

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

**Einfluss humaner Fibroblasten
auf tumorrelevante Eigenschaften
muskelinvasiver Urothelkarzinom-Zelllinien**

Dissertation

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

vorgelegt von
Bastian Frerichs

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Bernd Bittersohl

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

Für meine Eltern,
Marion und Lutz.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Frerichs LM, Frerichs B, Petzsch P, et al. Tumorigenic effects of human mesenchymal stromal cells and fibroblasts on bladder cancer cells. *Frontiers in Oncology* 2023;13 (Original Research) (in English). DOI: [10.3389/fonc.2023.1228185](https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1228185).

Zusammenfassung (deutsch)

Das muskelinvasive Urothelkarzinom der Harnblase (MIUC) gehört zu den häufigsten malignen urologischen Tumorentitäten. Auf Grund einer hochgradigen intra- und intertumoralen Heterogenität sowie einer hohen Mortalitätsrate bei zugleich limitierten Therapiealternativen stellt es bis heute eine große klinische und wirtschaftliche Herausforderung dar.

Für einige Tumorentitäten konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass Fibroblasten (FB) als Bestandteil des Tumormikromilieus (TMM) den aggressiven Phänotyp der Tumorzellen modifizieren können, so dass erste medikamentöse Therapieoptionen, abzielend auf die von Fibroblasten mitbeeinflussten Signalkaskaden, entwickelt werden konnten. Trotz erster erfolgversprechender Ergebnisse ist das Wissen zum Einfluss humaner FB auf tumorrelevante Eigenschaften muskelinvasiver Urothelkarzinom-Zelllinien (UCC) noch limitiert, sodass dies Gegenstand der vorliegenden Arbeit war.

Um die parakrine Wirkung humaner FB auf den aggressiven Phänotyp von UCC zu untersuchen, wurde konditioniertes Medium (KM) mit Hilfe primärer FB-Kulturen gewonnen. Dieses mit löslichen Signalfaktoren angereicherte Medium wurde zur Behandlung der muskelinvasiven UCC BFTC-905, VMCUB-1 und UMUC-3 genutzt. Nach Inkubation der UCC in KM wurden die Auswirkungen des KM auf verschiedene tumorrelevante Eigenschaften analysiert. In diesem Rahmen wurden die Effekte der FB auf die proliferative (Zellviabilitätsassay), migratorische (Wound-Healing-Assay) und invasive Kapazität (Boyden-Chamber-Assay) sowie die Cisplatinresistenz (Zellviabilitätsassay) der UCC bestimmt. Auf Grund der zunehmenden klinischen Bedeutung von Immuntherapien für das MIUC wurden die Auswirkungen des KM auf die PD-L1- und PD-L2-Expression der UCC überprüft. Weiterhin erfolgten Untersuchungen der apoptotischen Eigenschaften (Bcl, Bcl-XL, Survivin), des Stammzellcharakters (CK14) und des zellulären Phänotyps (E-Cadherin, Vimentin, ZEB-1, α -SMA) der UCC. Die Untersuchungen wurden durch Expressionsanalysen der Invasivitäts- und Metastasierungsmarker CXCR4 und CD44 vervollständigt.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte für alle untersuchten UCC ein Einfluss der FB auf tumorrelevante Eigenschaften nachgewiesen werden. So förderten die löslichen Faktoren der FB im KM die Proliferation, Cisplatinresistenz und Invasivität der Tumorzellen. In Bezug auf andere Aggressivitätsmerkmale fiel die Wirkung des KM UCC-spezifisch aus, so resultierte die KM-Behandlung von BFTC-905 und UMUC-3 in einer Epithelial-mesenchymalen Transition.

In Zusammenschau deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die pharmakologische Modulation der von FB beeinflussten Signalkaskaden eine vielversprechende Therapieoption darstellen könnte.

Zusammenfassung (englisch)

Muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder (MIUC) is one of the most common malignant urological tumor entities and represents a significant clinical and economic challenge due to its high degree of intra- and intertumoral heterogeneity and high mortality rate, coupled with limited therapeutic options.

For several tumor entities, it has been demonstrated that fibroblasts (FB) within the tumor microenvironment (TME) can modify the aggressive phenotype of tumor cells, leading to the development of initial drug therapy strategies targeting the signaling cascades influenced by fibroblasts. Despite promising results, knowledge regarding the impact of human FBs on tumor-relevant properties of muscle-invasive urothelial carcinoma cell lines (UCC) remains limited, making this topic the focus of the present study.

To investigate the paracrine effects of human FBs on the aggressive phenotype of UCC, conditioned medium (CM) was generated using primary FB cultures. This medium, enriched with soluble signaling factors, was subsequently used to treat the muscle-invasive UCCs BFTC 905, VMCUB 1, and UMUC 3. After incubation of the UCCs in CM, subsequent experiments were conducted to analyze the effects of CM on various tumor-relevant properties. Within this context, the effects of CM on the proliferative (cell viability assay), migratory (wound-healing assay), and invasive capacity (Boyden chamber assay), as well as the cisplatin resistance (cell viability assay) of the UCCs, were determined. Regarding the increasing clinical importance of immunotherapies for MIUC, the effects of CM on the PD-L1 and PD-L2 expression of the UCCs were also examined. Furthermore, investigations were conducted into apoptotic properties (Bcl-2, Bcl-XL, survivin), stem cell characteristics (CK14) and cellular phenotype (E-cadherin, vimentin, ZEB1, α -SMA) of the UCCs. The investigations were completed by analyzing the expression of the invasion and metastasis markers CXCR4 and CD44.

The results of the present study demonstrated an influence of FBs on tumor-relevant properties across all UCCs examined. Soluble factors from FBs in CM promoted proliferation, cisplatin resistance, and invasiveness of the tumor cells. Regarding other aggressiveness traits, the effects of CM were UCC-specific; for instance, CM treatment of BFTC 905 and UMUC 3 lead to epithelial-mesenchymal transition, while VMCUB 1 responded conversely with an enhancement of epithelial characteristics, so called a mesenchymal-epithelial transition.

In summary, the available results suggest that pharmacological modulation of the signaling cascades influenced by FB could represent a promising therapeutic option.

Abkürzungsverzeichnis

A. dest	Aqua destillata	DKK-1	Dickkopf-1
Abb	Abbildung	DMEM	Dulbecco's modified eagle medium ohne GlutaMAX-Zusatz (Kontrollgruppe)
AKT/PKB	Protein kinase B		
ANOVA	Analysis of variance		
AP1	Activator protein 1	DMSO	Dimethylsulfoxid
APC	Allophycocyanin	DNA	Deoxyribonucleic acid
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1	DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline with Ca ²⁺ and Mg ²⁺
APZ	Antigenpräsentierende Zelle	ECM	Extrazelluläre Matrix
BAD	Bcl-2 antagonist of cell death	ECR	Extrazellulärraum
BAK	Bcl-2 homologous antagonist killer	ECP	Effektorcaspasen
BAX	Bcl-2 associated X protein	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Bcl-2	B-cell-lymphoma-2	E-Box	Enhancer-Box
Bcl-XL	B-cell-lymphoma extra large	EGF	Epidermal growth factor
BMP	Bone morphogenic proteins	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
BSA	Bovine serum albumin fraction V	EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
BTA	Blasentumor-assoziiertes Antigen	ERβ	Östrogenrezeptor-β
CAF	Cancer associated fibroblasts	ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
CCL	CC chemokine ligand	ET-1	Endothelin-1
CD	Cluster of differentiation	FADD	Fas-associated death domain protein
CD44s	CD44 standard isoforms	Fa	Firma
CD44v	CD44 variable isoforms	FAP	Fibroblast activation protein alpha
CK14	Cytokeratin 14	FACS	Fluorescence activated cell sorting
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	FB	Fibroblast
CP	Cisplatin	FBs	Fibroblasts
CSC	Cancer stem cell	FCS/FBS	Fetal bovine serum/Hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4		
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand		
CXCR	C-X-C motif chemokine receptor		
CytC	Cytochrom C	FGF	Fibroblast growth factor

FW	Forward	NFκB	Nuclear factor kappa B
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
gp	Glykoprotein	NP40	Neonidet-P40
HCL	Hydrochloric acid	n	Anzahl der KM-Gesamtpools
HGF	Hepatocyte growth/scatter factor	P	Kulturpassage
HRP	Horseradish peroxidase	PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
IAP	Apoptose-Inhibitoren	PAR6	Partitioning defective 6 homolog alpha
ICR	Intrazellularraum	PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline without Ca ²⁺ and Mg ²⁺
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase	PC	Pro-caspase
IgG	Immunglobulin G	PCR	Polymerase chain reaction
IKK2-β	Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit-β	PD-L1/2	Programmed cell death ligand-1/2
IL	Interleukin	PD-1	Programmed cell death protein-1
JAK	Januskinase	PDGF	Platelet-derived growth factor
JÜR	Jahresüberlebensrate	Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
KI	Konfidenzintervall	PGE-2	Prostaglandin E ₂
KM	Konditioniertes Medium	PI3K	Phosphoinositide-3-kinases
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	PIM	Proto-oncogene serine/threonine protein kinase PIM
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1	PKC	Protein kinase C
MDR	Multiple drug resistance membrane transporter	PVDF	Polyvinylidendifluorid
MHC	Major histocompatibility complex	qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
MIUC	Muskelinvasives Urothelkarzinom der Harnblase	RAC	Rac family small GTPase
Mit	Mitochondrienmembran	RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
miRNA/miR	Micro ribonucleic acids	RAS	Rat sarcoma
MMP	Matrixmetalloproteinase	RBP-Jκ	Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
mRNA	Messenger RNA	RHOA	RAS homolog family member A
NMP22	Nukleäres Matrix Protein 22	RIPA	Radioimmunoprecipitation
NMUC	Nicht-muskelinvasives Urothelkarzinom der Harnblase		
NaCl	Natriumchlorid		

	assay buffer	A	Ampere
RNA	Ribonucleic acid	°C	Grad Celsius
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies	cm ²	Quadratzentimeter
RV	Reverse	d	Tag
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1	h	Stunde
SD	Standardabweichung	kDa	Kilodalton
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspases	mg min	Milligramm Minute
SMAD	Caenorhabditis elegans SMA and mothers against decapentaplegic family	ml mm ms	Milliliter Millimeter Millisekunde
SP1	Specificity protein-1	nm	Nanometer
STAT	Signal transducers and activators of transcription	pmol RT	Pikomol Raumtemperatur
TAZ	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif	V µg	Volt Mikrogramm
TBS	Tris-buffered saline	µl	Mikroliter
TβRI	TGF-β-Rezeptor I	µM	Mikromolar
TβRII	TGF-β-Rezeptor II	µm	Mikrometer
TGF-β	Transforming growth factor-β		
TMM	Tumormikromilieu		
TNF	Tumornekrosefaktor		
TR	Todesrezeptor		
TReg	Regulatorische T-Zelle		
TR-L	Todesrezeptor-Ligand		
Tris-HCL	Tris-Hydrochlorid		
TZ-R	T-Zell-Rezeptor		
UC	Urothelkarzinom der Harnblase		
UCC	Urothelkarzinomzelllinien		
VEGF	Vascular endothelial growth factor		
VK	Vorkonditioniert		
Wnt	Wingless and int 1		
YAP	Yes-associated protein		
ZEB 1/2	Zinc finger E-Box binding homeobox 1/2		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Urothelkarzinom der Harnblase.....	1
1.2	Fibroblasten als Bestandteil des Tumormikromilieus (TMM).....	4
1.2.1	Interaktionen im Tumormikromilieu.....	5
1.2.2	Effekte der FB auf die Proliferation und Apoptose	7
1.2.3	Modulation der Cisplatinresistenz und des Stammzellcharakters	9
1.2.4	Effekte von FB auf den Immunphänotyp	11
1.2.5	Auswirkungen der FB auf die Migration und Invasivität	13
1.2.6	Einfluss auf die Metastasierung und den zellulären Phänotyp	15
1.3	Ziele der Arbeit	20
2	Material	21
2.1	Chemikalien, Reagenzien, Kits, Antikörper und weitere Materialien	21
2.2	Geräte, Software und Datenbanken	26
3	Methoden	28
3.1	Rahmenbedingungen.....	28
3.2	Zellkultur	28
3.2.1	Wechsel des Nährmediums und Passagieren von Zellkulturen	28
3.2.2	Zellzählung und Vitalitätstestung.....	28
3.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
3.2.4	Patientenmaterial	29
3.2.5	Urothelkarzinom-Zelllinien	32
3.3	Zellbasierte Experimente	34
3.3.1	Viabilitätsbestimmung mit CellTiter®-Blue	34
3.3.2	Proliferations- und Resistenzanalyse	34
3.3.3	Einfluss der FB auf die Migration der UCC	35
3.3.4	Invasionsanalyse	36
3.4	Molekulare Analysen	38

3.4.1	Genexpressionsanalysen (qRT-PCR).....	38
3.4.2	Proteinexpressionsanalysen (Western Blot, ELISA, FACS).....	39
3.5	Lichtmikroskopische Phänotypisierung	42
3.6	Statistik	43
4	Ergebnisse.....	44
4.1	Überprüfung der Nährstoffkonstitution des KM	44
4.2	Einfluss von KM auf den aggressiven Phänotyp von UCC	45
4.2.1	Effekte auf die Proliferation.....	45
4.2.2	Auswirkungen der FB auf die Apoptose der UCC.....	47
4.2.3	Modulation der Cisplatinresistenz durch das KM	49
4.2.4	Einfluss auf den Stammzellcharakter der UCC.....	50
4.2.5	Effekte des KM auf den Immunphänotyp	52
4.2.6	Auswirkungen des KM auf die Migration	53
4.2.7	Modulation der Invasivität der UCC.....	55
4.2.8	Einfluss von FB auf die Metastasierung und den zellulären Phänotyp	58
5	Diskussion.....	70
5.1	Einfluss von KM auf tumorrelevante Eigenschaften von UCC	70
5.1.1	Effekte auf die Proliferation und Apoptose	70
5.1.2	Modulation der Cisplatinresistenz und des Stammzellcharakters	71
5.1.3	Effekte auf den Immunphänotyp	74
5.1.4	Auswirkungen auf die Migration und Invasivität	75
5.1.5	Einfluss auf den zellulären Phänotyp und die Metastasierung	77
5.2	Limitationen und Perspektiven des Versuchskonzept	82
5.2.1	Vor- und Nachteile von KM	82
5.2.2	Behandlungskonzept der UCC mit KM	83
5.2.3	Fibroblasten vs. Cancer associated fibroblasts (CAF).....	84
5.2.4	Auswahl der Urothelkarzinom-Zelllinien.....	86
5.3	Fazit.....	88
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	89

7	Anhang	104
7.1	Zusammenfassende Übersicht der UCC-spezifischen Effekte des KM.....	104
8	Danksagung	106

1 Einleitung

1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase

Das Urothelkarzinom der Harnblase (UC) ist mit einer Inzidenz von 13 500 Neuerkrankungen pro Jahr die vierthäufigste Tumorentität männlicher Patienten (Daten für Deutschland, Stand 2020) [1, 2]. Frauen erkranken zwar insgesamt seltener an einem UC, weisen aber insbesondere für fortgeschrittene Tumorstadien höhere Sterblichkeitsraten auf [3, 4]. Der zu erwartende weitere Anstieg der Fallzahlen im Rahmen der demographischen Entwicklung aber auch die hohe Mortalitätsrate unterstreichen den Bedarf eines tiefgreifenden Verständnisses der zugrundeliegenden Pathophysiologie und neuer Therapiestrategien [1, 5].

Zusätzlich aggraviert wird die hohe Inzidenz des UC dadurch, dass sich die betroffenen Patienten lange symptomarm präsentieren und eine Mikrohämaturie als mögliches Frühsymptom oft verkannt wird, weshalb mehrheitlich die Einleitung diagnostischer Schritte zeitlich verzögert erfolgt [1]. Bis heute konnten sich weder Vorsorgeuntersuchungen noch diagnostische Screening-Marker (z. B. Nukleäres Matrix Protein (NMP22) oder Blasentumor-assoziiertes Antigen (BTA)) im klinischen Alltag durchsetzen [1, 6]. Die Diagnostik des UC der Harnblase beschränkt sich daher auf eine vollständige Urethrozystoskopie sowie sono- und tomographische Bildgebungen [1, 6]. Entscheidend für die Diagnosesicherung ist die Entnahme von Gewebeproben und deren histologische Analyse [1, 6].

Der überwiegende Teil aller Harnblasentumore entwickelt sich aus dem Urothel, einem mehrschichtigen Epithel, welches die gesamten ableitenden Harnwege ausgehend vom Nierenbecken bis hin zur proximalen Urethra luminal auskleidet [1, 7, 8]. Ergänzende Informationen über den physiologischen Aufbau aller Harnblasenwandschichten lassen sich Abb. 1 entnehmen.

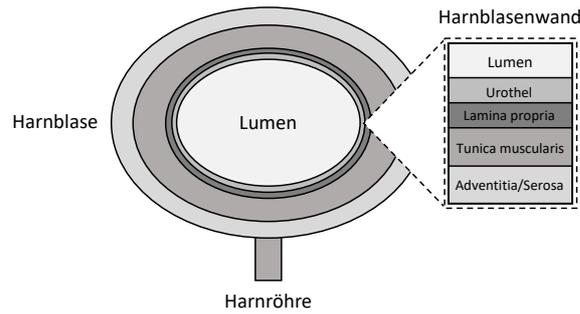


Abb. 1: Schematische Anatomie der Harnblase. Das Urothel kleidet die Harnblase als mehrschichtiges Übergangsepithel von innen aus und dient als Schutzbarriere gegenüber harnpflichtigen Substanzen [7,8]. Zusammen mit der angrenzenden Lamina propria, einer dicht vaskularisierten Bindegewebsschicht, bildet das Urothel die Tunica mucosa [7,8]. In direktem Kontakt mit der Lamina propria steht die Tunica muscularis [7,8]. Sie umfasst komplex angeordnete, mehrschichtige und überwiegend glatte Muskelstränge, die eine effiziente Harnblasenentleerung gewährleisten [7,8]. Die bindegewebige Tunica adventitia grenzt die Harnblase nach außen hin ab [7,8]. Abb. modifiziert nach N. Ulfig, Kurzlehrbuch Histologie [7].

Die histologische Einordnung und das *Staging* bilden die Grundlage der Stadieneinteilung des UC der Harnblase, die anhand der aktuellen TNM-Klassifikation (Tabelle 1) erfolgt [1]. Diese berücksichtigt neben der Invasionsstiefe der Harnblasenwandschichten auch die Infiltration umliegender Gewebe, den Lymphknotenbefall und den Nachweis einer Fernmetastasierung [1].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation zur Stadieneinteilung des UC der Harnblase. Modifiziert nach der S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0, 2020 [1].

