auf den Immunphänotyp der Zellen eine statistisch signifikante Wirkung detektiert werden. Auf Grund einer hohen Schwankungsbreite zwischen den Ergebnissen der zur Vorkonditionierung eingesetzten KM-Gesamtpools, sollten die Resultate mit zusätzlichen Methoden (z. B. WB-Analyse) verifiziert werden. Daneben wurde in der vorliegenden Arbeit nur der Einfluss der MSC auf die UCC betrachtet, allerdings scheinen MSC auch einen direkten Effekt auf die Immunzellen des TMM zu besitzen [197]. Somit ist eine indirekte immunmodulatorische Wirkung der MSC wahrscheinlich, da sie nachgewiesenermaßen die Zusammensetzung und Aktivität von Immunzellen steuern [197].

5.3 Fazit

Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass MSC des TMM effektiv die progressiven Eigenschaften von Tumoren beeinflussen können [198]. Die Wirkung der MSC scheint dabei von verschiedenen Aspekten, wie der Tumorentität, den untersuchten Zelllinien, dem Gewebeursprung der verwendeten MSC sowie der eingesetzten Methodik (z. B. Co-Kultur vs. KM) abhängig zu sein [10, 116, 198].

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von KM der Einfluss parakriner Faktoren von MSC auf progressionsrelevante Eigenschaften der epithelialen UCC BFTC-905 und VMCUB-1 sowie der mesenchymalen Zelllinie UMUC-3 analysiert. Mit Hilfe der Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass parakrine Signalmediatoren von MSC einen aggressiven Phänotyp von UCC relevant modulieren können. Trotz einiger Zelllinien-abhängiger Effekte wirkten sich die Faktoren der MSC dabei überwiegend Progressions-fördernd auf die untersuchten UCC aus. Basierend auf diesen Erkenntnissen sollten MSC im TMM des UC der Harnblase unbedingt als zukünftiges potenzielles Ziel antikanzerogener Therapien in Betracht gezogen werden. Neben dem Einbezug weiterer UCC wäre es sinnvoll, dass nachfolgende Untersuchungen auch Methoden berücksichtigen, die eine direkte Zellinteraktion zwischen den Tumorzellen und den MSC ermöglichen, um die Entwicklung der Zellen im Mikrokosmos des TMM realistischer abzubilden. Weitere Erkenntnisse zum Einfluss der MSC auf die Progressivität von UCC könnten dazu führen, dass die therapeutischen Optionen für Patienten mit einem fortgeschrittenen UC der Harnblase zukünftig erweitert und ihre bis heute sehr eingeschränkte Prognose dadurch verbessert wird [86].

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Hui, L. & Chen, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett* **368**, 7-13 (2015).
2. Baghban, R., *et al.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal* **18**, 59 (2020).
3. Place, A.E., Jin Huh, S. & Polyak, K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res* **13**, 227 (2011).
4. Ungefroren, H., Sebens, S., Seidl, D., Lehnert, H. & Hass, R. Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Communication and Signaling* **9**, 18 (2011).
5. Pienta, K.J., McGregor, N., Axelrod, R. & Axelrod, D.E. Ecological therapy for cancer: defining tumors using an ecosystem paradigm suggests new opportunities for novel cancer treatments. *Transl Oncol* **1**, 158-164 (2008).
6. Polyak, K., Haviv, I. & Campbell, I.G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet* **25**, 30-38 (2009).
7. Sinyuk, M., Mulkearns-Hubert, E.E., Reizes, O. & Lathia, J. Cancer Connectors: Connexins, Gap Junctions, and Communication. *Front Oncol* **8**, 646 (2018).
8. Marlein, C.R., *et al.* NADPH oxidase-2 derived superoxide drives mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to leukemic blasts. *Blood* **130**, 1649-1660 (2017).
9. Wang, J., *et al.* Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Hematol Oncol* **11**, 11 (2018).
10. Maj, M., *et al.* Influence of Mesenchymal Stem Cells Conditioned Media on Proliferation of Urinary Tract Cancer Cell Lines and Their Sensitivity to Ciprofloxacin. *J Cell Biochem* **118**, 1361-1368 (2017).
11. Mega, A., *et al.* Astrocytes enhance glioblastoma growth. *Glia* **68**, 316-327 (2020).
12. Yang, C., *et al.* Bone Microenvironment and Osteosarcoma Metastasis. *International journal of molecular sciences* **21**(2020).
13. Liu, Y. & Cao, X. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell* **30**, 668-681 (2016).
14. Kaplan, R.N., *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**, 820-827 (2005).
15. Riekstina, U., *et al.* Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev Rep* **5**, 378-386 (2009).
16. Roccaro, A.M., *et al.* BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest* **123**, 1542-1555 (2013).
17. Melzer, C., von der Ohe, J. & Hass, R. Concise Review: Crosstalk of Mesenchymal Stroma/Stem-Like Cells with Cancer Cells Provides Therapeutic Potential. *Stem Cells* **36**, 951-968 (2018).
18. Ridge, S.M., Sullivan, F.J. & Glynn, S.A. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer* **16**, 31 (2017).
19. Potten, C.S. & Loeffler, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-1020 (1990).
20. Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V. & Charwat, V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A* **93**, 19-31 (2018).
21. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**, 641-650 (1991).
22. Ding, D.C., Shyu, W.C. & Lin, S.Z. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* **20**, 5-14 (2011).
23. Jing, J., *et al.* Reciprocal interaction between mesenchymal stem cells and transit amplifying cells regulates tissue homeostasis. *Elife* **10**(2021).