Klassifikation	Tumor
T	Primärtumor
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 Gewebe ein: Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus, Vagina, Beckenwand/Abdominalwand
T4a	Tumor dringt ein in Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus oder Vagina
T4b	Tumor dringt ein in Beckenwand oder Abdominalwand
N	Regionäre Lymphknoten
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen

N1	Metastase(n) in einem solitären Lymphknoten des kleinen Beckens (hypogastrische, Obturator-, externe iliace oder präsakrale Lymphknoten)
N2	Metastase(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 nichtregionäre Lymphknoten
M1b	Andere Fernmetastasen

Die Infiltration der Harnblasenmuskulatur gilt als kritisch hinsichtlich der Tumorprogression mit schwerwiegenden Folgen in Bezug auf die Prognose, Rezidivwahrscheinlichkeit und Therapie eines UC [1, 9]. Nicht-muskelinvasive UC (NMUC, TNM-Stadien: cTa - T1) sind in der Regel lokalen Therapieverfahren zugänglich und zeichnen sich durch eine 10-Jahresüberlebensrate (JÜR) von über 80 % aus [1, 3]. Muskelinvasive UC (MIUC, TNM-Stadien: cT2 - T4 cN0/NX M0) hingegen bedürfen im kurativen Ansatz einer ausgedehnten operativen Resektion und einer (neo-) adjuvanten cisplatinhaltigen Kombinationschemotherapie, die je nach Ansprechen auf eine Zweitlinientherapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (z. B. Pembrolizumab oder Nivolumab als PD-1-Rezeptor-Inhibitoren (engl. *programmed cell death protein 1*)) eskaliert werden muss [1]. Trotz dieses aggressiven, multimodalen therapeutischen Vorgehens liegt die 5-JÜR von Patienten mit einem Tumor im T2-Stadium unter 40 % [3, 4, 5, 9]. Wird im Rahmen der *Staging*-Untersuchungen eine Fernmetastasierung detektiert, reduziert sich die durchschnittliche Überlebensdauer der Patienten weiter und liegt dann bei 13 Monaten [3, 4, 5, 9]. Insbesondere durch den Einsatz neuer Medikamente aus dem Bereich der Immuntherapeutika besteht die Hoffnung, die Überlebensrate der Patienten bessern zu können. In der neoadjuvanten Behandlung von MIUC konnten aktuelle Studien zwar keinen grundsätzlichen Vorteil der Immuncheckpoint-Inhibitoren gegenüber einer Kombinationschemotherapie nachweisen, jedoch wird bei positiven PD-L1 (engl. *programmed cell death ligand*) Nachweis > 1 % auf der Tumorzelloberfläche für Nivolumab als PD-1-Rezeptor-Inhibitor die Anwendung bereits in der Erstlinientherapie empfohlen [10]. Zudem werden zunehmend Therapieansätze untersucht, die als sogenannte „Sandwich-Therapie“ aus

einer neoadjuvanten Chemotherapie, einer radikalen Zystektomie sowie dem anschließenden Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren bestehen [10]. Weiteres hierzu wird in Abschnitt 1.2.4 ausführlicher beschrieben.

Die hohe Prävalenz und Mortalitätsrate sowie eine rasche Resistenzentwicklung gegenüber klassischen Chemotherapeutika machen die Notwendigkeit der Entwicklung und Etablierung neuer Therapiestrategien deutlich [1,5]. In diesem Kontext rückt das Tumormikromilieu (TMM, syn. Tumorstroma, Tumormikroumgebung) als neues therapeutisches Ziel in diversen Forschungsgruppen zunehmend in den Fokus [1,9,11,12]. Als TMM wird das nähere Umfeld eines Tumors bezeichnet, welches sich aus den umliegenden Gewebezellen, der extrazellulären Matrix (ECM) und sezernierten Signalmediatoren zusammensetzt [11,12]. Die heterogenen Bestandteile des TMM üben bewiesenermaßen einen starken Einfluss auf die Entstehung, Entwicklung und Aggressivität neoplastischer Zellen aus [11,12,13]. Neben anderen Zelltypen sind Fibroblasten (FB) dabei von besonderer Bedeutung für die Entwicklung TMM-basierter Therapien, da diese Bindegewebszellen in der Tumorumgebung regelhaft in hoher Zahl vorkommen und das Wachstum, die Therapieresistenz, die Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen modulieren können [11,12,14,15]. Obwohl Ansätze einer antikanzerogenen medikamentösen Modulation der FB für diverse Tumorentitäten im Allgemeinen vielversprechende Ergebnisse zeigten, ist über ihren spezifischen Einfluss auf tumorrelevante Eigenschaften des MIUC der Harnblase bis heute vergleichsweise wenig publiziert [16,17,18]. Entsprechung ist das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit das bisherige Wissen zu ergänzen und ein mögliches MIUC-spezifisches therapeutisches Potenzial von FB zu ermitteln.

1.2 Fibroblasten als Bestandteil des Tumormikromilieus (TMM)

FB repräsentieren den häufigsten Zelltyp der verschiedenen Bindegewebsformen und sind obligat für den Erhalt und die Homöostase des Gewebes [11]. Sie koordinieren maßgeblich die Zusammensetzung und Dichte der ECM, indem sie den Aufbau durch die Sekretion verschiedener Moleküle (u. a. Kollagene, Proteoglykane, Glykoproteine) fördern, aber auch die Degradation mit Hilfe lytischer Enzyme (z. B.

Matrixmetalloproteinasen (MMPs), Kollagenasen) steuern können [11, 12, 19]. Neben der ECM beeinflussen FB auch die zelluläre Konstitution des Bindegewebes, indem sie Zellen (bspw. Leukozyten) aktiv in das Gewebe rekrutieren [11]. Im Rahmen dieser Eigenschaften sind FB, aber auch zelluläre Subtypen wie die weiter differenzierten Myofibroblasten, maßgeblich an komplexen Prozessen wie der Wundheilung und Geweberegeneration beteiligt [11, 12, 13].

Als Bestandteil des TMM können FB durch eine intensive bidirektionale Interaktion mit den Tumorzellen in einen mobilen Phänotyp mit gesteigerter proliferativer und sekretorischer Aktivität übergehen [11, 12, 13, 20, 21]. Dieser Prozess geht mit einem veränderten Sekretom der FB einher, wodurch sie tumorrelevante Eigenschaften, die Zusammensetzung der ECM, die Gewebevaskularisation und das immunologische Milieu gezielter modifizieren können [12, 13, 22]. Trotz dieser Beobachtungen ist eine abschließende Aussage, dass FB vorrangig einen aggressiven Phänotyp von Tumorzellen unterstützen, nicht möglich [22, 23, 24, 25]. Diverse Studien weisen darauf hin, dass eine Akkumulation von FB in der Mikroumgebung einiger Tumorarten mit einer verschlechterten Prognose der Patienten assoziiert ist [22, 23, 24, 25], andererseits sind für FB durchaus auch tumorsupprimierende Eigenschaften beschrieben worden [26]. Die Arbeitsgruppe Pallangyo et al. (2015) konnte bspw. eine IKK2- β -vermittelte (engl. *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*) inhibitorische Wirkung von FB auf das Wachstum kolorektaler Karzinome demonstrieren [26].

1.2.1 Interaktionen im Tumormikromilieu

Eine wichtige Grundlage der reziproken Interaktion zwischen den FB des TMM und den Tumorzellen ist die parakrine Signalübermittlung [12, 13, 19]. Diese basiert auf der Sekretion löslicher Mediatoren in den Extrazellulärraum (ECR), wodurch diese passiv zu den Zielzellen der näheren Umgebung diffundieren und nachfolgend eine biologische Reaktion bewirken [27]. In Tabelle 2 ist eine Übersicht beispielhafter Mediatoren aufgeführt, mit deren Hilfe FB nachgewiesenermaßen tumorrelevante Eigenschaften modulieren können [19, 28].

Tabelle 2: Ausgewählte FB-Mediatoren und ihre wichtigsten Effekte auf tumorrelevante Eigenschaften. Übergeordnet lässt sich die Mehrzahl der von FB sezernierten löslichen Faktoren den Substanzklassen der Zytokine, Chemokine, Hormone und Wachstumsfaktoren zuordnen [19, 28]. Die Wirkung der Mediatoren scheint häufig tumorspezifisch auszufallen [19, 28].

Mediatoren	Wirkung auf Tumorzellen
Zytokine	
IL-1 β	Förderung der Metastasierung [28]
IL-6	Steigerung der Proliferation/Migration/Invasivität, Neoangiogenese; Immunsuppression, Inhibition der Apoptose [19, 28, 29, 30, 31]
TGF- β	Förderung der Proliferation, Induktion einer Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), Immunsuppression [15, 20, 32]
Chemokine	
CCL2 (syn. MCP-1)	EMT-Induktion [28, 31]
CCL5 (syn. Rantes)	EMT-Induktion [28]
CXCL12 (syn. SDF-1)	Steigerung der Proliferation/Invasivität, Förderung der Cisplatinresistenz, Immunsuppression/antiinflammatorische Wirkung (M2-Makrophagen-Polarisation), Neoangiogenese [19, 33, 34, 35]
IL-8 (syn. CXCL-8)	Erhöhung der Invasivität, Neoangiogenese, EMT-Induktion, Immunsuppression und Zunahme der Resistenz gegenüber Immuntherapien, Förderung der <i>Cancer stem cell</i> (CSC, Tumorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften)-Population [19, 31, 32]
Wachstumsfaktoren	
EGF	Steigerung der Motilität/Invasivität [33]
HGF	Erhöhung der Proliferation/Migration, Förderung der Radio- und Chemotherapieresistenz, EMT-Induktion [36, 37]
PDGF	Neoangiogenese, Apoptose-Inhibition [28, 33]
VEGF	Neoangiogenese, Steigerung der Proliferation [28, 38]
Hormone	
ET-1	EMT-Induktion [28]
Weitere	
DKK-1	Erhöhung der Proliferation, Expansion der metastatischen Kapazität [21]
PAI-1	Förderung der Proliferation/Migration/Invasivität/Metastasierung, Apoptose-Inhibition, Neoangiogenese, Immunsuppression und antiinflammatorische Wirkung (M2-Makrophagen-Polarisation) [39, 31, 40]
PGE-2	Steigerung der Proliferation [28]
Diverse MMP-Subtypen (u. a. MMP1, MMP2, MMP3)	Unterstützung der Proliferation/Invasivität/Metastasierung, EMT-Induktion, erhöhte Chemotherapieresistenz [28, 29, 30, 31]

IL-1 β = Interleukin-1 β , IL-6 = Interleukin-6, TGF- β = Transforming growth factor β , CCL2 (syn. MCP-1) = CC-chemokine ligand 2, CCL5 (syn. Rantes) = CC-chemokine ligand 5, CXCL-12 (syn. SDF-1) = C-X-C motif chemokine ligand 12, IL-8 (syn. CXCL-8) = Interleukin 8, EGF = Epidermal growth factor, HGF = Hepatocyte growth/scatter factor, PDGF = Platelet-derived growth factor, VEGF = Vascular endothelial growth factor, ET-1 = Endothelin-1, DKK-1 = Dickkopf-1, PAI-1 = Plasminogen activator inhibitor-1, PGE-2 = Prostaglandin E₂, MMP = Matrixmetalloproteinasen

Die Anwendung moderner Methoden wie z. B. der differentiellen Ultrazentrifugation oder der Polymer-basierten Präzipitation ermöglichten erst kürzlich die Entdeckung weiterer Vektoren der parakrinen Signalübertragung [36, 41, 42, 43, 44]. So erfolgt ein Teil des Informationsaustausches zwischen FB und Tumorzellen bspw. mit Hilfe exosomaler MicroRNAs (engl. *micro ribonucleic acids*, syn. miRNAs/miR) [36, 41, 42, 43, 44]. Hierbei

handelt es sich um kurze RNA-Stränge, die nach ihrer Aufnahme in die Zielzelle systematisch in die Genregulation eingreifen können [36, 41, 42, 43, 44]. Die parakrine Signalübermittlung bleibt allerdings nicht die einzige Kommunikationsform im TMM [36]. Die Arbeitsgruppe Satoyoshi et al. (2015) konnte zeigen, dass die Invasionsaktivität von Magenkarzinomzellen durch FB gesteigert und der Effekt durch direkte Zellkontakte mit Hilfe von Lamellipodien und Filopodien vermittelt wurde [45].

Die nachfolgenden Kapitel sollen einen Überblick geben, welche tumorrelevanten Eigenschaften durch FB nach aktuellem Kenntnisstand beeinflusst werden können.

1.2.2 Effekte der FB auf die Proliferation und Apoptose

Die Proliferationsgeschwindigkeit von Tumorzellen ist einer der Parameter, der zu den maßgeblichen Einflussfaktoren auf die Prognose und das Outcome von Patienten mit einem MIUC der Harnblase sowie malignen Tumoren im Allgemeinen zählt [1, 4, 46, 47, 48]. Im Gegensatz zu muskelinvasiven Urothelkarzinomzelllinien (UCC), zu denen im Vergleich weniger Studien zu finden sind, ist für andere Tumorentitäten bereits vielfach ein proliferationsfördernder Effekt durch FB des TMM gezeigt worden [49, 50, 51, 52]. Die gesteigerte proliferative Kapazität der Tumorzellen scheint hierbei sowohl durch parakrine Signalfaktoren (u. a. IL-8, VEGF, CXCL12 oder exosomale miRNAs wie miR-500a-5p, miR-7) der FB als auch über direkte zelluläre Kontakte vermittelt zu werden [47, 53, 54, 55, 56].

Einige dieser Mediatoren entfalten ihren proliferationsfördernden Effekt, indem sie die Apoptoseinduktion der malignen Zellen inhibieren [47, 57, 58]. Die der Apoptose zugrundeliegenden Aktivierungswege und Regulationsmechanismen lassen sich nachfolgender Abb. 2 entnehmen.

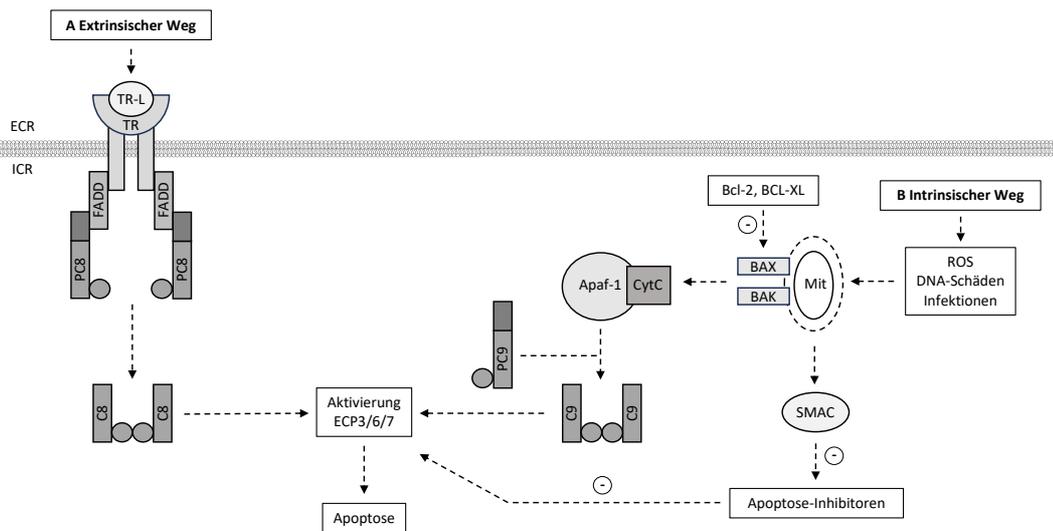


Abb. 2: Extrinsischer und intrinsischer Aktivierungsweg der Apoptose. A Extrinsischer Weg: Die Aktivierung des extrinsischen Weges erfolgt durch Mediatoren im ECR, die als Todesrezeptor-Liganden (TR-L) an zugehörige Todesrezeptoren (TR) der zu eliminierenden Zelle binden und denen u. a. der Tumornekrosefaktor (TNF) angehört [27, 59]. Die Aktivierung eines TR führt zur Rekrutierung des intrazellulär vorliegenden Adapterproteins FADD (engl. *fas-associated death domain protein*), welches wiederum an Procaspase-8-Moleküle (PC8) bindet [27, 59]. Durch Autokatalyse entsteht ein aktiviertes Caspase-8-Heterotetramer, welches die Apoptose durch Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 (ECP-3/6/7) einleitet [27, 59]. **B Intrinsischer Weg:** Der intrinsische Weg wird durch intrazelluläre Prozesse (z. B. oxidativer Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Chemotherapeutika) initiiert [27, 59]. Initial kommt es zu einer Erhöhung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (Mit), indem sich die mitochondrialen Proteine des Intermembranraumes BAX (engl. *Bcl-2 associated X protein*) und BAK (engl. *Bcl-2 homologous antagonist killer*) als Heterodimer zusammenlagern und Poren bilden [27, 59]. Durch diese Poren gelangen mitochondriale Proteine wie Cytochrom C (CytC) und SMAC (engl. *second mitochondria-derived activator of caspases*) ins Zytoplasma [27, 59]. CytC interagiert im Intrazellulärraum (ICR) mit Apaf-1 (engl. *apoptotic protease activating factor-1*) [27, 59] und ermöglicht die Rekrutierung der PC-9, die als intrinsische aktivierte Caspase-9 anschließend ebenfalls die Apoptose induziert [27]. Insbesondere die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 (engl. *B-cell-lymphoma-2*) und Bcl-XL (engl. *B-cell-lymphoma-extra-large*) inhibieren die Apoptoseinduktion durch Bindung an die Porenbildner BAX und BAK [27, 59]. SMAC hingegen wirkt proapoptotisch, indem es andere intrazellulär vorliegende Apoptose-Inhibitoren (IAP), zu denen bspw. das Protein Survivin gehört, hemmt [27, 59, 60]. Abb. modifiziert nach Löffler et al. [27].

Eine Dysregulation der extrinsischen und intrinsischen Apoptose stellt einen wichtigen Schritt in der Tumorgenese und -progression dar und resultiert in einer potenziellen Immortalisierung der Tumorzellen, wodurch diese zunehmend genetische Aberrationen akkumulieren und unkontrolliert proliferieren können [27]. Es sind diverse Mechanismen beschrieben, über die die oben aufgeführten proliferationssteigernden Mediatoren der FB eine antiapoptotische Wirkung auf neoplastische Zellen entfalten [57, 58]. Eine Möglichkeit besteht in einer reduzierten Expression proapoptotischer Proteine, wodurch antiapoptotische Signalwege überwiegen [57, 58]. Das von FB sekretierte Chemokin CXCL12 z. B. führt durch die Bindung an den zugehörigen CXCR4-Rezeptor (engl. *C-X-C motif chemokine receptor 4*) auf der Oberfläche von Tumorzellen zu einer

Aktivierung des MAPK- und PI3K-Signalwegs (MAPK engl. *mitogen activated protein kinase*; PI3K engl. *phosphoinositide 3-kinases*), wodurch das Expressionsniveau des proapoptotischen Proteins BAD sinkt [57, 58]. Ein weiterer Mechanismus, über den FB die Apoptoseinitiation in Tumorzellen hemmen, ist die Inhibition der Expression von Effektorcaspasen, wodurch sowohl die intrinsische als auch extrinsische Aktivierung supprimiert werden [61, 62]. Die Erhöhung des Expressionsniveaus antiapoptotischer Regulatorproteine repräsentiert eine dritte Möglichkeit, mit deren Hilfe FB die Apoptose maligner Zellen verhindern können [62]. Die Arbeitsgruppen Long et al. (2019) und Yan et al. (2016) konnten in diesem Kontext eine Expressionssteigerung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Survivin nachweisen, die mit einer verringerten Apoptoserate von UCC und Ovarialzelltumoren einherging [61, 62]. Eine Hemmung der Apoptose durch FB führt jedoch nicht nur zu einer Steigerung des Tumorwachstums, sondern trägt auch zu einer erhöhten Resistenz gegenüber der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin bei, wenngleich zusätzliche Faktoren dabei eine Rolle spielen [62, 63]. Weitere Faktoren, über die FB die Cisplatinresistenz von Tumorzellen vermitteln können, werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

1.2.3 Modulation der Cisplatinresistenz und des Stammzellcharakters

Die Chemotherapie eines MIUC der Harnblase umfasst in der Regel verschiedene Medikamente, wie Vinblastin oder Adriamycin, jedoch gilt Cisplatin nach wie vor als effektivste Wahl für die Behandlung lokal fortgeschrittener sowie metastasierter Tumore und hat darüber hinaus radiosensibilisierende Eigenschaften [1, 64]. Die zytotoxische Wirkung beruht maßgeblich auf der Induktion von Inter- und Intrastrang-Quervernetzungen (engl. *crosslinks*) der DNA, die dann die Apoptose proliferierender (Tumor-) Zellen auslösen [64]. Eine primäre oder sekundäre Cisplatinresistenz stellt sowohl für die Behandlung eines MIUC als auch für andere Neoplasien (z. B. Ovarial-, Lungen- oder Hodenkarzinom) eine gewichtige Komplikation dar und reduziert die Gesamtüberlebenszeit der Patienten sowie die Wahrscheinlichkeit einer kurativen Therapie signifikant [1, 65]. Die Identifizierung von Mechanismen, über die die Cisplatinresistenz von Tumorzellen erhöht und Resistenzen überwunden werden

können, haben daher einen hohen wissenschaftlichen und klinischen Stellenwert [1, 64, 65]. Die Arbeiten einiger Forschungsgruppen legen nahe, dass FB des TMM die Cisplatin-Resistenzeigenschaften von Tumorzellen wesentlich beeinflussen können [63, 66, 67, 68]. So konnte wiederholt gezeigt werden, dass FB der Tumorumgebung die Cisplatinresistenz von Tumorzellverbänden erhöhten, indem sie die Plastizität, also die Anpassungsfähigkeit der Tumorzellen, weiter förderten [69, 70, 71]. Auch wenn das Wissen über die zu Grunde liegenden Signalwege dieses Effektes noch begrenzt ist, waren bereits erste Versuche einer medikamentösen Blockade der Interaktionen zwischen FB und Tumorzellen erfolgreich [17, 72]. So wiesen Li et al. (2016) nach, dass der Einsatz des CAF-Inhibitors (engl. *cancer-associated fibroblasts*) PT-100 die FB-Population kolorektaler Karzinome reduzierte. PT-100 inhibiert hierbei die Aktivierung von FAP (engl. *fibroblast activation protein alpha*), einem häufigen Oberflächenmolekül in Tumorzellen, wodurch das Tumorwachstum gehemmt und die Wirksamkeit platinhaltiger Chemotherapeutika verbessert wurde [17, 73].