24. Moreno-Manzano, V., *et al.* Human adipose-derived mesenchymal stem cells accelerate decellularized neobladder regeneration. *Regen Biomater* **7**, 161-169 (2020).
25. Melief, S.M., Zwaginga, J.J., Fibbe, W.E. & Roelofs, H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med* **2**, 455-463 (2013).
26. Gong, M., *et al.* Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. *Oncotarget* **8**, 45200-45212 (2017).
27. Kou, X., *et al.* The Fas/Fap-1/Cav-1 complex regulates IL-1RA secretion in mesenchymal stem cells to accelerate wound healing. *Sci Transl Med* **10**(2018).
28. Kfoury, Y. & Scadden, D.T. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell* **16**, 239-253 (2015).
29. Sousa, B.R., *et al.* Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry A* **85**, 43-77 (2014).
30. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13625-13630 (2000).
31. Bayraktar, S., *et al.* Molecular- and microarray-based analysis of diversity among resting and osteogenically induced porcine mesenchymal stromal cells of several tissue origin. *J Tissue Eng Regen Med* **12**, 114-128 (2018).
32. Lindner, U., Kramer, J., Rohwedel, J. & Schlenke, P. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfus Med Hemother* **37**, 75-83 (2010).
33. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8**, 726-736 (2008).
34. Kidd, S., *et al.* The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy* **10**, 657-667 (2008).
35. Bitsika, V., *et al.* Human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells as therapeutic vehicles: a novel approach for the treatment of bladder cancer. *Stem Cells Dev* **21**, 1097-1111 (2012).
36. Wen, Y., Guo, Y., Huang, Z., Cai, J. & Wang, Z. Adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate cisplatin-induced apoptosis in epithelial ovarian cancer cells. *Mol Med Rep* **16**, 9587-9592 (2017).
37. Sun, B., *et al.* Antitumor effects of conditioned media of human fetal dermal mesenchymal stem cells on melanoma cells. *Onco Targets Ther* **12**, 4033-4046 (2019).
38. Hass, R. Role of MSC in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)* **12**(2020).
39. Ramasamy, R., *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* **21**, 304-310 (2007).
40. Lu, L., *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells suppress growth and promote the apoptosis of glioma U251 cells through downregulation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Biomed Pharmacother* **112**, 108625 (2019).
41. Ren, G., *et al.* CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNF α . *Cell Stem Cell* **11**, 812-824 (2012).
42. McLean, K., *et al.* Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest* **121**, 3206-3219 (2011).
43. Tian, Y., *et al.* Clinicopathological and Prognostic Value of Ki-67 Expression in Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **11**, e0158891 (2016).

44. Yan, X.L., *et al.* Mesenchymal stem cells from primary breast cancer tissue promote cancer proliferation and enhance mammosphere formation partially via EGF/EGFR/Akt pathway. *Breast Cancer Res Treat* **132**, 153-164 (2012).
45. Qi, J., *et al.* Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Tumor Growth Through Hedgehog Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem* **42**, 2242-2254 (2017).
46. Zhang, X., *et al.* Human colorectal cancer-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through IL-6/JAK2/STAT3 signaling. *Cell Death Dis* **9**, 25 (2018).
47. Zhou, X., *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote the in vitro proliferation and migration of breast cancer cells through the activation of the ERK pathway. *Int J Oncol* **54**, 1843-1852 (2019).
48. Nagasaki, T., *et al.* Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer* **110**, 469-478 (2014).
49. Bexell, D., *et al.* Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Mol Ther* **17**, 183-190 (2009).
50. Fang, D. & Kitamura, H. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition in urothelial carcinoma: Possible pathways and potential therapeutic approaches. *Int J Urol* **25**, 7-17 (2018).
51. Papaccio, F., *et al.* Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development. *Stem Cells Transl Med* **6**, 2115-2125 (2017).
52. Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. & Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983-3988 (2003).
53. Morath, I., Hartmann, T.N. & Orian-Rousseau, V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol* **81**, 166-173 (2016).
54. Dalerba, P., *et al.* Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10158-10163 (2007).
55. Skowron, M.A., *et al.* Phenotype plasticity rather than repopulation from CD90/CK14+ cancer stem cells leads to cisplatin resistance of urothelial carcinoma cell lines. *J Exp Clin Cancer Res* **34**, 144 (2015).
56. Lin, J.T., *et al.* Colon cancer mesenchymal stem cells modulate the tumorigenicity of colon cancer through interleukin 6. *Exp Cell Res* **319**, 2216-2229 (2013).
57. Maj, M., Kokocha, A., Bajek, A. & Drewa, T. The effects of adipose-derived stem cells on CD133-expressing bladder cancer cells. *J Cell Biochem* (2019).
58. Nishimura, K., Semba, S., Aoyagi, K., Sasaki, H. & Yokozaki, H. Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. *Pathobiology* **79**, 290-306 (2012).
59. Leibowitz, B. & Yu, J. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther* **9**, 417-422 (2010).
60. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
61. Amigo-Jiménez, I., *et al.* Bone marrow stroma-induced resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to arsenic trioxide involves Mcl-1 upregulation and is overcome by inhibiting the PI3K δ or PKC β signaling pathways. *Oncotarget* **6**, 44832-44848 (2015).
62. Löffler, G., Petrides, P., Heinrich P. *Biochemie und Pathobiochemie*, (Springer Medizin Verlag, Heidelberg (Deutschland), 2007).
63. Galluzzi, L., *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* **25**, 486-541 (2018).
64. Hwang, K.T., *et al.* Prognostic influence of BCL2 expression in breast cancer. *Int J Cancer* **131**, E1109-1119 (2012).