Des Weiteren scheint neben der Förderung antiapoptotischer Signale (Abschnitt 1.2.2) insbesondere dem Umbau der ECM eine wichtige Bedeutung zuzukommen [74, 75, 76, 77, 78]. Der bidirektionale Kontakt mit den malignen Zellen hat eine intensiviertere Synthese von ECM-Bestandteilen und Zelladhäsionsmolekülen (z. B. Integrine oder Fibronectin) seitens der FB zur Folge [19, 78]. Einerseits steigen dadurch die Dichte und Steifigkeit der ECM an („desmoplastisches Tumorstroma“), andererseits bildet sich eine wachsende zelluläre Barriere, die die Tumorzellen gegenüber der Einwirkung von Cisplatin zunehmend abschirmt [78, 77].

Ein weiteres Stellglied über das FB die Cisplatin-Resistenzeigenschaften modulieren können, sind Tumorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften [69, 79]. Hierbei handelt es sich um spezialisierte Tumorzellen, die sich durch stammzelltypische Fähigkeiten wie die Möglichkeit einer multipotenten Differenzierung und Selbsterneuerung auszeichnen [69, 79]. Im Vergleich zu den übrigen Tumorzellen verfügen sie über einen effizienteren DNA-Reparaturapparat, exprimieren verstärkt transmembranöse MDR-Effluxpumpen (engl. *multiple drug resistance membrane transporter*) und können in ein zelluläres Ruhestadium mit verlangsamer Zellzyklus-Kinetik übergehen [69, 79, 80]. Im Rahmen dieser Eigenschaften sind diese Tumorzellen hochgradig resistent gegenüber

der Behandlung mit diversen Chemotherapeutika, zu denen auch Cisplatin gehört [69, 79, 80, 81, 82]. Neben der Vermittlung von Therapieresistenzen scheint dieser erhöhten Plastizität der Tumorzellen eine essenzielle Rolle in der Tumorgenese sowie der Entwicklung von Metastasen und Tumorrezidiven zuzukommen [69,83].

1.2.4 Effekte von FB auf den Immunphänotyp

Nicht zuletzt wegen der beschriebenen Konsequenzen einer Cisplatinresistenz (Abschnitt 1.2.3) wurden in der jüngeren Vergangenheit zusätzliche antikanzerogene Pharmazeutika für die Behandlung des MIUC der Harnblase erprobt [1]. Insbesondere der Einsatz von Wirkstoffen aus der Klasse der Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Nivolumab oder Pembrolizumab zeigte einen Überlebensvorteil bei Patienten, weshalb sie bereits heute fester Bestandteil der leitliniengerechten Therapie cisplatinresistenter MIUC sind [1, 84, 85]. Die Wirkung der Immuncheckpoint-Inhibitoren beruht auf einer Unterdrückung immunsuppressiver Signale, mit deren Hilfe sich die Tumorzellen der körpereigenen antitumoralen Immunabwehr entziehen [1, 84, 85]. Die molekularen Hintergründe dieses als Immunevasion (engl. *immune escape*) bezeichneten Prozesses werden in Abb. 3 ausführlicher dargestellt.

Die bereits erwähnte diametrale Wirkung der FB auf tumorrelevante Eigenschaften (Abschnitt 1.2) findet sich auch in der Literatur zum immunologischen Phänotyp wieder. So scheinen FB sowohl die körpereigene antitumorale immunologische Aktivität im TMM zu fördern als auch ein immunsuppressives Milieu etablieren zu können, welches die Immunevasion der Tumorzellen unterstützt [20, 86, 87, 88, 89]. Die zuletzt genannten immunsuppressiven Effekte der FB basieren zum einen auf einer direkten Beeinflussung des immunologischen Expressionsprofils der malignen Zellen, zum anderen auf einer Rekrutierung und Verstärkung antiinflammatorischer Immunzellen im TMM (z. B. Aktivierung regulatorischer T-Zellen (TReg), Inhibition zytotoxischer CD8⁺-T- (Effektorzellen, CD engl. *cluster of differentiation*) und NK-Zellen (Natürliche Killer-Zellen) [86, 89]. Weiterhin wirkt sich, analog zu den Veränderungen der Cisplatinresistenz-Eigenschaften, auch der von den FB induzierte desmoplastische Umbau der ECM (Abschnitt 1.2.3) auf das immunologische Milieu in Tumorzellverbänden aus [89]. Eine

hohe Dichte an Kollagenfasern hindert zytotoxische CD8⁺-T-Zellen an der Zytokinvermittelten Migration ins TMM und schränkt dadurch ihre immunologische Kontrollfunktion ein [90]. Hierzu haben Studien gezeigt, dass die exakte molekulare Zusammensetzung der pathologisch veränderten ECM im TMM entscheidend ist, da zwar die Migration einzelner Zelltypen selektiv inhibiert, gleichzeitig aber das migratorische, invasive und metastatische Potenzial der Tumorzellen gefördert wird [89, 91, 92, 93]. Dass die Modifikation der ECM nicht die einzige Möglichkeit einer Einflussnahme von FB auf invasions- und metastasierungsrelevante Eigenschaften von Tumoren ist, wird im nachfolgenden Textabschnitt deutlich.

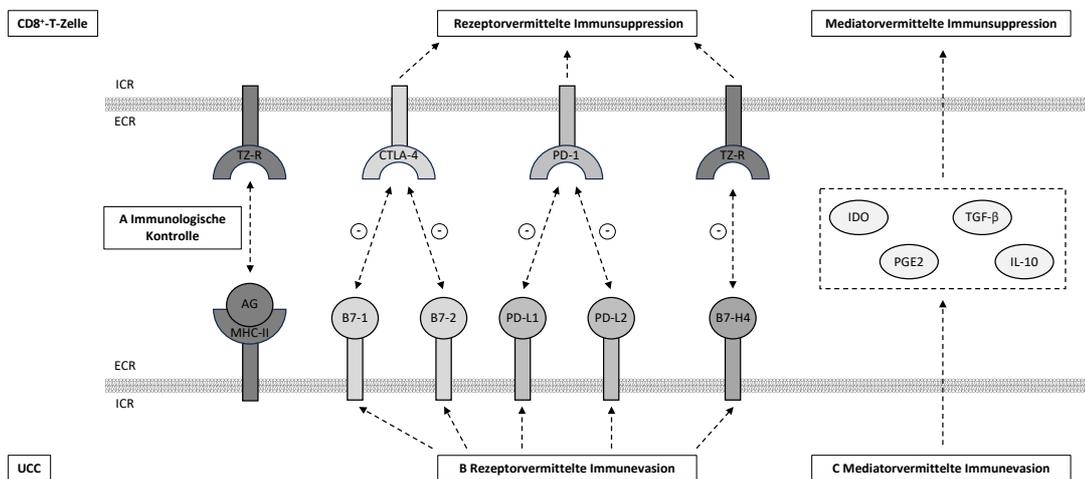


Abb. 3: Immunevasion von UCC. A Immunologische Kontrolle: Die immunologische Kontrolle körpereigener Zellen erfolgt durch CD8⁺-zytotoxische T-Zellen [27, 94]. Diese erkennen mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors (TZ-R) Antigene, welche von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) über MHC-II-Moleküle (syn. Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. *major histocompatibility complex*) auf der Zelloberfläche präsentiert werden [27, 94]. Erkennt ein TZ-R einen Antigen-MHC-II-Komplex, führt dies beim gleichzeitigen Vorliegen Co-stimulatorischer Signale zu einer Aktivierung der T-Zelle, was nachfolgend die Apoptose der APZ induziert [27, 94]. Der Prozess der T-Zell-Aktivierung unterliegt einer strengen Regulation, um auf der einen Seite einer Autoimmunität entgegenzuwirken, auf der anderen Seite aber defekte Zellen wie Tumorzellen (z. B. UCC) oder viral infizierte Zellen effektiv zu erkennen und zu eliminieren [27, 94]. **B Rezeptorvermittelte Immunevasion:** Durch die verstärkte Expression Co-inhibitorischer Liganden auf der Zelloberfläche gelingt es UCC die T-Zell-Aktivierung zu supprimieren, wodurch sie sich der immunologischen Kontrolle entziehen (Immunevasion) [94, 95]. Bedeutsame Co-inhibitorische Liganden sind in diesem Kontext PD-L1 und PD-L2, die durch die Interaktion mit dem PD-1-Rezeptor auf der T-Zell-Oberfläche immunsuppressiv wirken [94, 95]. Die Liganden B7-1 (syn. Lymphozyten-Aktivierungsantigen CD80) und B7-2 (syn. Lymphozyten-Aktivierungsantigen CD86) inhibieren die T-Zell-Aktivierung durch die Bindung an den transmembranösen CTLA-4-Rezeptor (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, CD152) [94, 95]. Daneben scheint die direkte Interaktion des TZ-R mit B7-H4 auf der Oberfläche von UCC ebenfalls zu einer Hemmung der T-Zell-Aktivierung zu führen [96]. **C Mediatorvermittelte Immunevasion:** Neben der rezeptorvermittelten Immunevasion sekretieren UCC diverse immunsuppressiv wirkende Signalmoleküle, zu denen insbesondere IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase), PGE-2 (Prostaglandin E₂), TGF-β und IL-10 gehören [94]. Abb. modifiziert nach Yang et al. und Crispen et al. [94, 95].

1.2.5 Auswirkungen der FB auf die Migration und Invasivität

Der Begriff Migration (lat. *migrare* = wandern) beschreibt die aktive Beweglichkeit von Zellen innerhalb eines Gewebes - eine Fähigkeit über die nicht nur Tumorzellen verfügen, sondern die auch Voraussetzung für viele physiologische Prozesse (z. B. Wundheilung, Inflammation, Embryogenese) ist [97,98,99]. Die Invasivität (lat. *invadere* = eindringen) hingegen beschreibt eine gerichtete Bewegung maligne transformierter Zellen, welche über die Grenzen des Ursprungsgewebes hinaus geht [97,98,99]. Letzteres zieht meist eine kontinuierliche destruktive Infiltration umliegender Organe nach sich [97,98,99]. Weisen Tumorzellen ein hohes migratorisches und invasives Potenzial auf, steigt auch die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung, d. h. die Absiedelung in fern liegende Organe durch den Transfer über das Blut- bzw. Lymphsystem [99,100,101,102]. Da der Nachweis von Fernmetastasen für die meisten Tumore, so auch für das MIUC der Harnblase, die Prognose maßgeblich verschlechtert und zudem die führende Todesursache darstellt, ist ein umfassendes Verständnis der Hintergründe der metastatischen Kaskade (Abschnitt 1.2.6) von großer therapeutischer Relevanz [9,102].

Ähnlich zu den im Vorfeld bereits vorgestellten tumorrelevanten Eigenschaften (Abschnitte 1.2.2 bis 1.2.4) können FB des TMM auch die Migration und Invasivität von Tumorzellen modulieren [103,104,105]. So bilden Gradienten löslicher Faktoren, welche von FB sekretiert werden, die Basis für eine gezielte Translokation von Tumorzellen durch das Gewebe [106]. Zu diesen Faktoren zählen insbesondere verschiedene Chemokine [27,106,107]. Dies sind proinflammatorische Signalproteine, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf der Zelloberfläche die Chemotaxis von (Tumor-) Zellen koordinieren [27,106,107]. Ein bereits genanntes prokanzerogenes und von FB sezerniertes Chemokin ist CXCL12 [58,107]. Neben einer Inhibition der Apoptose von Tumorzellen (Abschnitt 1.2.2) werden durch die Bindung an den zugehörigen CXCR4-Rezeptor auf der Tumorzelloberfläche weitere onkogene Signalwege (u. a. JAK/STAT- (engl. JAK *janus kinase*; STAT *signal transducers and activators of transcription*), PKC/MAPK- (engl. PKC *protein kinase C*; MAPK *mitogen-activated protein kinase*), NFκB-Signalweg (engl. *nuclear factor-κB*)) aktiviert [58,107]. Diese erhöhen nicht nur das migratorische, invasive und somit metastatische Potenzial der Zellen, sondern

steigern auch die Tumorproliferation und Neoangiogenese [58, 107]. Liu et al. (2016) konnten darüber hinaus auch für andere von FB exprimierte Chemokine, darunter CCL2, CCL5 und CCL7, einen migrations- und invasivitätsfördernden Effekt zeigen [108].

Die mobilitätssteigernde Wirkung vieler Chemokine konnte in diesem Zusammenhang auf eine Erhöhung des Expressionsniveaus des transmembranösen Hyaluronsäurerezeptors und CSC-Markers CD44 zurückgeführt werden (Abschnitt 1.2.3) [109, 110, 111, 112, 113]. Auf zellulärer Ebene vermittelt das Glykoprotein CD44, welches in verschiedenen Varianten vorkommt (CD44s engl. *standard isoforms*; CD44v engl. *variable isoforms*), diverse Funktionen wie Zellaggregation und -migration sowie die Lympo- und Hämatopoese [114]. Für Tumore kennzeichnet eine hohe CD44v-Expression in der Regel einen aggressiven Phänotyp und geht auch für das MIUC der Harnblase mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten einher [114, 115, 116]. Die molekularen Hintergründe, die dem migrations- und invasivitätsfördernden Effekt von CD44 zu Grunde liegen, sind noch nicht abschließend geklärt [117, 118]. Eine Hypothese ist, dass die Interaktion zwischen CD44 und der Hyaluronsäure, jedoch auch mit weiteren Bestandteilen der ECM (z. B. Kollagen, Laminin oder Fibronectin), mechanische Veränderungen des Zytoskeletts herbeiführen [114, 117, 118]. Gleichzeitig führt eine erhöhte CD44-Expression der Zellen zu einer verbesserten ECM-Adhäsion und einer gezielten Hyaluronsäure-Degeneration, was eine gerichtete Bewegung durch Gewebe mit hohem Hyaluronsäure-Anteil begünstigt [114, 117, 118]. Neben der Modulation des Zytoskeletts und der adhäsiven Eigenschaften, korreliert eine CD44-Aktivierung darüber hinaus mit einer Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) von Tumorzellen (Abschnitt 1.2.6.2) [115, 119]. Eine EMT zieht nicht nur eine Ausweitung der migratorischen und invasiven Kapazität nach sich, sie selbst stellt ein Schlüsselereignis der metastatischen Kaskade dar (Abschnitt 1.2.6.1) [120].

1.2.6 Einfluss auf die Metastasierung und den zellulären Phänotyp

1.2.6.1 Die metastatische Kaskade

Die zurückliegenden zwei Jahrzehnte haben zu einer umfassenden Erweiterung des bis dahin akzeptierten Modells der Metastasierungskaskade geführt [121, 122]. Ursprünglich wurde postuliert, dass diese aus der Abfolge von einer Initiationsphase (Fortschritt des Primärtumors mit Zugewinn metastatischer Eigenschaften, Loslösung einzelner Zellen aus dem primären Tumorzellverbund), der lokalen Gewebeinvasion mit Eintritt in das Blut- bzw. Lymphsystem, der systemischen Zirkulation sowie der Extravasation und Kolonialisierung im Zielgewebe bestehen würde [102, 121, 123]. Diese aufeinander aufbauende Abfolge scheint in dieser Form jedoch nicht mehr haltbar. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass z. B. schon in sehr frühen Tumorstadien entartete Zellen mit geringen genetischen Aberrationen und einem epithelialen Phänotyp in fernen Geweben nachweisbar sind und die Fähigkeit zur Metastasierung somit nicht ausschließlich fortgeschrittenen Tumoren vorbehalten oder einer linearen Zeitachse zuzuordnen ist [123, 124].

FB der ursprünglichen lokalen Tumorumgebung, aber auch solche des metastatischen Zielgewebes, scheinen die einzelnen Schritte der metastatischen Kaskade entscheidend zu beeinflussen [100, 102, 121, 125]. Die Auswirkungen von FB auf die Tumordissemination werden in Abb. 4 schematisch zusammengefasst.

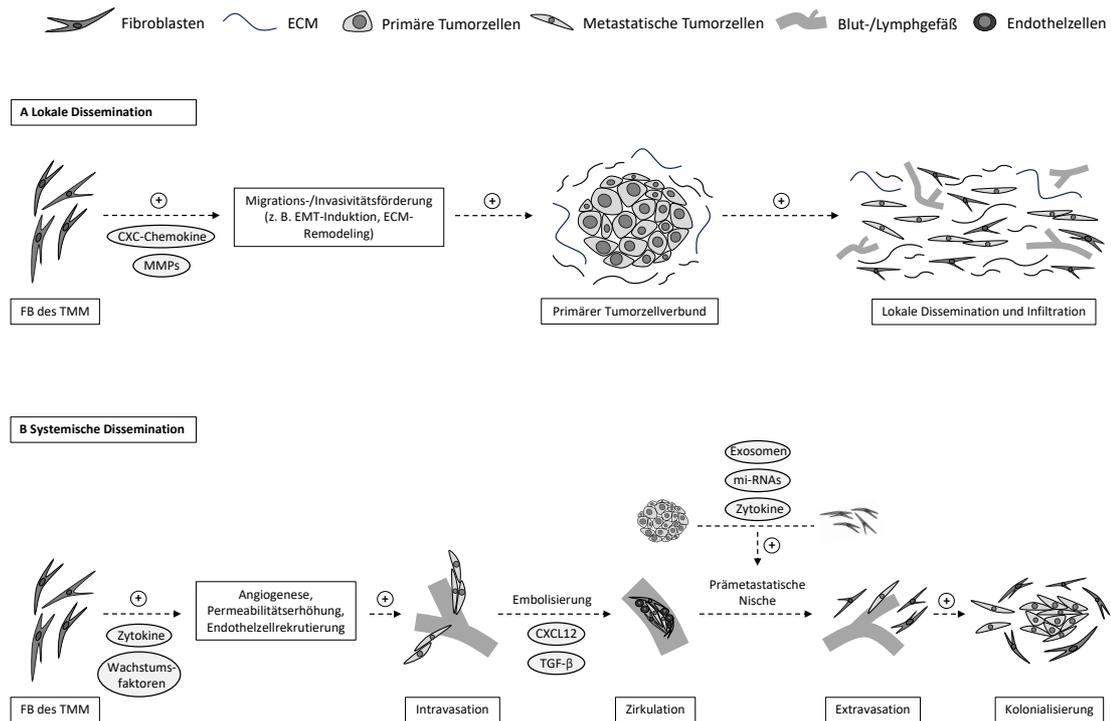


Abb. 4: Der Einfluss von FB auf die metastatische Kaskade. A Lokale Dissemination: Die FB der lokalen Tumorumgebung modulieren die migratorischen und invasiven Eigenschaften von Tumorzellen, wodurch deren Loslösung aus dem Primärtumor sowie die lokale Gewebedissemination und -infiltration begünstigt wird [100]. Die FB-vermittelte Mobilitätsförderung der Tumorzellen beruht u. a. auf der Induktion eines mesenchymalen Phänotyps (EMT), einer Reduktion intrazellulärer Adhäsionsmoleküle und einer gezielten Degradation der ECM, basierend auf der Wirkung verschiedener MMPs (z. B. MMP-2, -9, -13) [102, 121, 126]. **B Systemische Dissemination:** Durch die Sekretion verschiedener Zytokine (u. a. CXCL-12, TGF-β) und Wachstumsfaktoren, wie VEGF, PDGF und HGF entfalten FB eine proangiogene Wirkung, indem sie Zellen wie Endothelzellen ins Gewebe rekrutieren und die Gefäßpermeabilität erhöhen. Dies erleichtert den Tumorzellen die Intravasation in das Blut- bzw. Lymphgefäßsystem [72, 102, 121, 127]. Die ursprüngliche Annahme, einzelne neoplastische Zellen würden sich selektiv aus dem Primärtumor lösen und nach ihrer Intravasation isoliert und ungeschützt im peripheren Blut zirkulieren, gilt inzwischen als überholt [121]. Stattdessen scheinen kleine zusammenhängende Tumorzellverbände in das Gefäßsystem einzutreten, die sich während des systemischen Transportes mit einem wachsenden Schutzwall aus nicht-maligne-transformierten Gewebezellen, zu denen zirkulierende Endothelzellen und FB zählen, umgeben [121, 128]. Durch diese Zytokin-gesteuerte (TGF-β, CXCL12) Embolisierung schützen sich die malignen Zellen in der tumorfeindlichen Umgebung des Blutes wirksam vor der Eliminierung durch Immunzellen und der Einwirkung physikalischer Scherkräfte [121, 128, 129, 130]. Schließlich beeinflussen FB auch die letzten Abschnitte der metastatischen Kaskade, bestehend aus der Extravasation und der Dissemination in das Zielgewebe mit anschließender Kolonialisierung und der Ausbildung eines Zweittumors [102, 121, 130]. Noch vor der Loslösung und systemischen Zirkulation sekretieren Primärtumorzellen lösliche Faktoren (bspw. Exosomen, miRNAs, Zytokine), die über das Blutgefäßsystem zum Zielgewebe gelangen, wo sie auf die FB der metastatischen Mikroumgebung einwirken [130]. Die aktivierten FB formen als Folge eine prämetastatische Nische, indem sie insbesondere die ECM durch vermehrte Kollagen-Produktion umwandeln, ein immunsuppressives Milieu etablieren, die Gefäßdichte zur verbesserten Gewebedurchblutung erhöhen und metabolische Prozesse umprogrammieren [130]. Letzteres resultiert in einer gesteigerten aeroben Glykolyse der FB, wodurch vermehrt energiereiche Zwischenprodukte entstehen, die von den Tumorzellen genutzt werden können, um effektiver im Zielgewebe zu kolonialisieren und zu proliferieren [130, 131]. Abb. modifiziert nach Hussain et al. und Dong et al. [121, 130].

1.2.6.2 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Als EMT wird die Umwandlung eines epithelialen in einen mesenchymalen zellulären Phänotyp bezeichnet [120]. Sie repräsentiert ein relevantes Ereignis in der

metastatischen Kaskade, da der Erwerb mesenchymaler Eigenschaften (bspw. gesteigerte Mobilität, Kontraktilität und Invasivität) eine Loslösung der malignen Zellen aus dem Primärtumorzellverbund und eine Dissemination in das lokale Gewebe ermöglicht, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit eines Gefäßeintritts relevant erhöht [120]. Inzwischen konnte demonstriert werden, dass der Prozess dynamisch verläuft und bidirektional im Sinne einer mesenchymal-epitheliale Transition (MET) auch umgekehrt werden kann [132]. Während die pathophysiologischen Hintergründe der EMT derweil weitreichend diskutiert sind, ist über die MET weniger bekannt [132]. Gleichwohl ist die MET für die Tumormetastasierung relevant, indem die Tumorzellen nach der Extravasation im Zielgewebe im Rahmen der Kolonialisierung erneut einen epithelialen Phänotyp annehmen [101, 132, 133]. Die molekularen Grundlagen der EMT und MET werden in Abb. 5 verbildlicht.

Die Beobachtung, dass FB des TMM eine EMT von Tumorzellen induzieren können, ist auch für das UC der Harnblase von Bedeutung, denn der Nachweis einer EMT ist mit einer gesteigerten zellulären migratorischen, invasiven und metastatischen Kapazität sowie einer erhöhten Chemotherapieresistenz und verstärkter Angiogenese assoziiert [133, 134, 135]. Die prognostisch ungünstigen Folgen der EMT zeigen erneut die Bedeutung und Notwendigkeit einer intensiven Erforschung der Auswirkungen von FB auf den zellulären Phänotyp von UCC auf [133].

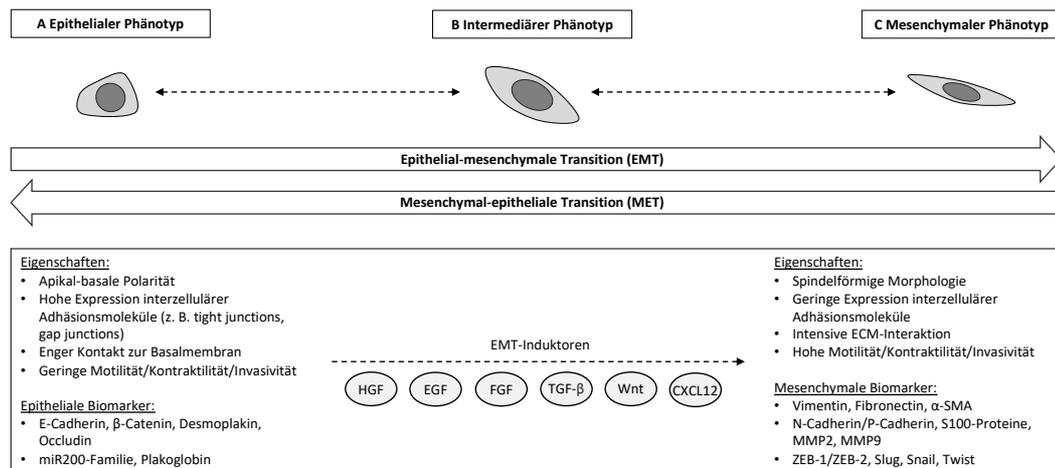


Abb. 5: Molekulare Grundlagen der EMT und MET. Die Umwandlung eines epithelialen in einen mesenchymalen zellulären Phänotyp wird als EMT bezeichnet [120, 132]. Hinsichtlich der Entwicklung und des Fortschritts maligner Tumore gilt sie als Zeichen erhöhter Aggressivität, da eine durchlaufene EMT die Metastasierungswahrscheinlichkeit potenziert [120, 132]. Auf molekularer Ebene kennzeichnet sich die EMT durch eine reduzierte Expression epithelialer Marker (u. a. E-Cadherin, β -Catenin, Desmoplakin, Occludin, miR200-Familie, Plakoglobin) bei gleichzeitiger Zunahme der Expression mesenchymaler Marker (z. B. Vimentin, Fibronectin, α -SMA (engl. *alpha smooth muscle actin*), N-Cadherin/P-Cadherin, S100-Proteine, MMP2, MMP9, ZEB-1/ZEB-2 (engl. *zinc finger E-Box binding homeobox 1/2*), Slug, Snail, Twist) [112, 120, 136, 137, 138, 139]. Durch das veränderte Expressionsprofil verlieren die Zellen ihren ursprünglichen epithelialen Charakter, gekennzeichnet durch eine hohe Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle sowie eine geringe Mobilität bei hoher Ortsständigkeit und erlangen stattdessen typische mesenchymale Eigenschaften wie eine gesteigerte Mobilität und Kontraktilität [120, 132, 138]. Zusätzlich ermöglicht das veränderte Proteom des mesenchymalen Phänotyps eine intensive Interaktion mit den Bestandteilen der ECM, wodurch die Invasivität der Zellen zunimmt [120, 132, 138]. Für eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren konnte bis dato eine EMT-induzierende Wirkung belegt werden, zu den wirksamsten EMT-Induktoren gehören jedoch die Wachstumsfaktoren HGF, FGF (engl. *fibroblast growth factor*) und EGF, die Zytokine TGF- β und CXCL12 sowie das Glykoprotein Wnt (engl. *wingless and int-1*) [112, 136, 137, 120, 138, 139, 140]. Viele der genannten EMT-Induktoren werden von FB der Tumorumgebung produziert und freigesetzt [133, 134]. Abb. modifiziert nach Kalluri et al. [120].

1.2.6.3 TGF- β -Signaltransduktion als Regulator der EMT

Das Zytokin TGF- β stellt einen der potentesten EMT-Induktoren dar, der von FB des TMM sekretiert wird [28, 141]. Das Polypeptid ist ein Prototyp der TGF- β -Superfamilie, zu der eine große Anzahl weiterer strukturell verwandter regulatorischer Proteine (z. B. BMP (engl. *bone morphogenic proteins*), Aktivine, TGF- β -Isoformen) gehören [141]. Bezüglich der Tumorprogression wird TGF- β eine pleiotrope Rolle zugeschrieben, da es initial die Proliferation von Tumorzellen inhibiert und ihre Apoptose induziert, in fortgeschrittenen Tumorphasen hingegen durch seine EMT-induzierende Wirkung die invasive und metastatische Kapazität fördert und folglich die Aggressivität der neoplastischen Zellen potenziert [28]. Vertiefende Informationen zu den Signalwegen, über die TGF- β die EMT von Tumorzellen bewirkt, lassen sich der Abb. 6 entnehmen.

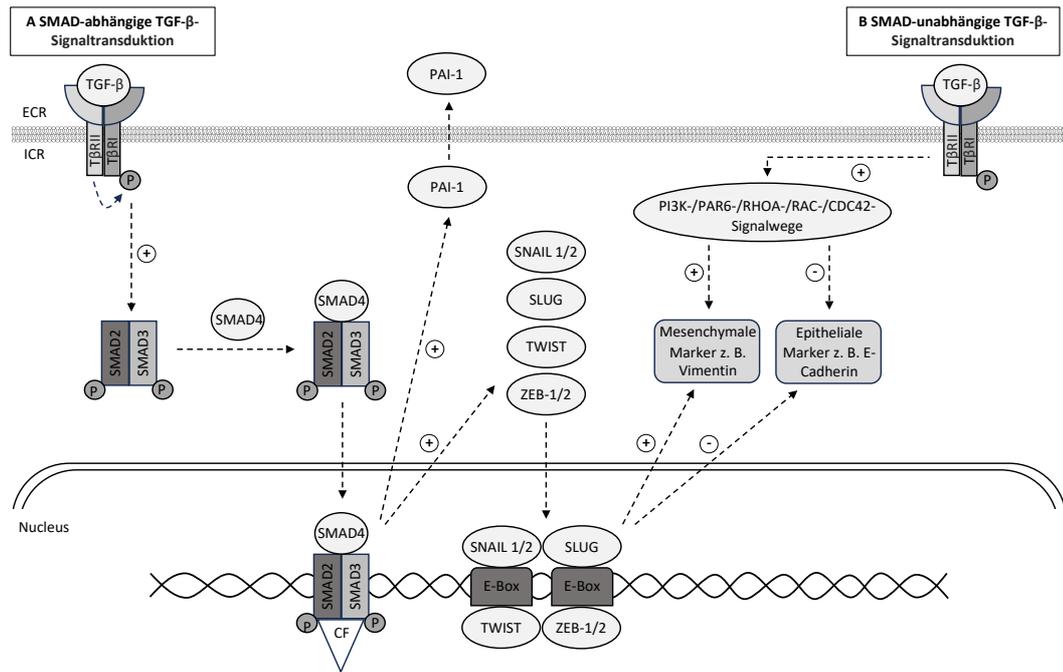


Abb. 6: TGF- β -vermittelte EMT-Induktion. A SMAD-abhängige TGF- β -Signaltransduktion: Die SMAD-abhängige (engl. *caenorhabditis elegans SMA and mothers against decapentaplegic family*) EMT-Induktion wird initiiert durch die Bindung von TGF- β an den membranständigen TGF- β -Rezeptor II (T β RII) [120, 133, 138, 140]. Dies bedingt die Rekrutierung des TGF- β -Rezeptors I (T β RI), der durch den T β RII phosphoryliert und dadurch aktiviert wird [120, 133, 138, 140]. Die Aktivierung führt zur Bindung und Phosphorylierung eines Heterodimers aus SMAD2 und SMAD3, wodurch eine Bindungsstelle für SMAD4 exponiert wird [120, 133, 138, 140]. Nach der Bindung von SMAD4 transloziert das Heterotrimer in den Zellkern und reguliert in Kooperation mit verschiedenen Cofaktoren (CF) als Transkriptionsfaktor die Transkription zentraler EMT-Gene [120, 133, 138, 140]. Hierzu zählen die EMT-Transkriptionsfaktoren Snail 1/2, Slug, Twist und ZEB-1/2 [120, 133, 138, 140]. Die genannten Transkriptionsfaktoren binden ihrerseits an zwei E-Boxen (engl. *enhancer-Box*), die Teil der Promotorregionen verschiedener EMT-Marker sind [120, 133, 138, 140]. Dies bewirkt eine gesteigerte Expression mesenchymaler EMT-Marker wie Vimentin sowie eine Reduktion des Expressionsniveaus epithelialer EMT-Marker (z. B. E-Cadherin) [120, 133, 136, 138, 140]. Ein weiteres Zielgen des SMAD-Heterodimers ist das Gen *Serpine-1*, welches für das Protein PAI-1 (engl. *plasminogen activator inhibitor 1*) kodiert [141]. **B SMAD-unabhängige TGF- β -Signaltransduktion:** Neben der SMAD-assozierten EMT-Induktion aktiviert die Bindung von TGF- β an den T β RII und die anschließende Ausbildung des T β RI-T β RII-Heterodimers multiple intrazelluläre SMAD-unabhängige Signalkaskaden, zu denen der PI3K-, PAR6- (engl. *partitioning defective 6 homolog alpha*), RHOA- (engl. *ras homolog family member A*), RAC- (engl. *rac family small GTPase*) und CDC42-Signalweg gehören [132, 141]. Die Aktivierung dieser Signalwege resultiert ebenfalls in der Induktion mesenchymaler EMT-Marker und der Reduktion der Expression epithelialer Proteine [132, 141]. Abb. modifiziert nach Lamouille et al. und Garg et al. [132, 133].

Erste Untersuchungen zeigen, dass auch die FB im TMM des MIUC der Harnblase eine TGF- β -induzierte EMT der Tumorzellen vermitteln können [142]. Jedoch wurden die Untersuchungen der TGF- β -Signalaktivität, ähnlich wie die die im Vorfeld beschriebenen anderen Merkmale des aggressiven Tumorphänotyps (Kapitel 1.2.2 bis 1.2.5), bislang nur für einige UCC-Subtypen durchgeführt. Um eine EMT-Induktion von MIUC via TGF- β medikamentös gezielt unterbinden zu können, bedarf es somit einer Erweiterung der bisherigen Analysen [142].

1.3 Ziele der Arbeit

Für zahlreiche Tumorentitäten wurden FB des TMM inzwischen als Modifikatoren des aggressiven Phänotyps von Tumorzellen identifiziert. Im Rahmen dieser Erkenntnisse konnten erste Strategien einer therapeutischen Modulation der FB des TMM entwickelt werden, die neue und vielversprechende Perspektiven für zukünftige antitumorale Therapien erwarten lassen. Die hohe Inzidenz, eine zügige Resistenzentwicklung gegenüber klassischen Chemotherapeutika sowie eine schlechte Prognose der Patienten mit einem MIUC verdeutlichen jedoch auch den dringlichen Bedarf an neuen Therapieoptionen. Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss humaner FB auf tumorrelevante Eigenschaften der muskelinvasiven UCC BFTC905, VMCUB1 und UMUC3. Hierzu wurde zunächst konditioniertes Medium (KM) aus Primärkulturen humaner FB gewonnen, prozessiert und nachfolgend zur Behandlung der UCC verwendet. Anschließend wurden die Auswirkungen der löslichen Signalfaktoren der FB im KM auf aggressive Eigenschaften der UCC analysiert, wobei insbesondere Aspekte der Proliferation, Cisplatinresistenz, des Immunphänotyps, der Apoptose und der Stammzeleigenschaften der UCC fokussiert wurden. Als kritischer Zeitpunkt in Bezug auf die Therapie und Prognose der Patienten mit einem MIUC der Harnblase gilt der Moment der Metastasierung, weshalb die Untersuchungen ebenfalls Analysen der migratorischen, invasiven und metastatischen Eigenschaften der UCC inkludierten. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten dazu dienen die folgenden zentralen Fragestellungen zu beantworten:

- 1) Beeinflussen humane FB die Eigenschaften eines aggressiven Phänotyps der UCC (BFTC-905, VMCUB-1 und UMUC-3)?
- 2) Könnten FB bzw. die durch FB beeinflussten Signalkaskaden zukünftig ein Therapieziel im Rahmen der Behandlung des MIUC der Harnblase darstellen?
- 3) Verändert sich die Wirkung des KM auf die UCC durch eine zusätzliche Behandlung mit Cisplatin, insbesondere in Hinblick auf eine Chemotherapieresistenz?

2 Material

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Kits, Antikörper und weitere Materialien

Tabelle 3: Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
2-Propanol (≥ 98 %)	VWR® Chemicals
2-Mercaptoethanol (β-Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich®
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 Na	Carl Roth®
CellTiter-Blue® Reagent	Promega
CellWASH	BD® Biosciences
Cisplatin Accord (1 mg/ml)	Accord Healthcare
Collagenase Type 1 (270 U/mg)	Merck KGaA
Complete Mini (EDTA Free)	Roche Diagnostics
Demi-Wasser (A. dest)	Otto Fischer GmbH
DePeX	Serva
Dimethylsulfoxid (≥ 99,5 %, DMSO)	Sigma-Aldrich®
Dispase II	Gibco®
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®
Ethanol	VWR® Chemicals
FCS (Hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum)	PAN Biotech™
Glycerol (≥ 99,5 %)	Carl Roth®
Glycin (≥ 99,0 %)	Carl Roth®
GlutaMAX™ Supplement	Gibco®
HEPES Solution (1 M)	Sigma-Aldrich®
Hydrochloric acid (HCL, Salzsäure, 37 %)	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
Opti-MEM® Reduced-Serum Medium without Phenol Red	Gibco®
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Applied Biosystems®
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®
Trypan Blue Solution (0,4 %)	Sigma-Aldrich®
Trypsin 0,5 %/EDTA 0,2 % (5,3 mM) in PBS, w/o: Ca and Mg	Pan Biotech™
UltraPure™ Water for Molecular Biology (RNase-freies Wasser)	Milipore®Sigma™
Xylol	VWR® Chemicals

Tabelle 4: Biochemische Kits

Biochemische 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®

Tabelle 5: Oligonukleotidprimer

Transkript	Primer-Sequenz 5'-3'	AT (°C)
Bcl-2	Fw CCTGTGGATGACTGAGTACCTG, Rv CAGAGCCGCATGCTGGG	60
Bcl-XL	Fw CACAGCAGCAGTTTGGATGC, Rv ATATGCTGTCCCTGGGGTGA	55
CK14	Fw GCGCACCATGCAGAACCTG, Rv CCTCCACGCTGCCAATCATC	60
E-Cadherin	Fw ACCAGAATAAAGACCAAGTGACCA, Rv AGCAAGAGCAGCAGAATCAGAAT	60
GAPDH	Fw CCCTTCATTGACCTC, Rv ATGACAAGCTTCCCG	60
Survivin	Fw AGGACCACCGCATCTCTACAT, Rv AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG	60
Vimentin	Fw AATGGCTCGTCACCTTCGTGAAT, Rv CAGATTAGTTTCCCTCAGTTTCAG	60
ZEB-1	Fw TCACATAAATCAGGAAGAGATC, Rv CACTGTGAATTCTTAAGTGCTC	55

Fw = forward, Rv = reverse

Tabelle 6: Primärantikörper

Primärantikörper	Katalognummer	Hersteller
α-Smooth Muscle Actin (α-SMA)	ab7817	Abcam®
CD273/PD-L2	557926	BD® Biosciences
CD274/PD-L1	563741	BD® Biosciences
CD44	550989	BD® Biosciences
CXCR4	PA5-19856	Invitrogen™
E-Cadherin	ab15148	Abcam®

SMAD4	sc-7966	Santa Cruz Biotechnology®
Vimentin	MA5-14564	Invitrogen™

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Katalognummer	Hersteller
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®

Tabelle 8: Lösungen und Nährmedien für Zellkultur und Zellbasierte Experimente

Lösungen/Medien	Komponenten	Endkonzentration
Dispase-Lösung	Dispase II	2 µg/ml
	Hepes Solution	5 %
	<i>ad DPBS</i>	95 %
DMSO-Lösung	DMSO (Dimethylsulfoxid)	10 %
	FCS	90 %
Fibroblasten-Nährmedium und UCC-Nährmedium (für die Experimente)*	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
Kollagenase-Lösung	BSA	1,5 %
	Kollagenase Typ 1 (270 U/mg)	0,2 %
	<i>ad DPBS</i>	
Kristallviolett-Fertiglösung	Kristallviolett-Fertiglösung	1 %
Matrigel-Gebrauchslösung	Corning® Matrigel®	2,7 % (216 - 270 µg/ml)
Trypsin-PBS-Lösung	Trypsin 0,5 %/EDTA 0,2 % (5,3 mM) in PBS	
	<i>ad PBS</i>	0,05/0,02 %
UCC-Nährmedium (außerhalb der Experimente)	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit GlutaMAX™ (4,5 g/L D-Glucose)	
	FCS	10 %
	Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	10 000 U/ml/10 000 µg/ml

*Im Rahmen aller Experimente wurden UCC der Kontrollgruppe in diesem Nährmedium ohne GlutaMAX-Zusatz inkubiert. Vereinfacht wird das Zellkulturmedium der UCC-Kontrollgruppe nachfolgend als „DMEM“ bezeichnet.