65. Marusawa, H., *et al.* HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *Embo j* **22**, 2729-2740 (2003).
66. Naderi, E.H., *et al.* Bone marrow stroma-derived PGE2 protects BCP-ALL cells from DNA damage-induced p53 accumulation and cell death. *Mol Cancer* **14**, 14 (2015).
67. Le Dévédec, S.E., *et al.* Systems microscopy approaches to understand cancer cell migration and metastasis. *Cell Mol Life Sci* **67**, 3219-3240 (2010).
68. Albini, A., *et al.* A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* **47**, 3239-3245 (1987).
69. Karnoub, A.E., *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557-563 (2007).
70. Lv, C., *et al.* Mesenchymal stem cells induce epithelial mesenchymal transition in melanoma by paracrine secretion of transforming growth factor- β . *Melanoma Res* **27**, 74-84 (2017).
71. Luo, D., Hu, S., Tang, C. & Liu, G. Mesenchymal stem cells promote cell invasion and migration and autophagy-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 lung adenocarcinoma cells. *Cell Biochem Funct* **36**, 88-94 (2018).
72. Swamydas, M., Ricci, K., Rego, S.L. & Dréau, D. Mesenchymal stem cell-derived CCL-9 and CCL-5 promote mammary tumor cell invasion and the activation of matrix metalloproteinases. *Cell Adh Migr* **7**, 315-324 (2013).
73. Ma, F., *et al.* Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Promote Breast Cancer Metastasis by Interleukin-8- and Interleukin-6-Dependent Induction of CD44(+)/CD24(-) Cells. *Cell Transplant* **24**, 2585-2599 (2015).
74. Yan, Y., Zuo, X. & Wei, D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med* **4**, 1033-1043 (2015).
75. Zhang, H., *et al.* CD44 splice isoform switching determines breast cancer stem cell state. *Genes Dev* **33**, 166-179 (2019).
76. Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P.A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 33-45 (2003).
77. Guo, J.Y., *et al.* Serglycin in tumor microenvironment promotes non-small cell lung cancer aggressiveness in a CD44-dependent manner. *Oncogene* **36**, 2457-2471 (2017).
78. Wu, C.T., Lin, W.Y., Chen, W.C. & Chen, M.F. Predictive Value of CD44 in Muscle-Invasive Bladder Cancer and Its Relationship with IL-6 Signaling. *Ann Surg Oncol* **25**, 3518-3526 (2018).
79. Hu, Y., Zhang, Y., Gao, J., Lian, X. & Wang, Y. The clinicopathological and prognostic value of CD44 expression in bladder cancer: a study based on meta-analysis and TCGA data. *Bioengineered* **11**, 572-581 (2020).
80. Sheridan, C., *et al.* CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* **8**, R59 (2006).
81. Hong, Y., *et al.* FNDC3B circular RNA promotes the migration and invasion of gastric cancer cells via the regulation of E-cadherin and CD44 expression. *J Cell Physiol* **234**, 19895-19910 (2019).
82. Anand, V., *et al.* CD44 splice variant (CD44v3) promotes progression of urothelial carcinoma of bladder through Akt/ERK/STAT3 pathways: novel therapeutic approach. *J Cancer Res Clin Oncol* **145**, 2649-2661 (2019).
83. Hagiwara, M., *et al.* Variant isoforms of CD44 involves acquisition of chemoresistance to cisplatin and has potential as a novel indicator for identifying a cisplatin-resistant population in urothelial cancer. *BMC Cancer* **18**, 113 (2018).
84. Iser, I.C., *et al.* Conditioned Medium from Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Promotes Epithelial-to-Mesenchymal-Like Transition (EMT-Like) in Glioma Cells In vitro. *Mol Neurobiol* **53**, 7184-7199 (2016).
85. Kalluri, R. & Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420-1428 (2009).

86. Robert Koch Institut, u.d.G.d.e.K.i.D.e.V. *Krebs in Deutschland*, (Berlin, 2015/2016).
87. Gaertner, J., Wolf, J. & Voltz, R. Early palliative care for patients with metastatic cancer. *Curr Opin Oncol* **24**, 357-362 (2012).
88. So, K.A., Min, K.J., Hong, J.H. & Lee, J.K. Interleukin-6 expression by interactions between gynecologic cancer cells and human mesenchymal stem cells promotes epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol* **47**, 1451-1459 (2015).
89. Martin, F.T., *et al.* Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res Treat* **124**, 317-326 (2010).
90. van der Horst, G., Bos, L. & van der Pluijm, G. Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma. *Mol Cancer Res* **10**, 995-1009 (2012).
91. Chaffer, C.L., Thompson, E.W. & Williams, E.D. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs* **185**, 7-19 (2007).
92. Pei, D., Shu, X., Gassama-Diagne, A. & Thiery, J.P. Mesenchymal-epithelial transition in development and reprogramming. *Nat Cell Biol* **21**, 44-53 (2019).
93. Zhang, J., Thorikay, M., van der Zon, G., van Dinther, M. & Ten Dijke, P. Studying TGF- β Signaling and TGF- β -induced Epithelial-to-mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. *J Vis Exp* (2020).
94. Demirkan, B. The Roles of Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) and Mesenchymal-to-Epithelial Transition (MET) in Breast Cancer Bone Metastasis: Potential Targets for Prevention and Treatment. *J Clin Med* **2**, 264-282 (2013).
95. Li, L., *et al.* A TGF- β -MTA1-SOX4-EZH2 signaling axis drives epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Oncogene* **39**, 2125-2139 (2020).
96. Sheen, Y.Y., Kim, M.J., Park, S.A., Park, S.Y. & Nam, J.S. Targeting the Transforming Growth Factor- β Signaling in Cancer Therapy. *Biomol Ther (Seoul)* **21**, 323-331 (2013).
97. Du, B. & Shim, J.S. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* **21**(2016).
98. Dong, C., Zhu, S., Wang, T., Yoon, W. & Goldschmidt-Clermont, P.J. Upregulation of PAI-1 is mediated through TGF-beta/Smad pathway in transplant arteriopathy. *J Heart Lung Transplant* **21**, 999-1008 (2002).
99. Müller, A., *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50-56 (2001).
100. Scala, S., *et al.* Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* **11**, 1835-1841 (2005).
101. Batsi, O., *et al.* Immunohistochemical evaluation of CXCL12-CXCR4 axis and VEGFR3 expression in primary urothelial cancer and its recurrence. *Anticancer Res* **34**, 3537-3542 (2014).
102. De Falco, V., *et al.* Biological role and potential therapeutic targeting of the chemokine receptor CXCR4 in undifferentiated thyroid cancer. *Cancer Res* **67**, 11821-11829 (2007).
103. Lv, S., *et al.* The association of CXCR4 expression with prognosis and clinicopathological indicators in colorectal carcinoma patients: a meta-analysis. *Histopathology* **64**, 701-712 (2014).
104. Nazari, A., Khorramdelazad, H. & Hassanshahi, G. Biological/pathological functions of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axes in the pathogenesis of bladder cancer. *Int J Clin Oncol* **22**, 991-1000 (2017).
105. Leach, D.R., Krummel, M.F. & Allison, J.P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**, 1734-1736 (1996).
106. Alsaab, H.O., *et al.* PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol* **8**, 561 (2017).