Tabelle 9: Puffer und Lösungen für molekulare Analysen

Lösungen/Puffer	Komponenten	Endkonzentration
Blockier-Puffer (1 x)	BSA	5 %
	<i>ad A. dest</i>	
Blotting-Puffer (1 x)	Methanol	10 %
	Transferpuffer	25 x
	<i>ad A. dest</i>	
Cellwash-Lösung	Cellwash	97 %
	FCS	3 %
	<i>ad PBS</i>	
Farblösung Working Reagent	BCA Reagent A	50:1
	BCA Reagent B	1:50
Laemmli-Pufferlösung (4 x)	Bromphenolblau	0,01 %
	Glycerol	40 %
	SDS	8 %
	Tris-HCL pH 6,8	252 mM
	Vor Gebrauch: β -Mercaptoethanol	20 %
	<i>ad A. dest.</i>	
Laufpuffer (1 x)	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 %
	Tris, pH 8,3 - 8,8	25 mM
	<i>ad A. dest</i>	
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
RLT-Puffer	β -ME	1 %
	<i>ad A. dest.</i>	
TBS-Waschpuffer (1 x)	NaCl	150 mM
	Tris (ph 7,5)	7,7 mM
	<i>ad A. dest</i>	
Transferpuffer (1 x)	Glycin	96 mM
	Tris-Base	12 mM
	<i>ad A. dest</i>	

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
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
5 ml Rundbodenröhrchen	Corning [®]
50 ml Einmalspritze	B. Braun SE
Blotting Filter Paper (2,5 mm; 7,5 x 8,4 mm)	Invitrogen [™]

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
Collection Tubes (2 ml)	Qiagen®
Combitips advanced® (2 ml, 5 ml, 10 ml)	Eppendorf SE
Deckgläser für Mikroskopie	Engelbrecht GmbH
Filtropur S (0,2 µm)	Sarstedt AG & Co. KG
Glas Pasteurpipetten	Brand
ibidi® 2-Well-Zellkultureinsätze	ibidi® GmbH
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Nalgene®
MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film	Applied Biosystems®
MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate (0,1 mL)	Applied Biosystems®
Mikrotiterplatte 96-Well	Greiner AG
Objekträger	Engelbrecht GmbH
Omnifix®-F Tuberkulin/Tuberculin (1 ml)	B. Braun SE
Peha® Wattestäbchen	Hartmann
Pipettenspitzen	Eppendorf SE
PVDF Western Blotting Membranes (Nitrocellulose-Membran)	ROCHE Diagnostics GmbH
QIASHredder®	Qiagen®
RNeasy® Mini spin column	Qiagen®
Safe-Lock Tubes (0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf SE
Safeshield Scalpel No. 11	Feather®
Stripetten (5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml)	Corning® Costar®
ThinCert® Zellkultur Einsatz (24-Well; 8 µm Porengröße, transluzent)	Greiner Bio-One GmbH
Vakuumfiltrationseinheit Filtropur V25 (250 ml; 0,2 µm Porengröße)	Sarstedt AG & Co. KG
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH

2.2 Geräte, Software und Datenbanken

Tabelle 11: Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Extend	Sartorius AG
AxioCam MRc	Carl Zeiss GmbH
Axioskop 40	Carl Zeiss GmbH
Axiovert A1	Carl Zeiss GmbH
BD [®] FACSVia [™]	BD [®] Biosciences
BioRad ChemiDoct [™] MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Cryo 1 C Freezing Container	Nalgene [®]
Dry bath FB15101	Thermo Scientific [™]
DX-90 Autoklav	Systeme GmbH
Euroflow EF5E	CleanAir by Baker
Feinwaage M-prove	Sartorius AG
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH
HAT 5786-AC	Hettich Holding GmbH & Co. oHG
Heracell [™] 150i	Thermo Scientific [™]
Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Scientific [™]
Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific [™]
Integra Biosciences [™] Vacusafe [™] Comfort Absaugsystem	Integra Biosciences AG
Inverses Fluoreszenz Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss GmbH
Kühlgerät	Phillipp Kirsch GmbH
Locator [™] 4 Plus (Stickstofftank)	Thermo Scientific [™]
MBQ 52 ac power supply	Carl Zeiss GmbH
MBT-Rollenschüttler	neoLab [®] Migge GmbH
Multichannel Pipetten	Eppendorf SE
Nanodrop [™] 2000	Thermo Scientific [™]
Neubauer-Zählkammer (0,1 mm, 0,0025 mm ²)	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG
Pipetus [®]	Hirschmann GmbH & Co. KG
PowerPac [™] Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH
Singlechannel Pipetten	Eppendorf SE
StepOne [™] Real-Time PCR System	Applied Biosystems [®]
T100 [™] ThermalCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH
ThermoStat [®] plus	Eppendorf SE
Trans-Blot [®] Turbo [™] Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Typ 5424	Eppendorf SE
Typ 5810 R	Eppendorf SE
UP 50H Ultraschallprozessor	Hielscher Ultrasonics GmbH
Victor [™] X3 Multilabel-Reader	PerkinElmer [®]
Vortex Mixer 7-2020	neoLab [®] Migge GmbH
WNB 45 Wasserbad	Memmert GmbH & Co.KG
WTB CB 150	Binder GmbH

Tabelle 12: Softwares

Software
BD [®] FACS Suite 1.4
EndNote [™] 21
GraphPad Prism [®] (9. Version)
Image Lab Software
ImageJ
Microsoft [®] Excel für Mac 16.36
Microsoft [®] Power Point für Mac 16.84
Microsoft [®] Word für Mac 16.91
NanoDrop 2000/2000c Software
StepOne [®] Software Applied Biosystems
Victor [®] X3 Workstation Software
Zen 3.0 Mikroskopsoftware

Tabelle 13: Datenbanken

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

3 Methoden

3.1 Rahmenbedingungen

Alle praktischen Arbeiten im Rahmen der Zellkultur sowie der funktionellen Experimente erfolgten grundsätzlich unter aseptischen Bedingungen. Die Kulturen wurden täglich mikroskopisch auf Vitalität und Sterilität geprüft. Jegliche nachfolgend aufgeführten Inkubationsschritte und die Kultivierung erfolgten bei 37 °C, 5 % CO₂-Raumluftanteil und 100 % wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Zellkulturschrank. Nährmedien und Lösungen wurden, sofern nicht anders beschrieben, vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und regelmäßig frisch angesetzt. Standardgemäß wurden Zellsuspensionen in der Zellkultur (Abschnitt 3.2) bei 300 g für 5 min zentrifugiert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Wechsel des Nährmediums und Passagieren von Zellkulturen

Beim Wechsel des Nährmediums einer Kultur wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und frisches Medium in das Zellkulturgefäß eingebracht. Die Passagierung erfolgte bei einer Konfluenz von visuell ca. 80 %, indem das Nährmedium aus dem Kulturgefäß entfernt, die Zellen gemäß den Herstellerangaben mit Trypsinlösung trypsiniert und die Ablösungsreaktion durch die Hinzugabe von Nährmedium beendet wurde. Nach Überführung der Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen erfolgte im Anschluss die Zentrifugation. Nach Abnahme des Überstandes wurde das verbliebene Zellpellet erneut in 1 ml Nährmedium resuspendiert, ausgezählt und in der gewünschten Dilution in ein neues Zellkulturgefäß überführt.

3.2.2 Zellzählung und Vitalitätstestung

Um die Zellzahl einer Kultur mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer zu ermitteln, wurden die Zellen zunächst wie beschrieben trypsiniert und in Nährmedium resuspendiert. Danach wurden jeweils 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau in einem

Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und 10 µl der Suspension in die Neubauer-Zählkammer überführt. Es folgte die lichtmikroskopische Auszählung der vitalen Zellen bei 10 x Vergrößerung und die Berechnung der Zellzahl pro Volumeneinheit unter Anwendung der folgenden Formel:

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

3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um FB oder UCC dauerhaft zu lagern und zu kryokonservieren wurde zunächst das Nährmedium entfernt. Danach wurden die Zellen entsprechend dem in Abschnitt 3.2.1 geschilderten Vorgehen trypsinisiert, pelletiert, resuspendiert, ausgezählt und auf eine Zellzahl von 10^6 Zellen pro ml verdünnt. Zur Resuspension wurde 1 ml DMSO-Lösung verwendet, wobei die Arbeitsschritte zügig auf Eis durchgeführt wurden. Die Zellen in der DMSO-Lösung wurden in Kryoröhrchen bei -80 °C in Isopropanolbehältern kontrolliert eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Im Rahmen der Rekultivierung wurden die Röhrchen mit den kryokonservierten Zellen in DMSO-Lösung kurzzeitig im Wasserbad erwärmt. Es folgten die zügige Überführung der Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen mit 10 ml vorgelegtem Nährmedium, eine Zentrifugation und die anschließende Abnahme des Überstandes. Das im Konus verbliebene Zellpellet wurde in 1 ml Nährmedium aufgenommen und in eine T75-Zellkulturflasche mit 14 ml vorgelegtem Nährmedium überführt.

3.2.4 Patientenmaterial

Die zur Herstellung des KM genutzten FB wurden aus Haut von Operationspräparaten extrahiert, die während plastisch-ästhetischer Eingriffe der Abteilung für Plastische Chirurgie des Krankenhauses Köln Merheim als überschüssiges Gewebe anfielen. Präoperativ erhielten die Patienten eine ausführliche ärztliche Aufklärung und erteilten ihr schriftliches Einverständnis. Zu keinem Zeitpunkt wurde vom üblichen standardisierten operativen Prozedere abgewichen und es wurde ausschließlich solches Gewebematerial verwendet, welches andernfalls entsorgt worden wäre. Die

Rahmenbedingungen für die Probenentnahme, -verarbeitung und -lagerung sind in dem vorliegenden Ethikantrag der kooperierenden Universität Witten/Herdecke (Antragsnummer: 78/2017, positives Votum der Ethikkommission am 08.06.2017) beschrieben und festgelegt.

3.2.4.1 Isolation und Kultivierung der Fibroblasten

Für die Isolation der FB wurden humane Bauchdeckenpräparate verwendet. Die Präparate wurden steril sowie gekühlt verpackt und unmittelbar zur weiteren Verarbeitung transportiert. Die Arbeitsschritte zur Isolation der FB erfolgten spätestens innerhalb der ersten 24 h nach Probenentnahme unter aseptischen Bedingungen.

Initial wurde die Cutis von der Subcutis mit Hilfe eines Einmalskalpells abgetrennt und in ca. 5 x 5 mm große Stücke zerteilt. Die präparierten Cutis-Stücke wurden in ein Falcon-Röhrchen mit 25 ml vorgelegter Dispase-II-Lösung überführt und bei 4 °C für 24 h auf einem Rollenmischer geschwenkt. Am Folgetag wurden die präparierten Cutis-Stücke nach Abnahme der Dispase-Lösung mit DPBS gewaschen und in ein frisches Falcon-Röhrchen mit 50 ml Kollagenase I-Lösung überführt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für 60 min im Zellkulturschrank. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei RT für einen effizienteren Gewebeaufschluss erneut auf einem Rollenmischer. Nach der Abnahme der verbliebenen Kollagenase-Lösung folgte die Sterilfiltration. Dazu wurde das angedaute Gewebe mit einem sterilen Stempel einer 2 ml Einmalspritze durch ein Sieb mit einer Porengröße von 100 µm, aufliegend auf einem frischen Falcon-Röhrchen, gepresst. Abschließend erfolgten die Spülung des Siebes und die Füllung des Falcon-Röhrchen mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 50 ml. Das Röhrchen wurde im Anschluss für 5 min bei 300 g zentrifugiert, so dass sich im Konus ein sichtbares Zellpellet bilden konnte. Nach der Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit 1 ml Nährmedium resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche mit vorgelegtem FB-Nährmedium gegeben. Die Zellkulturflasche wurde im Zellkulturschrank inkubiert, ein erster Wechsel des Nährmediums wurde nach 24 h durchgeführt. Ergänzende Informationen zur Aussaat und Kultivierung der FB sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Kultivierungsschema der FB.

Zellkulturgefäß	Zellzahl bei Aussaat	Menge des Nährmediums	Menge der Trypsin-Lösung
T75	3×10^5	15 ml	5 ml
T175	7×10^5	35 ml	17 ml

3.2.4.2 Gewinnung und Verarbeitung von konditioniertem Medium

Die Untersuchung der Auswirkungen parakriner Signalfaktoren der FB auf tumorrelevante Eigenschaften der UCC erfolgte mit Hilfe von KM. Zur Gewinnung dieses Spezialmediums wurden FB in den Passagen 3 - 8 wie in Tabelle 14 beschrieben in T175-Zellkulturflaschen ausgesät. Die Kulturen wurden für 72 h und 96 h im Zellkulturschrank inkubiert. Danach wurde das Nährmedium aus den Zellkulturen entnommen und zunächst bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Zur Reduktion von Schwankungen wurden die Nährmedium-Proben von 6 verschiedenen Spendern gemäß der in Abb. 7 dargestellten Vorgehensweise im Wasserbad aufgetaut, gepoolt, unter Einsatz einer Filtrationseinheit ($0,2\ \mu\text{m}$ Porengröße) steril filtriert und abschließend aliquotiert. Auf diese Weise wurden so insgesamt 21 unterschiedliche KM-Pools generiert, die dann in den Versuchsansätzen zur Behandlung der UCC eingesetzt wurden.

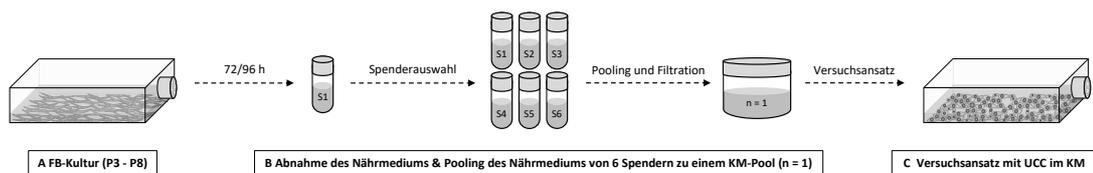


Abb. 7: Produktion von KM und Einsatz in den Experimenten. **A:** Zur Herstellung von KM wurde Nährmedium verwendet, in welchem FB-Kulturen der Passagen P3 - P8 für 72 h oder 96 h im Zellkulturschrank kultiviert wurden. Die Spender-ID, Passage und Inkubationszeit wurden dokumentiert und archiviert. **B:** Das Nährmedium von insgesamt 6 unterschiedlichen Donoren wurde nach im Vorfeld festgelegten Kriterien ausgewählt. Aspekte, die in der Spenderauswahl berücksichtigt wurden, waren, dass jede Passage (P3 - P8) einmalig vertreten war und eine ausgewogene Anzahl von Proben mit einer Inkubationszeit von 72 h bzw. 96 h (jeweils 3) vorlag. Aus den gewählten Nährmedien der verschiedenen Spender wurde ein KM-Pool erstellt, der dann steril filtriert wurde ($n = 1$). **C:** Der steril filtrierte KM-Pool wurde anschließend in den Versuchsansätzen zur Behandlung der UCC eingesetzt. Insgesamt wurden durch Anwendung dieses Verfahrens 21 unterschiedliche KM-Pools generiert, die jeweils eine einzigartige, individuelle Spenderkombination repräsentierten.

3.2.5 Urothelkarzinom-Zelllinien

Die im Rahmen der Versuchsansätze dieser Arbeit untersuchten UCC (Tabelle 15) wurden durch das Forschungslabor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Tabelle 15: Übersicht relevanter Eigenschaften der untersuchten UCC.

UCC	Geschlecht	Staging	Grading	Phänotyp	Referenz
BFTC-905	weiblich	pT4	G3	epithelial	Tzeng et al. (1996) [143]
VMCUB-1	männlich	≥ pT2	G2	epithelial	Williams (1980) [144]
UMUC-3	männlich	≥ pT2	unbekannt	mesenchymal	Grossmann et al. (1986) [145]

3.2.5.1 Kultivierung und Versuchsansatz

Für die Standardkultivierung der UCC außerhalb der Kokultivierungsexperimente wurde DMEM-Nährmedium mit GlutaMAX™-Zusatz genutzt. Während der Kokultivierungsexperimente wurde zusätzlich zu den in KM kultivierten UCC stets eine Kontrollgruppe mitgeführt, deren UCC über die gesamte Dauer des Versuchsansatzes in Standard-Nährmedium ohne GlutaMAX™ (kurz DMEM) inkubiert wurden. Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien findet sich in Tabelle 8 wieder. Das Schema zur Aussaat der UCC für die Experimente ist der nachfolgenden Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Aussaat der UCC im Rahmen der Experimente.

Zellkulturgefäß	Zellzahl bei Aussaat	Volumen Medium
6-Well	BFTC-905 1×10^5 /Well VMCUB-1 $3,5 \times 10^4$ /Well UMUC-3 $3,5 \times 10^4$ /Well	2 ml
96-Well	BFTC-905 $2,5 \times 10^3$ /Well VMCUB-1 $1,5 \times 10^3$ /Well UMUC-3 $1,5 \times 10^3$ /Well	200 µl
ibidi®-Einsatz (Migrationsanalyse)	BFTC-905 40000/Kammer VMCUB-1 23000/Kammer UMUC-3 24000/Kammer	75 µl
ThinCert® Zellkultur-Einsatz 24-Well-Inserts (Invasionsanalyse)	BFTC-905 50000/Insert VMCUB-1 30000/Insert UMUC-3 30000/Insert	100 µl

3.2.5.2 Behandlung mit KM

Um zu untersuchen, ob die Kultivierung der UCC in KM zu einer Veränderung des aggressiven Phänotyps führt, wurden sowohl funktionelle Experimente (Proliferations-, Resistenz-, Migrations-, Invasionsanalyse → Abschnitt 3.3) als auch molekulare Methoden (Gen- und Proteinexpressionsanalysen, lichtmikroskopische Phänotypisierung → Abschnitte 3.4/3.5) durchgeführt. Die Inkubationszeiten der UCC mit KM für die funktionellen und molekularen Untersuchungen sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Überblick über die Behandlung der UCC mit KM für die einzelnen Versuchsansätze.

Experiment/Methode	Behandlungsschema	Inkubationszeit
Funktionelle Experimente	Proliferationsanalyse Tag 1: Aussaat (96-Well-Format) in KM Inkubation für 96 h Tag 5: Auswertung mit Zellviabilitätsassay	96 h
	Cisplatin-Resistenzanalyse Tag 1: Aussaat (96-Well-Format) in KM Inkubation für 24 h Tag 2: Cisplatinzusatz (0 - 16 µM) Inkubation für 72 h Tag 5: Auswertung mit Zellviabilitätsassay	96 h
	Migrationsanalyse Tag 1: Aussaat (ibidi®-Einsätze) Tag 2: Zugabe von KM (+/- 3 µM Cisplatinzusatz), Inkubation & Auswertung über 12 h	12 h
	Invasionsanalyse Tag 1: Aussaat (ThinCert® Zellkultur-Einsätze) UCC-spezifische Inkubationszeit: • BFTC-905: 24 h • VMCUB-1: 20 h • UMUC-3: 20 h Tag 2: Auswertung	20/24 h
Molekulare und zellmorphologische Analysen Gen- (PCR*) und Proteinexpressionsanalysen (Western Blot, FACS*, ELISA*), Lichtmikroskopische Phänotypisierung	Tag 1: Aussaat (6-Well-Format) in KM Inkubation für 48 h Tag 3: Passagieren, Aussaat in frischem KM (ggf. Cisplatinzusatz (3 µM/Well)) Inkubation für 72 h Tag 6: Auswertung	120 h

PCR = Polymerase chain reaction, FACS = Fluorescence activated cell sorting, ELISA = Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

3.3 Zellbasierte Experimente

3.3.1 Viabilitätsbestimmung mit CellTiter®-Blue

Für die Proliferations- und Resistenzanalysen wurde ein CellTiter®-Blue-Assay zur relativen Quantifizierung der Zellzahl verwendet. Der im CellTiter®-Blue-Reagenz enthaltene Farbstoff Resazurin wird durch vitale Zellen zu Resorufin umgesetzt. Durch die Messung der Signalintensität beim Absorptionsmaximum von Resorufin ($\lambda = 573 \text{ nm}$) mit einem Spektralphotometer kann so auf die Zellzahl zurückgeschlossen werden. Zur Durchführung des Assays wurde das CellTiter®-Blue-Reagenz im Wasserbad erwärmt und mit DMEM (Verhältnis 1:10) verdünnt. Nach der Entfernung des Nährmediums aus den Wells mit den UCC (96-Well-Platten) wurden diese mit 200 μl des CellTiter®-Blue-Reagenz befüllt und für 120 min im Zellkulturschrank in Dunkelheit bei Standardbedingungen inkubiert. Danach wurden jeweils 100 μl der Reaktionslösung auf eine frische 96-Well-Platte überführt und die Signalintensität bei $\lambda = 573 \text{ nm}$ unter Einsatz eines Victor X3-Spektralphotometers detektiert.

3.3.2 Proliferations- und Resistenzanalyse

3.3.2.1 Proliferationsanalyse

Um den Einfluss des KM auf die Proliferation der UCC zu bestimmen, wurden UCC auf 96-Well-Platten in KM bzw. in DMEM (Kontrollgruppe) ausgesät und entsprechend dem Behandlungsplan in Tabelle 17 für 96 h in KM kultiviert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die relative Zellzahl beider Gruppen mit Hilfe des CellTiter®-Blue-Assays bestimmt und verglichen. Insgesamt wurde der Effekt von 10 KM-Pools auf das Wachstum der UCC getestet.

3.3.2.2 Überprüfung der Nährstoffkonstitution des KM

Zum Ausschluss eines Nährstoffmangels durch die ursprüngliche Kultivierung der FB zur Gewinnung von KM wurde dieses mit einem erweiterten Proliferations-Experiment überprüft. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass die Effekte des KM auf die UCC nicht durch ein reduziertes Nährstoffangebot im Medium im Vergleich zum DMEM

verzerrt wurden. In Abweichung zum in Abschnitt 3.3.2.1 geschilderten Ablauf der Proliferationsanalyse wurde eine weitere UCC-Gruppe in KM ausgesät, welches zuvor mit zusätzlichen 3 % FCS zum Ausgleich eines potenziellen Nährstoffdefizits versetzt wurde. Insgesamt wurden auf diesem Weg 2 KM-Pools stichprobenartig auf einen Nährstoffmangel hin untersucht.

3.3.2.3 Resistenzanalyse nach Anwendung des KM

Die Auswirkungen von KM auf die Cisplatinresistenz der UCC wurde untersucht, indem die UCC auf 96-Well-Platten in KM bzw. DMEM (Kontrolle) ausgesät wurden. Nach 24 h Inkubationszeit wurde den Zellkulturmedien Cisplatin in aufsteigenden Dosen von 0,4 μM - 16 μM hinzugefügt. Die Inkubation wurde entsprechend dem Behandlungsplan in Tabelle 17 fortgeführt. Abschließend wurde die relative Anzahl der überlebenden Zellen für beide Gruppen unter Einsatz des CellTiter®-Blue-Assays ermittelt und miteinander verglichen. Hierfür wurden 9 KM-Pools analysiert.

3.3.3 Einfluss der FB auf die Migration der UCC

Um den Einfluss des KM auf die migratorischen Eigenschaften der UCC zu analysieren, wurde ein sogenanntes *wound-healing-assay* durchgeführt. Zunächst wurden ibidi®-Einsätze auf den Böden einer 12-Well-Platte platziert. Daran anschließend wurden die UCC in DMEM in die beiden Kammern der Einsätze ausgesät (Aussaatschema gemäß Tabelle 16) und die Platten für 24 h im Zellkulturschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die ibidi®-Einsätze mit einer sterilen Pinzette vorsichtig entfernt und mit 1500 μl KM bzw. DMEM (jeweils +/- 3 μM Cisplatin) geflutet. Das zu Grunde liegende Funktionsprinzip des *wound-healing-assays* ist in nachfolgender Abb. 8 visualisiert.

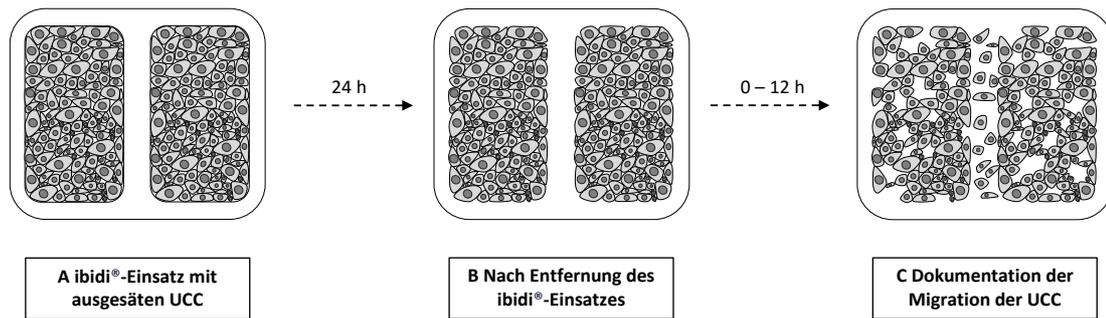


Abb. 8: Funktionsprinzip des wound-healing-assays mit einem 2-Kammer ibidi®-Einsatz. A ibidi®-Einsatz mit ausgesäten UCC: Die UCC wurden in DMEM in die beiden Kammer des auf dem Wellboden fest haftenden ibidi®-Einsatzes ausgesät und für 24 h im Zellkulturschrank inkubiert. **B Nach Entfernung des ibidi®-Einsatzes:** Nach der vorsichtigen Loslösung des Einsatzes wurden lichtmikroskopisch zwei einschichtige Zellrasen sichtbar, die mittig durch ein zellfreies Areal von 500 µm Breite voneinander separiert waren. **C Dokumentation der Migration der UCC:** Über einen Zeitraum von bis zu 12 h wurde die ungerichtete Migration der UCC in das zellfreie Areal beobachtet und dokumentiert. Hierzu wurden lichtmikroskopische Aufnahmen im oberen und unteren Ende des Spaltes angefertigt. Je schneller das zellfreie Areal mit migrierten Zellen bedeckt war, desto höher wurde die migratorische Kapazität der UCC interpretiert.

Die Dokumentation der Migration der UCC erfolgte mit Hilfe eines Auflichtmikroskops über einen Zeitraum von maximal 12 h, indem alle zwei Stunden lichtmikroskopische Aufnahmen in 10-facher Vergrößerung angefertigt wurden. Zwischen den Aufnahmen wurden die Platten im Zellkulturschrank zwischengelagert. Jeder Einsatz wurde hierzu an zwei definierten Stellen fotografiert (entsprechend 2 technischen Replikaten). Mit Hilfe der Software ImageJ und dem *freehand selection Tool* wurde die mit migrierten Zellen besetzte Fläche berechnet. Die technischen Replikate eines Einsatzes wurden im Zuge der Auswertung gemittelt und so insgesamt 9 KM-Pools getestet.

3.3.4 Invasionsanalyse

Für die Invasionsanalysen wurden zunächst 20 µl Corning®-Matrigel-Gebrauchslösung mit einer sterilen Pipette auf den Boden der ThinCert®-Zellkultur-Einsätze aufgetragen, die gemäß den Herstellerangaben in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte eingehängt wurden. Die Platten wurden für 20 min im Zellkulturschrank zwischengelagert, bis das Matrigel eine festere Konsistenz angenommen hatte. Der Beschichtungsschritt wurde mit weiteren 20 µl Corning®-Matrigel und einer anschließenden weiteren Inkubation für 60 min wiederholt. Danach wurden die UCC, wie in Tabelle 16 beschrieben, in Opti-MEM® Reduced-Serum-Medium in die Einsätze ausgesät. Der Wellboden der 24-Wellplatte wurde mit 500 µl KM bzw. DMEM (Kontrolle) befüllt. Die Platten wurden

erneut im Zellkulturschrank platziert und entsprechend der in Tabelle 17 aufgeführten UCC-spezifischen Inkubationszeiten aufbewahrt. Die Funktionsweise dieser Methode mit ThinCert®-Zellkultur-Einsätzen veranschaulicht nachfolgende Abb. 9.

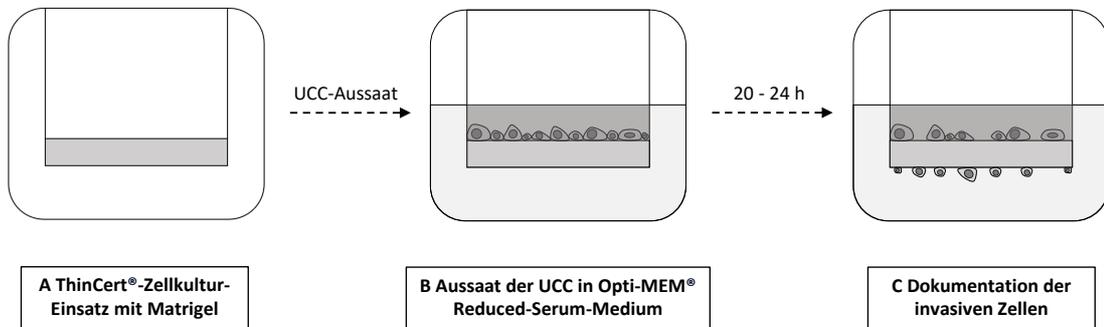


Abb. 9: Funktionsprinzip der Invasionsanalyse mittels ThinCert®-Zellkultur-Einsatz. **A ThinCert®-Zellkultur-Einsatz mit Matrigel:** Der Boden des Einsatzes wird mit Matrigel beschichtet und in eine 24-Well-Platte eingehangen. Das Matrigel simuliert eine Basalmembran-Matrix, die in ihrer Zusammensetzung der ECM nachempfunden ist. **B Aussaat der UCC in Opti-MEM® Reduced-Serum-Medium:** Eine Zellsuspension aus UCC in Opti-MEM® Reduced-Serum-Medium wird in die Einsätze auf die Matrigelschicht pipettiert und der Wellboden mit KM bzw. DMEM gefüllt. **C Dokumentation der invasiven Zellen:** Sofern das Medium im Wellboden über einen anderen Gehalt an Nährstoffen und chemotaktisch wirksamen Signalmoleküle enthält, die die invasiven Eigenschaften der UCC beeinflussen, wandern diese durch die Matrigelschicht auf die Außenseite des Einsatzes. Die invadierten Zellen auf der Membranaußenseite wurden abschließend durch eine Kristallviolett-Färbung visualisiert und lichtmikroskopisch dokumentiert. Je größer das chemotaktische Potenzial des Mediums im Wellboden ist, desto mehr invasive UCC gelangen auf die Membranunterseite.

Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die ThinCert®-Zellkultur-Einsätze mit den UCC aus den Vertiefungen der 24-Well-Platten herausgehoben. Die Innenseiten der Kammern wurden mit einem Wattestäbchen gereinigt und mit PBS gewaschen. Durch Überführung der Einsätze in eiskaltes Methanol (10 min) wurden die adhärenenten, invadierten Zellen auf der Membranaußenseite fixiert. Zur anschließenden Färbung wurden die Einsätze für 25 min in Kristallviolett-Fertiglösung bei RT in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Farbrückstände in den Kammern mit Leitungswasser entfernt, für 20 min getrocknet und die Bodenmembran mit einem Skalpell herausgetrennt. Die Bodenmembranen mit den fixierten und gefärbten UCC wurden in Xylol getränkt und mit Hilfe von DePeX und Deckgläsern auf einem Objektträger fixiert. Die Membranen wurden an 6 repräsentativen Stellen lichtmikroskopisch in 10-facher Vergrößerung fotografiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ (n = 9). Im Unterschied zu den weiteren Zell-basierten Experimenten erfolgte für die Invasionsanalyse für BFTC-905 zusätzlich eine Vorkonditionierung mit längerer KM-

Kontaktzeit im Vorfeld (Behandlungsplan im Rahmen molekularer Analysen siehe Tabelle 17).

3.4 Molekulare Analysen

3.4.1 Genexpressionsanalysen (qRT-PCR)

3.4.1.1 RNA-Extraktion, reverse Transkription und cDNA-Synthese

Zur Durchführung der Genexpressionsanalysen wurden die UCC auf 6-Well-Platten ausgesät (Tabelle 16) und gemäß dem Behandlungskonzept in Tabelle 17 vorkonditioniert. Dabei wurde ein Teil der UCC in KM bzw. DMEM mit Cisplatin behandelt, um neben den Auswirkungen der Signalmediatoren im KM auch die Effekte des Chemotherapeutikums zu analysieren. An die Vorkonditionierung der Zellen schlossen sich die RNA-Extraktion sowie der DNase-Verdau an. Zur Qualitätssicherung wurden die Proben anschließend unter Einsatz eines NanoDrop™2000 auf eine A260/280-Ratio zwischen 1,9 und 2,1 hin spektralphotometrisch überprüft. Abschließend folgte die reverse Transkription der aufgereinigten RNA in cDNA (engl. *complementary DNA*). Für die genannten Schritte wurden verschiedene Kits der Firma Qiagen unter Befolgung des Herstellerprotokolls verwendet. Diese können Tabelle 18 entnommen werden.

Tabelle 18: Übersicht der eingesetzten Kits zur RNA-Extraktion, -Aufbereitung und -Umschreibung.

Kit	Verwendungszweck	weitere Angaben	Probenlagerung
RNeasy Mini Kits®	Extraktion der RNA der vorkonditionierten UCC	Zellyse: 350 µl RLT-Puffer (1 % β-Mercaptoethanol)/ RNA-Verdünnung: 60 µl RNase-freies Wasser	-80 °C
RNase free DNase®	Aufreinigung, Entfernung von DNA-Rückständen	Inkubationszeit Thermoblock: 30 min	
QuantiTect Reverse Transcription Kit®	Umschreiben der extrahierten RNA in komplementäre DNA	Verwendete RNA-Menge: 1 µg/Probe Abschließende Verdünnung cDNA: 1:20 mit RNase-freiem Wasser	-20 °C

3.4.1.2 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die cDNA-Proben (Abschnitt 3.4.1.1) wurden mit der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und analysiert. Dazu wurde der PowerUp™ SYBR® Green

Master Mix entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsvolumens für eine einzelne cDNA-Probe ist zur besseren Übersicht in Tabelle 19 aufgelistet.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Master Mix für die qRT-PCR-Analysen. Vor ihrer Verwendung wurden die Oligonukleotidprimer mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Komponente	Volumen	Funktion
cDNA-Probe (1:20)	2 µl	Durch die Analyse der cDNA mit Hilfe der qRT-PCR kann auf das Genexpressionsmuster der vorkonditionierten UCC rückgeschlossen werden.
PowerUp™ SYBR® Green Master Mix	10 µl	Der PowerUp™ SYBR® Green Master Mix enthält u. a. die DNA-Polymerase und den SYBR® Green-Farbstoff. Die Polymerase synthetisiert die komplementären DNA-Stränge an die Amplicons der cDNA-Probe. An die entstehenden doppelsträngigen DNA-Amplifikate bindet der SYBR® Green-Farbstoff, wodurch ein Fluoreszenzsignal entsteht.
Primer Forward (10 pmol/µl)	0,5 µl	Die Primer werden von der DNA-Polymerase als Start- und Endpunkt benötigt, um das gesuchte Gen zu amplifizieren.
Primer Reverse (10 pmol/µl)	0,5 µl	
RNase freies Wasser	7 µl	Vervollständigung des Reaktionsvolumens.

Die Detektion und Auswertung der Amplifikation erfolgte mit dem StepOne™ Real-Time PCR-System im Fast-Cycling-Modus (40 Zyklen + Schmelzkurvenanalyse). Die Einstellungen der Primer-spezifischen Annealing-Temperaturen sind Tabelle 5 zu entnehmen. Zur relativen Quantifizierung der einzelnen Amplifikate wurde jeweils eine Standardreihe mit drei Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1000) mit analysiert. Eine Negativkontrolle ohne cDNA diente der Qualitätssicherung.

3.4.2 Proteinexpressionsanalysen (Western Blot, ELISA, FACS)

Auch für die Untersuchung der Expression ausgewählter Proteine (Western Blot, ELISA, FACS) wurden UCC auf 6-Well-Platten ausgesät (Tabelle 16), mit KM vorkonditioniert (Tabelle 17) und mit UCC in DMEM (Kontrolle) verglichen.

3.4.2.1 Proteinextraktion und -bestimmung

Zu Beginn der Proteinextraktion wurden die UCC trypsinisiert (Abschnitt 3.2.1). Es folgten ein Zentrifugationsschritt (300 g, 5 min, RT) und die Aufnahme des Zellpellets in 30 µl

eisgekühltem RIPA-Puffer (engl. *Radioimmunoprecipitation assay buffer*). Die chemische Lyse der Zellen mittels des RIPA-Puffers wurde zusätzlich mechanisch mit Hilfe eines UP 50H Ultraschallprozessors (10 Impulse, 80 % Amplitude, 500 ms Cycle) unterstützt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 000 g, 5 min, 4°C) wurde die obere flüssige, proteinhaltige Phase abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellreste der festen Phase im Konus wurden verworfen. Es folgte die Verdünnung des Proteinlysats mit PBS im Verhältnis 1:6. Für die anschließende Quantifizierung der Proteinmenge der einzelnen Proben wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit gemäß den Vorgaben des Herstellers verwendet, wobei das „*Microplate Procedure*“-Protokoll mit einem eingesetzten Proben- bzw. Standardvolumen (BSA-Standardreihe im Kit enthalten) von 10 µl befolgt wurde. Wie im Protokoll beschrieben, erfolgte abschließend die spektralphotometrische Messung der Signalintensität bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ und die Einordnung der Blindwert-korrigierten Messwerte auf einer Standardgeraden.