107. Zhou, J., *et al.* Soluble PD-L1 as a Biomarker in Malignant Melanoma Treated with Checkpoint Blockade. *Cancer Immunol Res* **5**, 480-492 (2017).
108. Poggi, A., Varesano, S. & Zocchi, M.R. How to Hit Mesenchymal Stromal Cells and Make the Tumor Microenvironment Immunostimulant Rather Than Immunosuppressive. *Front Immunol* **9**, 262 (2018).
109. Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L. & Betancourt, A.M. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* **5**, e10088 (2010).
110. Wu, H., *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA-193a reduces cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells via targeting LRRC1. *Cell Death Dis* **11**, 801 (2020).
111. Zeng, J., *et al.* Mesenchymal stem/stromal cells-derived IL-6 promotes nasopharyngeal carcinoma growth and resistance to cisplatin via upregulating CD73 expression. *J Cancer* **11**, 2068-2079 (2020).
112. Chen, J., *et al.* Human mesenchymal stem cells promote tumor growth via MAPK pathway and metastasis by epithelial mesenchymal transition and integrin α 5 in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* **10**, 425 (2019).
113. Deutsche Gesellschaft für Urologie (DGU), D.K.D. DGU, DKG: S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms AWMF-Registrierungsnummer 032/0380L. (2020).
114. Chen, S.H. & Chang, J.Y. New Insights into Mechanisms of Cisplatin Resistance: From Tumor Cell to Microenvironment. *International journal of molecular sciences* **20**(2019).
115. Xu, H., *et al.* Tumor-derived mesenchymal-stem-cell-secreted IL-6 enhances resistance to cisplatin via the STAT3 pathway in breast cancer. *Oncol Lett* **15**, 9142-9150 (2018).
116. Maj, M., Kokocha, A., Bajek, A. & Drewa, T. The interplay between adipose-derived stem cells and bladder cancer cells. *Sci Rep* **8**, 15118 (2018).
117. Ploeg, M., Aben, K.K. & Kiemeny, L.A. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol* **27**, 289-293 (2009).
118. Park, J.C., Citrin, D.E., Agarwal, P.K. & Apolo, A.B. Multimodal management of muscle-invasive bladder cancer. *Curr Probl Cancer* **38**, 80-108 (2014).
119. Ferlay, J., *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, E359-386 (2015).
120. Kunze, E., Chang-Claude, J. & Frentzel-Beyme, R. Life style and occupational risk factors for bladder cancer in Germany. A case-control study. *Cancer* **69**, 1776-1790 (1992).
121. Mostafa, M.H., Sheweita, S.A. & O'Connor, P.J. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin Microbiol Rev* **12**, 97-111 (1999).
122. Sun, X., *et al.* Cigarette smoke supports stemness and epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer stem cells through SHH signaling. *Int J Clin Exp Pathol* **13**, 1333-1348 (2020).
123. Witjes, J.A., *et al.* European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *Eur Urol* **79**, 82-104 (2021).
124. Shephard, E.A., *et al.* Clinical features of bladder cancer in primary care. *Br J Gen Pract* **62**, e598-604 (2012).
125. Turner, A.G., Hendry, W.F., Williams, G.B. & Wallace, D.M. A haematuria diagnostic service. *Br Med J* **2**, 29-31 (1977).
126. Goldberg, R.P., Sherman, W. & Sand, P.K. Cystoscopy for lower urinary tract symptoms in urogynecologic practice: the likelihood of finding bladder cancer. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* **19**, 991-994 (2008).
127. Welsch, U., Kummer, W., Deller, T. *Lehrbuch Histologie*, (Elsevier, München (Deutschland), 2014).

128. Tzeng, C.C., *et al.* Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan. *Anticancer Res* **16**, 1797-1804 (1996).
129. Grossman, H.B., Wedemeyer, G., Ren, L., Wilson, G.N. & Cox, B. Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures. *J Urol* **136**, 953-959 (1986).
130. Williams, R.D. Human urologic cancer cell lines. *Invest Urol* **17**, 359-363 (1980).
131. Knowles, M.A. & Hurst, C.D. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* **15**, 25-41 (2015).
132. Yang, D.L., *et al.* Chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12 expressions and clinical significance in bladder cancer. *Genet Mol Res* **14**, 17699-17707 (2015).
133. Merck-KGaA, S.-A. *ECACC: Laboratory Handbook, Fundamental Techniques in Cell Culture*, (Darmstadt (Germany), 2018).
134. Kuçi, S., Henschler, R., Müller, I., Biagi, E. & Meisel, R. Basic biology and clinical application of multipotent mesenchymal stromal cells: from bench to bedside. *Stem Cells Int* **2012**, 185943 (2012).
135. Boxall, S.A. & Jones, E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int* **2012**, 975871 (2012).
136. Bruder, S.P., Jaiswal, N. & Haynesworth, S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* **64**, 278-294 (1997).
137. Sun, L., *et al.* cMyc-mediated activation of serine biosynthesis pathway is critical for cancer progression under nutrient deprivation conditions. *Cell Res* **25**, 429-444 (2015).
138. Ahmadiankia, N., Bagheri, M. & Fazli, M. Nutrient Deprivation Modulates the Metastatic Potential of Breast Cancer Cells. *Rep Biochem Mol Biol* **8**, 139-146 (2019).
139. Takigawa, H., *et al.* Mesenchymal Stem Cells Induce Epithelial to Mesenchymal Transition in Colon Cancer Cells through Direct Cell-to-Cell Contact. *Neoplasia* **19**, 429-438 (2017).
140. Brennen, W.N., Chen, S., Denmeade, S.R. & Isaacs, J.T. Quantification of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) at sites of human prostate cancer. *Oncotarget* **4**, 106-117 (2013).
141. Mohamed-Ahmed, S., *et al.* Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther* **9**, 168 (2018).
142. Yang, C., *et al.* Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficiently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines in vitro. *Biomed Res Int* **2014**, 109389 (2014).
143. Wen, S., *et al.* Ki-67 as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer in Asian patients: a meta-analysis of published studies involving 32 studies. *BMC Cancer* **15**, 520 (2015).
144. Shui, R., Yu, B., Bi, R., Yang, F. & Yang, W. An interobserver reproducibility analysis of Ki67 visual assessment in breast cancer. *PLoS One* **10**, e0125131 (2015).
145. Hasebe-Takada, N., *et al.* Application of cell growth analysis to the quality assessment of human cell-processed therapeutic products as a testing method for immortalized cellular impurities. *Regen Ther* **5**, 49-54 (2016).
146. Di, G.H., *et al.* IL-6 secreted from senescent mesenchymal stem cells promotes proliferation and migration of breast cancer cells. *PLoS One* **9**, e113572 (2014).
147. Choi, W., *et al.* Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* **25**, 152-165 (2014).
148. Shah, J.B., McConkey, D.J. & Dinney, C.P. New strategies in muscle-invasive bladder cancer: on the road to personalized medicine. *Clin Cancer Res* **17**, 2608-2612 (2011).
149. Aranha, O., Wood, D.P., Jr. & Sarkar, F.H. Ciprofloxacin mediated cell growth inhibition, S/G2-M cell cycle arrest, and apoptosis in a human transitional cell carcinoma of the bladder cell line. *Clin Cancer Res* **6**, 891-900 (2000).