3.4.2.2 Western Blot-Analyse der UCC nach Inkubation in KM

Im Anschluss an die Proteinbestimmung wurden die Proben für die Western Blot-Analysen vorbereitet. Die eingesetzte Proteinmenge richtete sich nach dem verwendeten Primärantikörper (Tabelle 20). Einleitend erfolgte die Zugabe von 4 µl Laemmli-Pufferlösung zum Proteinlysats. Das Reaktionsgemisch wurde mit A dest. auf ein Gesamtvolumen von 14 µl gebracht. Es folgten ein Zentrifugations- (13 800 g, 2 min) und Inkubationsschritt der Proben (95 °C, 5 min). Danach wurde die Gelelektrophorese-Kammer mit dem ausgewählten Mini-PROTEAN®-Gel (Tabelle 20) beladen und mit Laufpuffer geflutet. Der Kamm wurde aus dem Trenngel entfernt. Die Probentaschen des Trenngels wurden jeweils mit 12 µl einer Probe beladen. Zusätzlich wurde der Molekulargewichtsmarker aus dem ROTI® Mark WESTERN-Set nach Herstellerangaben aufgetragen. An die Ladung des Gels schloss sich die Auftrennung der Proteine bei Spannungen zwischen 80 V und 100 V über einen Zeitraum von 1 h an.

Für den Proteintransfer wurde das Trenngel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Blotting-Membran der Fa. Invitrogen™ gelegt und im Blotting-Puffer (3 min) inkubiert. Der Transfer erfolgte im Novex® Semi-Dry Blotter (25 V, 2,5 A, 20 min), im Anschluss wurde die Blotting-Membran mit TBS gewaschen und zur Reduktion unspezifischer

Antikörperbindungen in 10 ml TBS 5 % FCS inkubiert (RT, 1 h). Nachfolgend wurde die Blotting-Membran mit 5 ml der verdünnten Primärantikörper-Lösung (Tabelle 20) benetzt, auf einem Rollenmischer deponiert und über Nacht inkubiert (4 °C, 16 h). Nach mehrmaligem Waschen mit 10 ml TBS-T-Waschpuffer wurden die Primärantikörper-Protein-Komplexe auf der Blotting-Membran durch die Zugabe von 4 ml Sekundärantikörper-Lösung und einen weiteren Inkubationsschritt in Dunkelheit (RT, 1 h) gebunden. Abschließend wurde die Membran zur Detektion der Proteinbanden mit 3 ml der Pierce™ ECL-Western Blotting-Lösung getränkt und in die Fotokammer des BioRad ChemiDoct™ MP Imaging Systems transferiert. Die semiquantitative Auswertung der Bandenintensität mitsamt der Normierung auf das Totalprotein erfolgte mit ImageLab.

Tabelle 20: Übersicht über die in den Western Blot-Analysen genutzten Primärantikörpern (Verdünnung), die eingesetzten Proteinmengen und das verwendete Polyacrylamid-Gel.

Antikörper (Verdünnung)	Eingesetzte Proteinmenge	Polyacrylamid-Gel	Katalognummer
α -SMA (1:4000)	10 μ g	4 - 15 %	ab7817
CXCR4 (1:1000)	20 μ g	7,5 %	PA5-19856
E-Cadherin (1:1000)	20 μ g	7,5 %	ab15148
SMAD4 (1:2000)	10 μ g	4 - 15 %	sc-7966
Vimentin (1:1000)	20 μ g	4 - 15 %	MA5-14564

3.4.2.3 Serpin E1/PAI-1-ELISA

Das Human Serpin E1/PAI-1 Quantikine® ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) Kit diente zur semiquantitativen PAI-1-Analyse in den KM- bzw. DMEM-Überständen (Kontrolle), die zum Abschluss der Vorkonditionierung der UCC (Tabelle 17) anfielen. Dazu wurden die Überstände aus den UCC-Kulturen an Tag 6 des Behandlungsplans (Tabelle 17) entnommen und mit dem Reagent Diluent des Kits verdünnt (500 μ l Probe, 1:3). Die weitere Durchführung erfolgte anhand des Herstellerprotokolls. Abschließend wurde die Signalintensität beim Absorptionsmaximums des im Kit verwendeten Fluorophor Streptavidin-Horseradish-Peroxidase ($\lambda = 450$ nm) mit einem Victor X3-Spektralphotometer detektiert. Ein Blindwert wurde mitgeführt. Die Blindwert-korrigierten Messwerte wurden über eine Standardgerade quantifiziert.

3.4.2.4 Analyse der Antigenexpression mittels Fluorescence Activated Cell Scanning (FACS)

Die adhärennten vorkonditionierten UCC wurden zu Beginn der FACS-Analysen abgelöst (Abschnitt 3.2.1). Im Anschluss wurde die Zellsuspension in eisgekühlte FACS-Röhrchen überführt. Die Suspensionen wurden zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C) und das im Konus befindliche Zellpellet mit 50 µl FCS resuspendiert und für 30 min inkubiert. Nach Hinzugabe des Antikörpers schloss sich ein Inkubationsschritt in Dunkelheit an (30 min, auf Eis). Die verwendeten Volumina sowie relevante Eigenschaften der eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 21 aufgelistet. Nach Abschluss der Inkubation wurden die UCC mit Cellwash-Lösung gewaschen und abschließend in 200 µl resuspendiert. Bei primär-gekoppelten Antikörpern erfolgte direkt die Messung der Signalintensität beim Absorptionsmaximum des konjugierten Fluorophors (Tabelle 21) mit Hilfe des BD® FACSVia™-Durchflusszytometers (Analyse von 2×10^4 Zellen/Probe). Für den unkonjugierten CXCR4-Antikörper schlossen sich weitere Arbeitsschritte an, in deren Rahmen 1 µl des APC-Fluorophors hinzugefügt, die Zellen anschließend erneut abgedunkelt inkubiert (30 min, auf Eis), gewaschen und in Cellwash-Lösung aufgenommen wurden. Erst hiernach wurde mit der durchflusszytometrischen Analyse wie bereits beschrieben fortgefahren. Die gemessenen Werte wurden im Rahmen der Auswertung auf eine mitgeführte Negativkontrolle ohne Färbung normiert.

Tabelle 21: Überblick über die eingesetzten Antikörper in den FACS-Analysen.

	Antikörper	Fluorophor	Absorptionsmaximum
Primär-gekoppelte Antikörper	CD44 (2 µg/50 µl)	Allophycocyanin	650 nm
	PD-L1 (2,5 µg/50 µl)	Fluoresceinisothiocyanat	490 nm
	PD-L2 (20 µg/50 µl)	R-Phycoerythrin	565 nm
Sekundär-gekoppelte Antikörper	CXCR4 (2 µg/50 µl)	Allophycocyanin (1 µl)	650 nm

3.5 Lichtmikroskopische Phänotypisierung

Ergänzend zu den Gen- und Proteinexpressionsanalysen wurde die Zellmorphologie lichtmikroskopisch dokumentiert. Hierfür wurden die UCC wie in Tabelle 16 angegeben auf 6-Well-Platten ausgesät und mit KM vorkonditioniert (Tabelle 17). Zu Beginn und

Abschluss der Behandlung erfolgte die Aufnahme lichtmikroskopischer Bilder der UCC in KM bzw. DMEM (Kontrolle) in 10-facher Vergrößerung.

3.6 Statistik

Sowohl die Auswertung, grafische Aufbereitung und Überprüfung der Versuchsergebnisse auf statistische Signifikanz erfolgten mit der Software GraphPad® Prism (9. Version). Unter Durchführung eines Shapiro-Wilk-Tests wurden die Datensätze auf eine Normalverteilung geprüft. Um den Unterschied zweier Gruppen auf statistische Signifikanz zu testen, wurde der gepaarte studentische t-Test (engl. *paired student's t-test*) durchgeführt. Bei mehr als zwei Gruppen fand die zweifaktorielle Varianzanalyse (engl. *two-way analysis of variance, two-way ANOVA*) Anwendung. Bei einer angenommenen α -Fehlerwahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ wurden Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet und entsprechend gekennzeichnet (*). Als Effektmaß wurde für jedes signifikante Ergebnis das zugehörige 95 %-Konfidenzintervall (KI) angegeben. Ergebnisse mit einem p-Wert von $\leq 0,01$ (**) und $\leq 0,001$ (***) sowie nicht signifikante Ergebnisse (ns) wurden gesondert markiert. Für jeden Versuchsansatz wurde die Anzahl der jeweils untersuchten KM-Pools (Abschnitt 3.2.4.2) mit „n“ sowie der technischen Replikate mit „tR“ vermerkt.

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung der Nährstoffkonstitution des KM

Wie in Abschnitt 3.3.2.1 beschrieben war eine grundsätzliche Überlegung, ob das KM durch die vorherige Nutzung im Rahmen der Kultivierung der FB noch genug Nährstoffe enthielt, um die Proliferation der UCC zu gewährleisten (Abb. 7). Entsprechend ergab sich hieraus die Notwendigkeit, das KM vor Beginn der Versuchsansätze stichprobenartig auf einen möglichen Nährstoffmangel hin zu überprüfen. Dafür wurden UCC jeweils in KM ausgesät, wobei einem KM-Pool zusätzlich 3 % FCS zugesetzt wurde. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die relative Zellzahl der Kulturen analysiert. Verglichen wurden die Messwerte mit UCC, die in KM ohne additiven FCS-Zusatz kultiviert wurden. Ein die Viabilität der Zellen einschränkender Nährstoffmangel sollte hierdurch demaskiert werden.

Abb. 10 veranschaulicht, dass aus dem Zusatz von 3 % FCS zum KM keine signifikante Änderung der Viabilität und somit Proliferation von BFTC-905 resultierte.

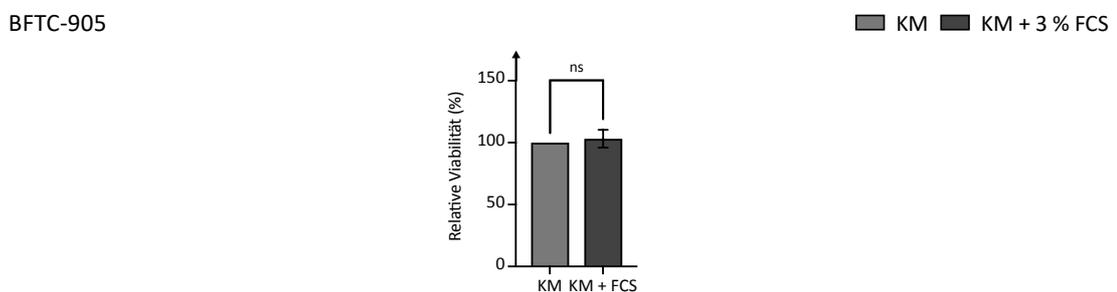


Abb. 10: Überprüfung des KM auf einen Nährstoffmangel für die Inkubation von BFTC-905. Die Ergänzung des KM um zusätzliche 3 % FCS führte zu keiner signifikanten Änderung der Zellviabilität für BFTC-905 (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die KM-Gruppe ($n = 2$, $tR = 6$)).

Gleiches galt für VMCUB-1, welche nach der Zugabe von 3 % FCS zum KM ebenfalls keine signifikante Änderung der proliferativen Kapazität aufwies (Abb. 11).

VMCUB-1



Abb. 11: Überprüfung des KM auf einen Nährstoffmangel für die Inkubation von VMCUB-1. Die Ergänzung des KM um zusätzliche 3 % FCS führte zu keiner signifikanten Änderung der Zellviabilität für VMCUB-1 (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die KM-Gruppe (n = 2, tR = 6)).

Für UMUC-3 konnte nach Abschluss der Inkubationszeit ebenso kein relevanter Unterschied in der Viabilität der untersuchten Gruppen detektiert werden (Abb. 12).

UMUC-3



Abb. 12: Überprüfung des KM auf einen Nährstoffmangel für die Inkubation von UMUC-3. Die Ergänzung des KM um zusätzliche 3 % FCS führte zu keiner signifikanten Änderung der Zellviabilität für UMUC-3 (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die KM-Gruppe (n = 2, tR = 6)).

Zusammengefasst führte der Zusatz von 3 % FCS zum KM für keine der untersuchten UCC zu einer relevanten Änderung der Viabilität.

4.2 Einfluss von KM auf den aggressiven Phänotyp von UCC

4.2.1 Effekte auf die Proliferation

Es wurde der Einfluss des KM auf die proliferative Kapazität der UCC untersucht. Nach der Inkubation der UCC mit KM wurde dazu die relative Zellzahl in der Kultur bestimmt und mit einer DMEM-Kontrolle verglichen.

Abb. 13 zeigt, dass die Proliferation von BFTC-905 nach der Kultivierung im KM im Vergleich zur DMEM-Kontrolle signifikant gesteigert war ($p \leq 0,001$, KI 19,6 - 48,7).

BFTC-905

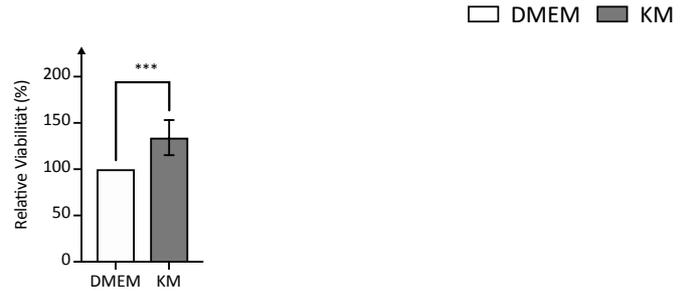


Abb. 13: Proliferation von BFTC-905 nach der Inkubation mit KM. Die Kultivierung von BFTC-905 in KM führte zu einer relevanten Zunahme der Zellviabilität im Vergleich zur DMEM-Kontrolle (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 10, tR = 4)).

VMCUB-1 wies nach der Inkubation mit KM (Abb. 14) ebenfalls eine höhere proliferative Kapazität der Zellen auf ($p \leq 0,01$, KI 10,2 - 32,6).

VMCUB-1

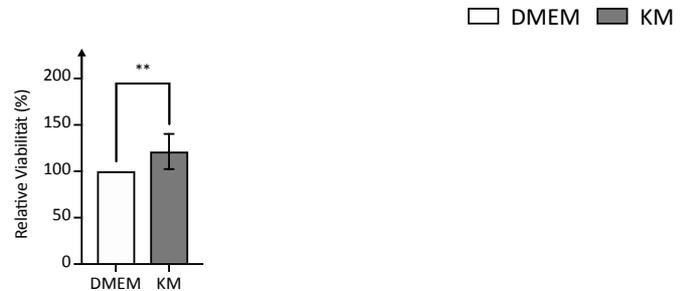


Abb. 14: Proliferation von VMCUB-1 nach der Inkubation mit KM. Die Kultivierung von VMCUB-1 in KM führte zu einer relevanten Zunahme der Viabilität und somit der Zellzahl im Vergleich zur DMEM-Kontrolle (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 9, tR = 4)).

Im Vergleich zu den übrigen UCC zeigte sich nach der Kultivierung von UMUC-3 im KM lediglich eine tendenzielle, statistisch jedoch nicht signifikante Erhöhung der Viabilität (Abb. 15).

UMUC-3



Abb. 15: Proliferation von UMUC-3 nach Inkubation mit KM. Die Kultivierung von UMUC-3 im KM führte zu keiner signifikanten Änderung der Zellviabilität (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 10, tR = 4)).

4.2.2 Auswirkungen der FB auf die Apoptose der UCC

Es wurde die Veränderung der Expression der antiapoptotischen Regulatorproteine Bcl-XL, Survivin und Bcl-2 in den UCC analysiert, nachdem diese mit dem KM der FB inkubiert worden sind und jeweils mit einer in DMEM-kultivierten Kontrolle verglichen. Zusätzlich wurde in diesem Zusammenhang auch der Einfluss einer Cisplatinbehandlung im jeweiligen Kulturmedium eruiert. Eine erhöhte Expression der genannten Proteine inhibiert die Apoptoseinduktion in Tumorzellen (Abschnitt 1.2.2), was zu einer weiteren Akkumulation von genetischen Mutationen und Proliferation führen kann [61, 62]. Umgekehrt wirkt sich ein reduziertes Expressionsniveau potenziell proapoptotisch auf die Zellen aus [61, 62].

Abb. 16 verdeutlicht, dass die Kultivierung von BFTC-905 in KM die Expression von Bcl-XL (A) und Survivin (B) im Vergleich zur DMEM-Kontrolle nicht signifikant beeinflusste, wohingegen das Bcl-2-Expressionsniveau (C) signifikant reduziert war ($p \leq 0,001$, C: KI (KM): 0,02 - 0,06). Auch die Zugabe von Cisplatin (CP) bewirkte, unabhängig vom verwendeten Kulturmedium, eine relevante Expressionsabnahme des antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 ($p \leq 0,001$, C: KI (DMEM + CP): 0,1 - 0,16, KI (KM + CP): 0,1 - 0,14).

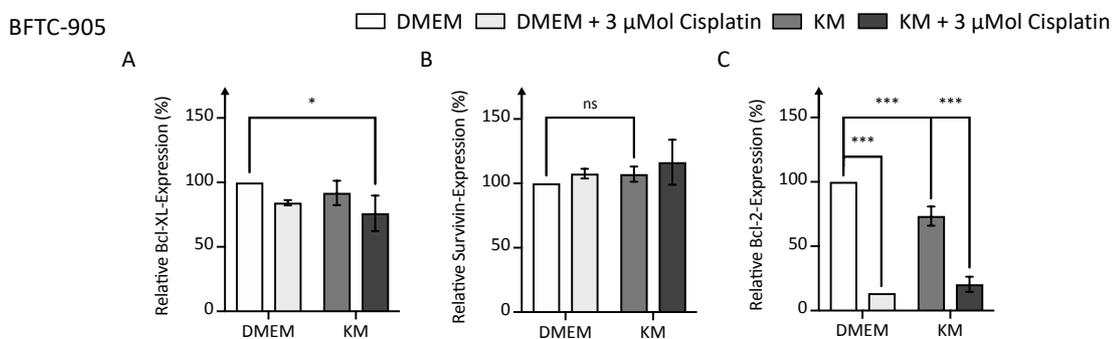


Abb. 16: Auswirkungen von KM und Cisplatin auf die mRNA-Expression von Bcl-XL (A), Survivin (B) und Bcl-2 für BFTC-905. Die Kultivierung von BFTC-905 in KM sowie die Behandlung mit Cisplatin reduzierte insbesondere die Bcl-2-Expression (C) der Zellen signifikant (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A/B/C: $n = 3$, $tR = 3$)).

Die Kultivierung von VMCUB-1 (Abb. 17) in KM bewirkte eine signifikante Zunahme von Bcl-XL- (A) und einer tendenziellen Erhöhung der Bcl-2-Expression (B) ($p \leq 0,001$, A: KI (KM): -0,7 - -0,02). Ähnlich wie für BFTC-905 induzierte die Behandlung von VMCUB-1 mit Cisplatin eine relevante Reduktion des Bcl-XL-Expressionsniveaus in DMEM sowie im KM ($p \leq 0,01$ bzw. $p \leq 0,05$, A: KI (DMEM + CP): 0,14 - 0,94, KI (KM + CP): 0,05 - 0,7).

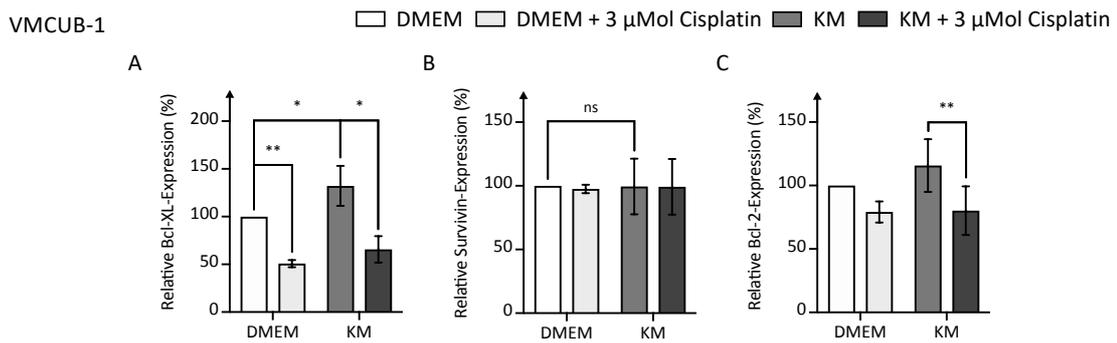


Abb. 17: Auswirkungen von KM und Cisplatin auf die mRNA-Expression von Bcl-XL (A), Survivin (B) und Bcl-2 für VMCUB-1. Die Kultivierung von VMCUB-1 in KM steigerte die Expression von Bcl-XL (A) signifikant und von Bcl-2 (C) tendenziell. Die Behandlung der Zellen mit Cisplatin reduzierte umgekehrt hierzu die Expression von Bcl-XL (A) relevant (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A/B/C: $n = 3$, $tR = 3$)).