150. Hanada, K., Nishijima, K., Ogata, H., Atagi, S. & Kawahara, M. Population pharmacokinetic analysis of cisplatin and its metabolites in cancer patients: possible misinterpretation of covariates for pharmacokinetic parameters calculated from the concentrations of unchanged cisplatin, ultrafiltered platinum and total platinum. *Jpn J Clin Oncol* **31**, 179-184 (2001).
151. Zhu, Q.L., Li, Z., Lv, C.M. & Wang, W. MiR-187 influences cisplatin-resistance of gastric cancer cells through regulating the TGF- β /Smad signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **23**, 9907-9914 (2019).
152. Fondrevelle, M.E., *et al.* The expression of Twist has an impact on survival in human bladder cancer and is influenced by the smoking status. *Urol Oncol* **27**, 268-276 (2009).
153. Thayanithy, V., Dickson, E.L., Steer, C., Subramanian, S. & Lou, E. Tumor-stromal cross talk: direct cell-to-cell transfer of oncogenic microRNAs via tunneling nanotubes. *Transl Res* **164**, 359-365 (2014).
154. Boukelmoune, N., Chiu, G.S., Kavelaars, A. & Heijnen, C.J. Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells to neural stem cells protects against the neurotoxic effects of cisplatin. *Acta Neuropathol Commun* **6**, 139 (2018).
155. Ramos, D., Navarro, S., Villamón, R., Gil-Salom, M. & Llombart-Bosch, A. Cytokeratin expression patterns in low-grade papillary urothelial neoplasms of the urinary bladder. *Cancer* **97**, 1876-1883 (2003).
156. Volkmer, J.P., *et al.* Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2078-2083 (2012).
157. Network, C.G.A.R. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* **507**, 315-322 (2014).
158. Kim, Y. & Kumar, S. CD44-mediated adhesion to hyaluronic acid contributes to mechanosensing and invasive motility. *Mol Cancer Res* **12**, 1416-1429 (2014).
159. Cuiffo, B.G., *et al.* MSC-regulated microRNAs converge on the transcription factor FOXP2 and promote breast cancer metastasis. *Cell Stem Cell* **15**, 762-774 (2014).
160. Skowron, M.A., *et al.* Multifaceted Mechanisms of Cisplatin Resistance in Long-Term Treated Urothelial Carcinoma Cell Lines. *International journal of molecular sciences* **19**(2018).
161. Galluzzi, L., *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**, 1869-1883 (2012).
162. van Oosterwijk, J.G., *et al.* Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma in vitro: BCL-2 family members cause chemoresistance. *Ann Oncol* **23**, 1617-1626 (2012).
163. Yu, X., *et al.* Human adipose derived stem cells induced cell apoptosis and s phase arrest in bladder tumor. *Stem Cells Int* **2015**, 619290 (2015).
164. de Menezes, F.C., Cabral, L.G.S., Petrellis, M.C., Neto, C.F. & Maria, D.A. Antitumor effect of cell therapy with mesenchymal stem cells on murine melanoma B16-F10. *Biomed Pharmacother* **128**, 110294 (2020).
165. Yang, X., *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote carcinoma growth and lymph node metastasis when co-injected with esophageal carcinoma cells in nude mice. *Cancer Cell Int* **14**, 93 (2014).
166. Behrens, J., Mareel, M.M., Van Roy, F.M. & Birchmeier, W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **108**, 2435-2447 (1989).
167. Vleminckx, K., Vakaet, L., Jr., Mareel, M., Fiers, W. & van Roy, F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* **66**, 107-119 (1991).
168. Ikeda, T., *et al.* Mesenchymal stem cell-derived CXCL16 promotes progression of gastric cancer cells by STAT3-mediated expression of Ror1. *Cancer Sci* **111**, 1254-1265 (2020).

169. Li, Y., Zhong, W., Zhu, M., Hu, S. & Su, X. Nodal regulates bladder cancer cell migration and invasion via the ALK/Smad signaling pathway. *Onco Targets Ther* **11**, 6589-6597 (2018).
170. Wu, C.T., Lin, W.Y., Chang, Y.H., Chen, W.C. & Chen, M.F. Impact of CD44 expression on radiation response for bladder cancer. *J Cancer* **8**, 1137-1144 (2017).
171. Bronsert, P., *et al.* Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface. *J Pathol* **234**, 410-422 (2014).
172. Fernández Vallone, V.B., *et al.* Behaviour of mesenchymal stem cells from bone marrow of untreated advanced breast and lung cancer patients without bone osteolytic metastasis. *Clin Exp Metastasis* **30**, 317-332 (2013).
173. Fan, Z., Huang, Z., Hu, C., Tong, Y. & Zhao, C. Risk factors and nomogram for newly diagnosis of bone metastasis in bladder cancer: A SEER-based study. *Medicine (Baltimore)* **99**, e22675 (2020).
174. Esposito, M. & Kang, Y. Targeting tumor-stromal interactions in bone metastasis. *Pharmacol Ther* **141**, 222-233 (2014).
175. Yu, D., *et al.* Cigarette smoke induced urocytic epithelial mesenchymal transition via MAPK pathways. *Oncotarget* **8**, 8791-8800 (2017).
176. Lv, D., *et al.* HnRNP-L mediates bladder cancer progression by inhibiting apoptotic signaling and enhancing MAPK signaling pathways. *Oncotarget* **8**, 13586-13599 (2017).
177. Garg, M. & Singh, R. Epithelial-to-mesenchymal transition: Event and core associates in bladder cancer. *Front Biosci (Elite Ed)* **11**, 150-165 (2019).
178. Herzig, M., Savarese, F., Novatchkova, M., Semb, H. & Christofori, G. Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of beta-catenin/Tcf-mediated Wnt signaling. *Oncogene* **26**, 2290-2298 (2007).
179. Su, Y., *et al.* circ5912 suppresses cancer progression via inducing MET in bladder cancer. *Aging (Albany NY)* **11**, 10826-10838 (2019).
180. Kletukhina, S., Neustroeva, O., James, V., Rizvanov, A. & Gomzikova, M. Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Epithelial-Mesenchymal Transition. *International journal of molecular sciences* **20**(2019).
181. Chaffer, C.L., *et al.* Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res* **66**, 11271-11278 (2006).
182. McConkey, D.J., *et al.* Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 335-344 (2009).
183. Brabletz, T., *et al.* Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* **179**, 56-65 (2005).
184. Batlle, R., *et al.* Regulation of tumor angiogenesis and mesenchymal-endothelial transition by p38 α through TGF- β and JNK signaling. *Nat Commun* **10**, 3071 (2019).
185. Oshimori, N., Oristian, D. & Fuchs, E. TGF- β promotes heterogeneity and drug resistance in squamous cell carcinoma. *Cell* **160**, 963-976 (2015).
186. Datto, M.B., *et al.* Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5545-5549 (1995).
187. Massagué, J. & Gomis, R.R. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* **580**, 2811-2820 (2006).
188. Gosalbez, M., *et al.* Differential expression of SDF-1 isoforms in bladder cancer. *J Urol* **191**, 1899-1905 (2014).
189. Nakao, N., *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis in vitro and in vivo: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Pathol* **177**, 547-554 (2010).

190. Retz, M.M., *et al.* CXCR4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Int J Cancer* **114**, 182-189 (2005).
191. Cheng, Z.J., *et al.* beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J Biol Chem* **275**, 2479-2485 (2000).
192. Moriuchi, M., Moriuchi, H., Turner, W. & Fauci, A.S. Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol* **159**, 4322-4329 (1997).
193. Wang, J., *et al.* Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages. *J Biol Chem* **276**, 49236-49243 (2001).
194. Salcedo, R., *et al.* Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol* **154**, 1125-1135 (1999).
195. Martinez-Ordoñez, A., *et al.* Breast cancer metastasis to liver and lung is facilitated by Pit-1-CXCL12-CXCR4 axis. *Oncogene* **37**, 1430-1444 (2018).
196. Kihira, K., *et al.* Close interaction with bone marrow mesenchymal stromal cells induces the development of cancer stem cell-like immunophenotype in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Int J Hematol* **112**, 795-806 (2020).
197. Biswas, S., *et al.* Exosomes Produced by Mesenchymal Stem Cells Drive Differentiation of Myeloid Cells into Immunosuppressive M2-Polarized Macrophages in Breast Cancer. *J Immunol* **203**, 3447-3460 (2019).
198. Lin, W., *et al.* Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Clinical Challenges and Opportunities. *Biomed Res Int* **2019**, 2820853 (2019).

7 Anhang

7.1 TNM-Klassifikation: Urothelkarzinom der Harnblase

Tab. 22: TNM-Klassifikation des UC der Harnblase gemäß der aktuellen AWMF-Leitlinie (Stand: 07.02.2021) [113].

| Klassifikation | Tumor |
|-----------------------|---|
| T | Primärtumor |
| TX | Primärtumor kann nicht bewertet werden |
| T0 | Kein Nachweis von Primärtumor |
| Ta | Nicht-muskelinvasives papilläres Karzinom |
| Tis | Carcinoma in situ: „Flache Neoplasie“ |
| T1 | Tumor dringt in subepitheliales Bindegewebe ein |
| T2 | Tumor dringt in Muscularis propria ein |
| T2a | Tumor dringt in oberflächliche Muscularis propria ein (Innere Hälfte) |
| T2b | Tumor dringt tief in Muscularis propria ein (äußere Hälfte) |
| T3 | Tumor dringt in perivesikales Gewebe ein: |
| T3a | Mikroskopisch |
| T3b | Makroskopisch (Extravesikale Masse) |
| T4 | Tumor dringt in eines der folgenden ein: Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus, Vagina, Beckenwand |
| T4a | Tumor dringt ein in Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus oder Vagina |
| T4b | Tumor dringt ein in Beckenwand oder Abdominalwand |
| N | Regionäre Lymphknoten |
| NX | Regionäre Lymphknoten können nicht bewertet werden |
| N0 | Keine regionalen Lymphknotenmetastasen |
| N1 | Solitäre Metastase(n) in einem Lymphknoten des kleinen Beckens (hypogastrische, Obturator-, externe iliace oder präsakrale Lymphknoten) |
| N2 | Metastasen(n) in multiplen Lymphknoten des kleinen Beckens (hypogastrische, Obturator-, externe iliace oder präsakrale Lymphknoten) |
| N3 | Metastase(n) der Lymphknoten an der Arteria iliaca communis |
| M | Fernmetastasen |
| M0 | Keine Fernmetastasen |
| M1a | Metastasen in nichtregionären Lymphknoten |
| M1b | Andere Fernmetastasen |

7.2 Zellinienspezifische Charakteristika der UCC

Bemerkung: Die Überprüfung der individuellen Proliferationskapazitäten der ausgewählten UCC in DMEM erfolgte durch Bestimmung der Zellviabilität nach Abschluss der Inkubation. Im Vergleich zeichnete sich die Zelllinie BFTC-905 durch die niedrigste Zellviabilität und folglich Proliferationsgeschwindigkeit aus. Die UMUC-3- und VMCUB-1-Zellen kennzeichneten sich durch eine ähnliche, insgesamt höhere proliferative Kapazität (Abb. 59). Die Unterschiede in der Proliferationsgeschwindigkeit der UCC wurden evaluiert, um die Auswirkungen des KM auf das Wachstum der Tumorzellen nachzuvollziehen (Abschnitt 4.2.2).

UCC-Vergleich

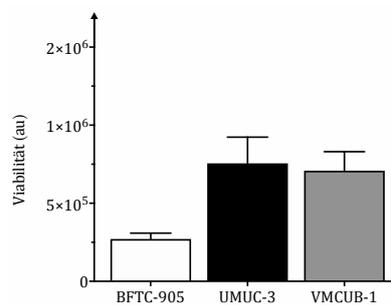


Abb. 59: Vergleich der zellinienspezifischen Proliferationskapazität von BFTC-905, UMUC-3 und VMCUB-1 in DMEM durch Messung der Zellviabilität. Von den untersuchten UCC war die Proliferationsgeschwindigkeit der UMUC-3 am höchsten, gefolgt von VMCUB-1- und BFTC-905. Dargestellt wird der jeweilige Mittelwert + SD (8 technische Replikate).

Die Charakterisierung des zellulären Phänotyps der UCC erfolgte durch die Analyse der mRNA-Expression des epithelialen Markers E-Cadherin und des mesenchymalen Markers Vimentin. Die differentielle Expression dieser beiden Gene wird häufig zum Nachweis der EMT genutzt [75, 93]. In Abb. 60 werden die Unterschiede im Expressionsniveau der Zielgene für die untersuchten UCC nach der Inkubation in DMEM verdeutlicht. Der mesenchymale Charakter der Zelllinie UMUC-3 spiegelte sich in einer hohen Expression von Vimentin bei zugleich niedriger Expression von E-Cadherin wider. Im Gegensatz dazu kennzeichneten sich BFTC-905 und VMCUB-1 durch einen epithelialen Phänotyp, da sie ein hohes Expressionsniveau von E-Cadherin aufwiesen, wohingegen Vimentin nur in geringem Ausmaß exprimiert wurde. Die genannten Ergebnisse wurden als Ausgangspunkt für die Untersuchungen zum Einfluss des KM auf den zellulären Phänotyp und den Prozess der EMT genutzt (Abschnitt 4.2.8).

UCC-Vergleich

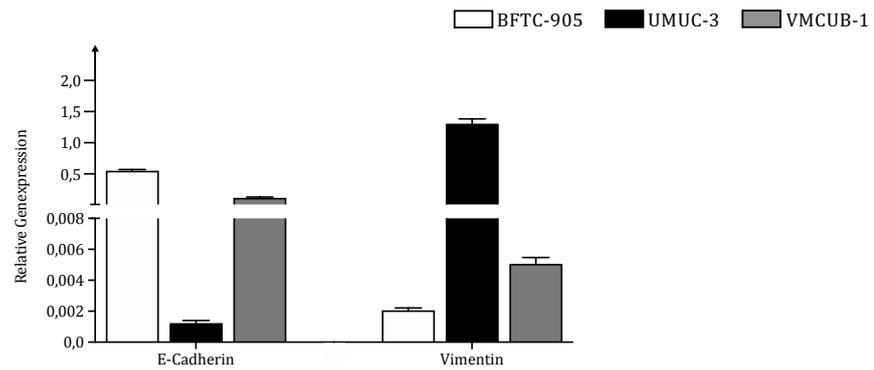


Abb. 60: Überprüfung des zellulären Phänotyps von BFTC-905, UMUC-3 und VMCUB-1 in DMEM durch Untersuchung der mRNA-Expression von E-Cadherin und Vimentin. Während sich die UMUC-3-Zellen durch einen eher mesenchymalen Phänotyp auszeichnen, konnte für die BFTC-905- und VMCUB-1-Zellen ein epithelialer Phänotyp nachgewiesen werden. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert + SD (6 technische Replikate).

Weiterhin wurden die spezifischen Resistenzeigenschaften der UCC gegenüber der in-vitro-Behandlung mit Cisplatin in DMEM getestet. Die Ergebnisse wurden anschließend genutzt, um die Effekte einer Inkubation der UCC mit KM auf die Cisplatin-Sensitivität zu analysieren (Abschnitt 4.2.3). Hierfür wurden die Zellen in DMEM kultiviert und einmalig über 72 h mit Cisplatin behandelt. Durch die anschließende Messung der Zellviabilität konnte die jeweilige Cisplatin-Konzentration ermittelt werden, bei der die Zellzahl um 50 % (LD50) bzw. 80 % (LD80) reduziert wurde. Im höheren Konzentrationsbereich (LD80) reagierte UMUC-3 am sensitivsten auf die Cisplatin-Behandlung, gefolgt von BFTC-905. Die VMCUB-1-Zellen zeigten im Vergleich die höchste Resistenz gegenüber Cisplatin bei Kultivierung in DMEM.

Tab. 23: Überprüfung der Cisplatin-Sensitivität von BFTC-905, UMUC-3 und VMCUB-1 in DMEM.

| | LD50 ¹ | LD80 ¹ |
|-----------------|-------------------|-------------------|
| BFTC-905 | 2 µM | 7 µM |
| UMUC-3 | 2 µM | 5 µM |
| VMCUB-1 | 3 µM | 10 µM |

¹LD = Letale Dosis

7.3 Migrations-Analysen mit KM und Cisplatin

Bemerkung: Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf die Migrationsanalysen von BFTC-905, UMUC-3 und VMCUB-1. Gezeigt wird die prozentuale Anzahl migrierter Zellen pro Zeiteinheit. Neben den Zellen in KM und der DMEM-Kontrolle gibt es zwei zusätzliche Gruppen, deren Medium über den Zeitraum der Migrationsanalyse (10 h) mit 3 μM Cisplatin versetzt wurde. Die Ergebnisse lassen lediglich eine eingeschränkte Aussage über den Einfluss von Cisplatin auf die migratorische Kapazität der Zellen zu, da die Inkubationszeit sehr kurz gewählt wurde und Cisplatin erst über eine längere Expositionszeit effizient wirkt.

BFTC-905

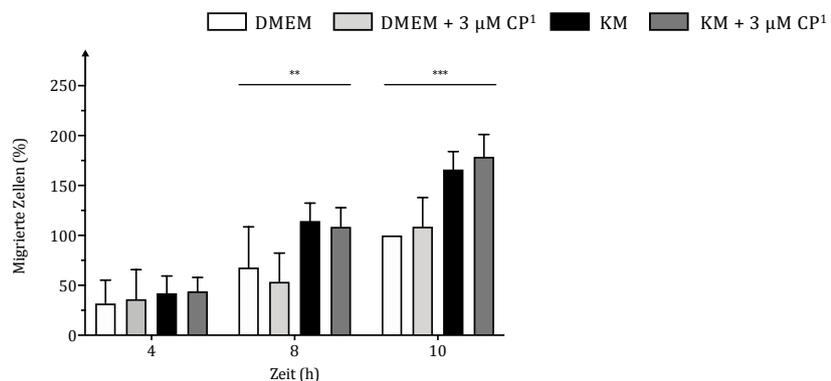


Abb. 61: Migration der BFTC-905-Zellen im KM \pm Cisplatin¹. Dargestellt wird der Migrationsfortschritt zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Während die Inkubation der Zellen mit KM eine Steigerung der migratorischen Kapazität der Zellen bewirkte, resultierte aus dem Zusatz von 3 μM Cisplatin für den Zeitraum der Beobachtung kein Effekt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von (n = 9, 2 technische Replikate), die auf die DMEM-Kontrolle nach 10 h normiert wurden.

UMUC-3

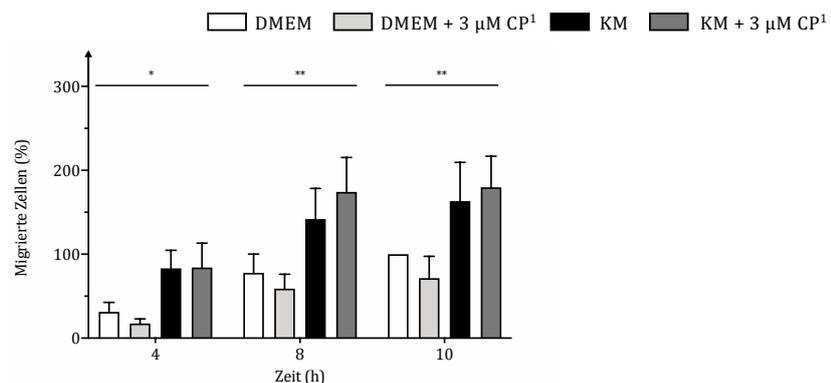


Abb. 62: Migration der UMUC-3-Zellen im KM \pm Cisplatin¹. Dargestellt wird der Migrationsfortschritt zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Während die Inkubation der Zellen mit KM eine Steigerung der migratorischen Kapazität der Zellen bewirkte, resultierte aus dem Zusatz von 3 μM Cisplatin für den Zeitraum der Beobachtung kein Effekt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von (n = 9, 2 technische Replikate), die auf die DMEM-Kontrolle nach 10 h normiert wurden.

VMCUB-1

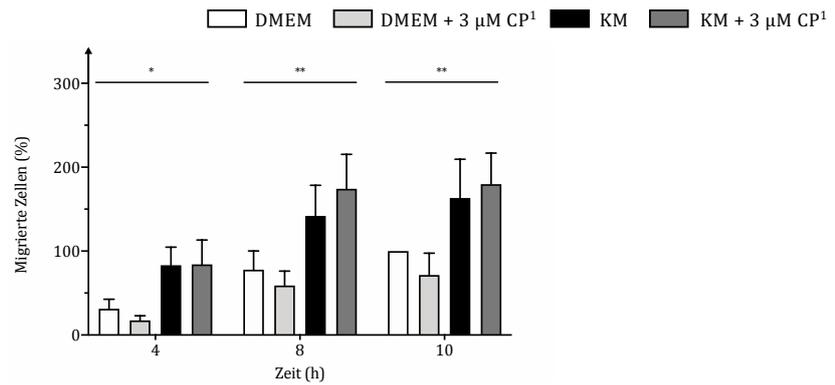


Abb. 63: Migration der VMCUB-1-Zellen im KM ± Cisplatin¹. Dargestellt wird der Migrationsfortschritt zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Während die Inkubation der Zellen mit KM eine Steigerung der migratorischen Kapazität der Zellen bewirkte, resultierte aus dem Zusatz von 3 µM Cisplatin für den Zeitraum der Beobachtung kein Effekt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von (n = 9, 2 technische Replikate), die auf die DMEM-Kontrolle nach 10 h normiert wurden.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und mich bei allen Personen bedanken, die mich auf meinem bisherigen Weg unterstützt und die Durchführung sowie Fertigstellung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Zu Anfang möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Bittersohl aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie bedanken, der dieses Forschungsprojekt von Beginn an mit klinischer und fachlicher Expertise sowie konstruktiven Ratschlägen und Ideen betreut hat – Vielen Dank!

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Doktormutter Priv. Doz. Dr. rer. nat. Michèle Hoffmann aus dem urologischen Forschungslabor bedanken, die dieses Projekt vom ersten bis zum letzten Schritt begleitet und gestaltet hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für die umfassende, kompetente, freundliche und herausragende Unterstützung!

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Vera Grotheer, meiner Betreuerin aus dem unfallchirurgischen Forschungslabor. Liebe Vera mit deinen Ideen, Ratschlägen und deinem Wissen hast du dieses Projekt begleitet, geformt und mich zu jeder Zeit unterstützt. Vielen Dank für die aus meiner Sicht bestmögliche Betreuung dieser Dissertation.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. rer. nat. Christoph Suschek aus dem unfallchirurgischen Forschungslabor, der diese Dissertation nicht nur ermöglicht und sich mit konstruktiven Vorschlägen für dieses Projekt eingesetzt hat – sondern diese Arbeit auch durch Unwegsamkeiten wie die Coronakrise sicher manövrierte. Vielen Dank!

Ganz herzlich möchte ich mich bei dem gesamten Team des unfallchirurgischen Forschungslabors bedanken. Sabine, Jutta, Christa, Amin und Samira – ich bedanke mich für eure Unterstützung, für das Teilen eurer Erfahrung und eures Wissens, die herzliche und freundliche Arbeitsatmosphäre und eure Geduld mit mir.

Auch bei dem Team des urologischen Forschungslabors möchte ich mich für die Begleitung und Ermöglichung dieses Projekts, die Bereitstellung von Zelllinien und Materialien und die Betreuung meiner Tätigkeiten im urologischen Labor bedanken.

Mein herausragender Dank gilt zudem der Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität, die diese Forschungsarbeit mit einem Promotionsstipendium großzügig unterstützt und dieses Projekt dadurch ermöglicht und gefördert hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Medical Research School der Heinrich-Heine-Universität für die Schaffung von Rahmenbedingungen, die Bereitstellung qualitativ hochwertiger Weiterbildungskurse und die Beantwortung aller Fragen rund um die Initiation, Erstellung und Vervollständigung dieser Dissertation.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken. Liebe Mama, lieber Papa, ohne eure uneingeschränkte, liebevolle Unterstützung wäre all das nicht möglich gewesen. Als kleine Geste der Dankbarkeit widme ich diese Dissertation daher euch beiden. Liebe Iris, Doro, Hannah, Greta und Katharina, lieber Horst, Matthias, Felix, Lutz und Fabian ich bedanke mich für eure Liebe und euren Rückhalt. Lieber Basti, danke, dass du mich neben all den Prüfungen und Herausforderungen auch bei diesem Projekt wieder bedingungslos und mit vollem Einsatz unterstützt hast. Einen besseren Labor- und Arbeitspartner (und Ehemann) gibt es in meinen Augen nicht.