Auch auf UMUC-3 (Abb. 18) wirkte sich die Inkubation mit KM aus, indem die Zellen relevant mehr Bcl-2 (C) exprimierten ($p \leq 0,001$, C: KI (KM): $-1,17 - -0,53$). Die Behandlung von UMUC-3 mit Cisplatin zeigte in Kongruenz zu den übrigen untersuchten UCC ebenfalls einen Effekt, der sich in einer Abnahme des Expressionsniveaus der untersuchten antiapoptotischen Proteine widerspiegelte (A: $p \leq 0,01$, KI (DMEM + CP): $0,49 - 0,99$, KI (KM + CP): $0,23 - 0,64$; B: $p \leq 0,05$, KI (DMEM + CP): $0,05 - 0,5$; C: $p \leq 0,001$, KI (DMEM + CP): $0,46 - 1,23$, KI (KM + CP): $0,19 - 0,82$). Auch für UMUC-3 stellte sich der beobachtete Effekt von Cisplatin unabhängig vom eingesetzten Kulturmedium dar.

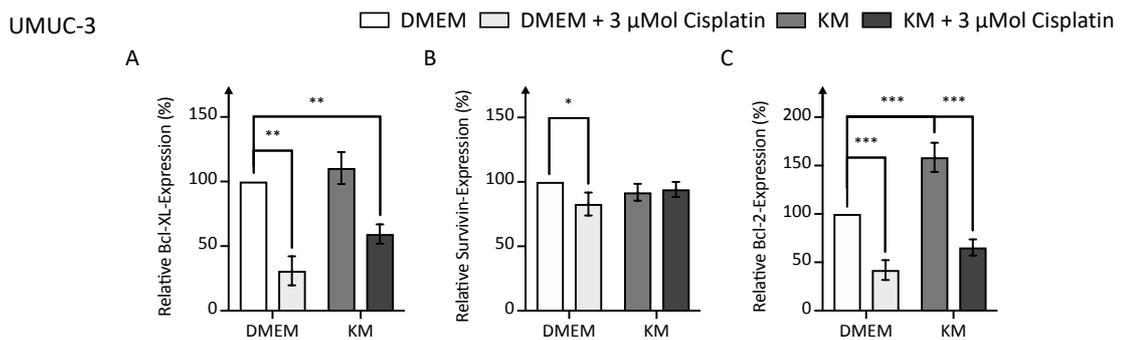


Abb. 18: Auswirkungen von KM und Cisplatin auf die mRNA-Expression von Bcl-XL (A), Survivin (B) und Bcl-2 für UMUC-3. Die Kultivierung von UMUC-3 in KM erhöhte die Bcl-2-Expression (C) signifikant. Die Behandlung der Zellen mit Cisplatin senkte insbesondere das Expressionsniveau von Bcl-XL (A) und Bcl-2 (C) unabhängig vom eingesetzten Kulturmedium (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A/B/C: $n = 3$, $tR = 3$)).

4.2.3 Modulation der Cisplatinresistenz durch das KM

Eine relevante Eigenschaft des aggressiven Phänotyps von UCC stellt die Cisplatinresistenz dar, insbesondere da Cisplatin eine Hauptsäule der antitumoralen Therapie des MIUC der Harnblase repräsentiert [1, 61]. Zur Evaluation eines Einflusses von KM und ob Signalmediatoren im KM möglicherweise Resistenzeigenschaften vermitteln können, wurden UCC in KM kultiviert und mit aufsteigenden Cisplatinindosen von 0,4 μM bis 16 μM versetzt. Nach Ende der Inkubation erfolgte die Bestimmung der relativen Anzahl überlebender Zellen für die einzelnen Konzentrationen im Vergleich mit einer DMEM-Kontrolle.

In Gegenüberstellung zur DMEM-Kontrolle war die Viabilität von BFTC-905-Zellen bei Cisplatinkonzentrationen von 0,4 - 2 μM im KM signifikant erhöht (Abb. 19) ($p \leq 0,001$, KI (0,4 μM): 14,0 – 29,5, KI (1 μM): 9,2 – 22,3, KI (2 μM): 6,1 – 13,7).

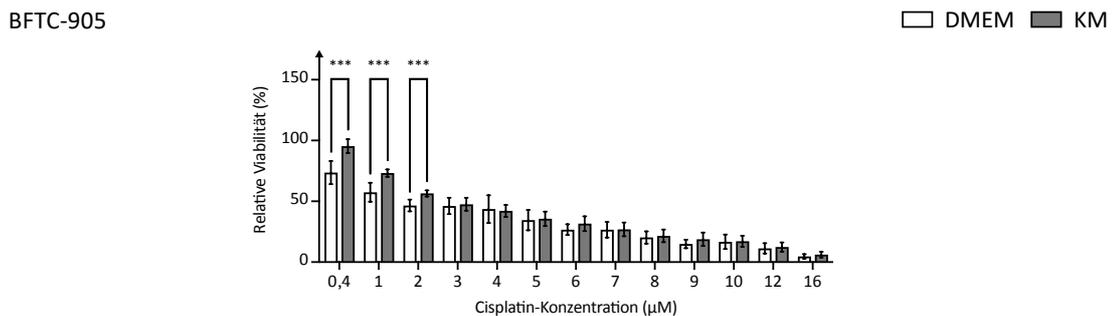


Abb. 19: Einfluss von KM auf die Cisplatinresistenz von BFTC-905. Die Inkubation von BFTC-905 mit KM führte zu einer erhöhten Viabilität im Vergleich zur DMEM-Kontrolle im Konzentrationsbereich zwischen 0,4 - 2 μM Cisplatin (Mittelwert \pm SD normalisiert auf eine Proliferations-Kontrolle desselben Nährmediums ohne Cisplatinzusatz (nicht abgebildet, $n = 10$, $tR = 3$)).

Auch für VMCUB-1 (Abb. 20) konnte im KM eine gesteigerte Anzahl vitaler Zellen im Bereich zwischen 0,4 und 1 μM Cisplatin nachgewiesen werden ($p \leq 0,001$, KI (0,4 μM): 9,1 - 21,7, KI (1 μM): 7,3 - 18,4).

VMCUB-1

□ DMEM ■ KM

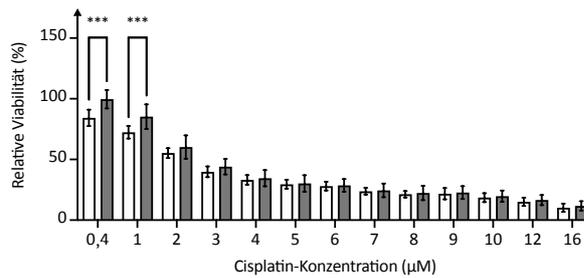


Abb. 20: Einfluss von KM auf die Cisplatinresistenz von VMCUB-1. Die Inkubation von VMCUB-1 mit KM führte zu einer erhöhten Viabilität der Zellen im Vergleich zur DMEM-Kontrolle für die Konzentrationen von 0,4 µM und 1 µM Cisplatin (Mittelwert ± SD normalisiert auf eine Proliferationskontrolle desselben Nährmediums ohne Cisplatinzusatz (nicht abgebildet, n = 10, tR = 3)).

Abb. 21 demonstriert, dass die Inkubation von UMUC-3 mit KM ebenfalls mit einer erhöhten Zellviabilität im Konzentrationsbereich von 0,4 - 2 µM einherging ($p \leq 0,001$ bzw. $p \leq 0,01$, KI (0,4 µM): 8,8 - 22,3, KI (1 µM): 10,3 - 23,0, KI (2 µM): 8,9 - 24,2).

UMUC-3

□ DMEM ■ KM

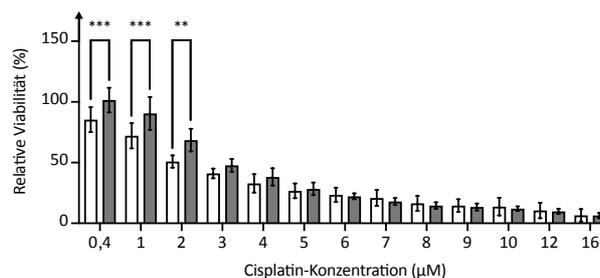


Abb. 21: Einfluss von KM auf die Cisplatinresistenz von UMUC-3. Die Inkubation von UMUC-3 mit KM führte zu einer erhöhten Viabilität der Zellen im Vergleich zur DMEM-Kontrolle im Konzentrationsbereich zwischen 0,4 - 2 µM Cisplatin (Mittelwert ± SD normalisiert auf eine Proliferationskontrolle desselben Nährmediums ohne Cisplatinzusatz (nicht abgebildet, n = 10, tR = 3)).

4.2.4 Einfluss auf den Stammzellcharakter der UCC

Für epitheliale UCC gilt das Filamentprotein CK14 als aussagekräftiger Marker des besonders aggressiven CSC-Phänotyps, der u. a. mit einer erhöhten Chemotherapieresistenz der Zellen assoziiert ist [79] (Abschnitt 1.2.3). Für die epithelialen UCC BFTC-905 und VMCUB-1 wurde daher im direkten Anschluss an die Inkubation der Zellen mit KM die CK14-Expression ermittelt. Zusätzlich wurde auch der Einfluss von Cisplatin betrachtet. Da CK14 von mesenchymalen UCC nicht exprimiert

wird, wurde auf die Untersuchung der mesenchymalen UCC UMUC-3 in diesem Versuchsansatz verzichtet [79].

Abb. 22 lässt sich entnehmen, dass die Inkubation von BFTC-905 in KM zu keiner relevanten Änderung des CK14-Expressionsniveaus führte. Nach der Behandlung von BFTC-905 mit Cisplatin exprimierten die Zellen sowohl in DMEM als auch in KM signifikant mehr CK14 im Vergleich zur DMEM-Kontrolle ohne Cisplatin ($p \leq 0,001$ bzw. $p \leq 0,01$, KI (DMEM + CP): -14,1 - -5,9, KI (KM + CP): -11,5 - -1,5).

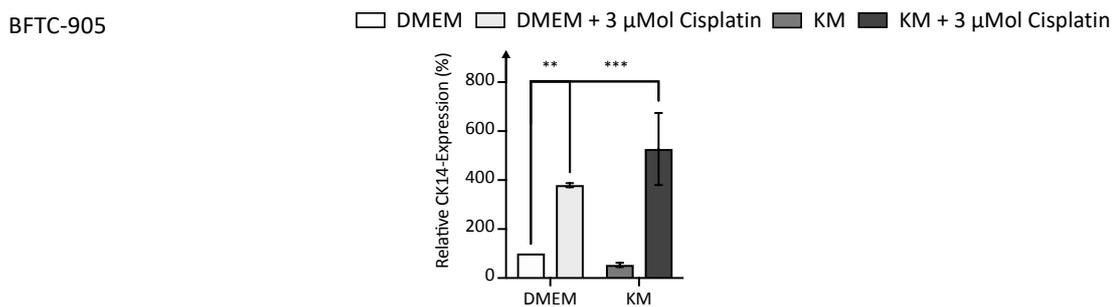


Abb. 22: Effekte der FB (KM) und Cisplatin auf die mRNA-Expression von CK14 für BFTC-905. Nach der Behandlung von BFTC-905 mit Cisplatin exprimierten die Zellen sowohl in DMEM als auch in KM signifikant mehr CK14 (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 3, tR = 3)).

Die löslichen Signalstoffe im KM bewirkten eine tendenzielle Zunahme der CK14-Expression von VMCUB-1 (Abb. 23). Ähnlich wie für BFTC-905 steigerte die Zugabe von Cisplatin im KM der FB signifikant das Expressionsniveau von CK14 ($p \leq 0,01$, KI (KM + CP): -5,8 - -2,0).

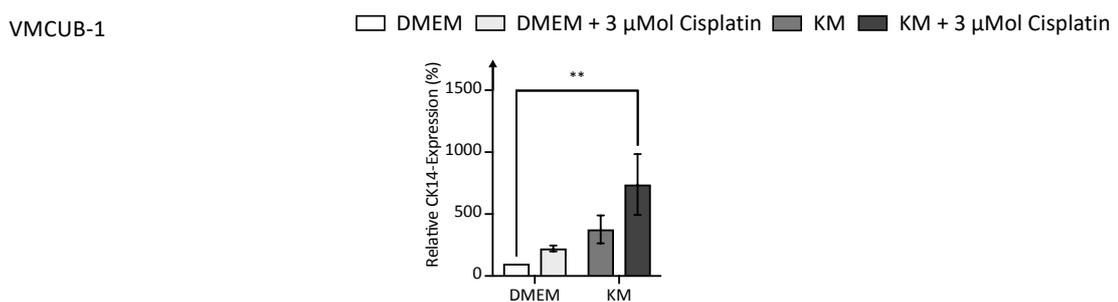


Abb. 23: Effekte von KM und Cisplatin auf die mRNA-Expression von CK14 für VMCUB-1. Insbesondere die Behandlung von VMCUB-1 mit Cisplatin resultierte in einer tendenziellen (DMEM) bzw. signifikanten Steigerung (KM) der CK14-Expression der Zellen (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 3, tR = 3)).

Zusammengefasst induzierte insbesondere die Behandlung der VMCUB-1 mit Cisplatin eine Zunahme der CK14-Expression, welche zusätzlich in der Tendenz durch KM der FB verstärkt wurde.

4.2.5 Effekte des KM auf den Immunphänotyp

Durch eine erhöhte Expression der Proteine PD-L1 und PD-L2 auf der Zelloberfläche inhibieren UCC die antitumorale T-Zellaktivität und entziehen sich dadurch der körpereigenen Immunabwehr [146]. Zur Untersuchung des Einflusses von KM auf den Immunphänotyp der UCC wurde die PD-L1- und PD-L2-Expression nach Kultivierung in KM bzw. DMEM (Kontrolle) bestimmt.

Abb. 24 veranschaulicht, dass BFTC-905 im Vergleich zur DMEM-Kontrolle nach der Inkubation mit KM signifikant mehr PD-L1 (A) und PD-L2 (B) exprimierten ($p \leq 0,01$, KI (PD-L1): 0,8 - 2,3, KI (PD-L2): 0,9 - 2,8).

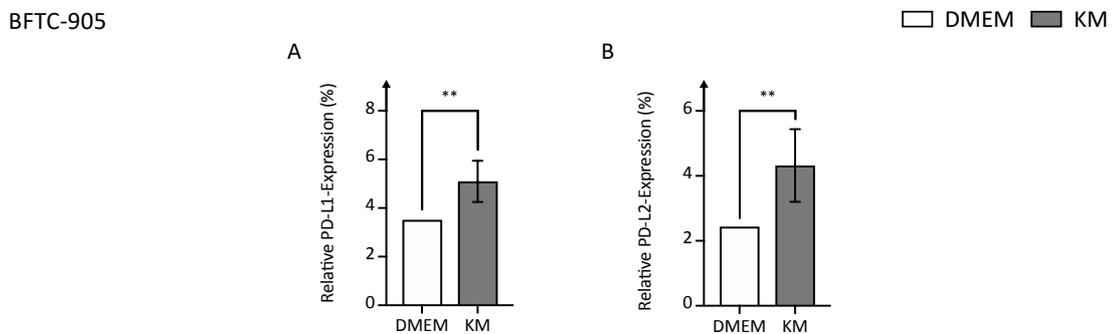


Abb. 24: Effekte von KM auf die Proteinexpression von PD-L1 (A) und PD-L2 (B) für BFTC-905. BFTC-905 exprimierten nach der Kultivierung im KM signifikant mehr PD-L1 (A) und PD-L2 (B) (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A/B: $n = 9$, $tR = 3$)).

Für VMCUB-1 (Abb. 25, A/B) zeigten sich durch die Inkubation mit KM keine signifikanten Änderungen des Expressionsniveaus von PD-L1- und PD-L2.

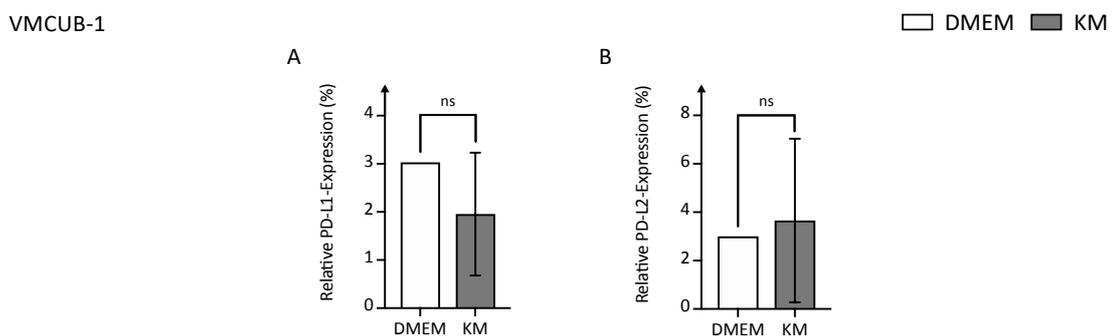


Abb. 25: Effekte von KM auf die Proteinexpression von PD-L1 (A) und PD-L2 (B) für VMCUB-1. VMCUB-1 wies nach der Kultivierung im KM keine relevante Änderung der PD-L1- (A) und PD-L2-Expression (B) auf (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A/B: $n = 9$, $tR = 3$)).

Komplettiert wurden die Ergebnisse zum immunologischen Phänotyp der UCC durch die Ergebnisse für UMUC-3. Abb. 26 verdeutlicht, dass das PD-L1-Expressionsniveau von

UMUC-3 im KM tendenziell erniedrigt war, wohingegen die PD-L2-Expression weitgehend unbeeinflusst blieb (Abb. 26).

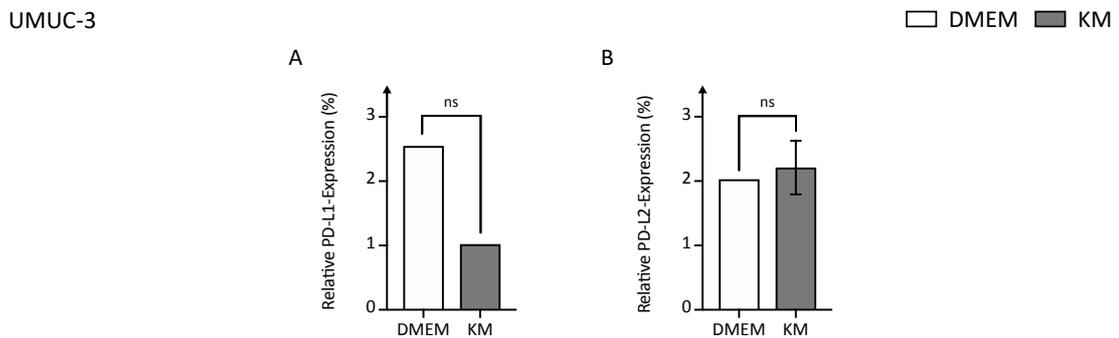


Abb. 26: Effekte des FB-KM auf die Proteinexpression von PD-L1 (A) und PD-L2 (B) für UMUC-3. Signifikante Änderungen der PD-L1- und PD-L2-Expression blieben nach der Kultivierung von UMUC-3 in KM aus (A: n = 2/B: n = 6, tR = 3)).

4.2.6 Auswirkungen des KM auf die Migration

Eine gesteigerte migratorische Aktivität gilt als ein Merkmal für den aggressiven Phänotyp von UCC, sodass entsprechend auch die Auswirkungen des KM bezüglich der Migration der Zellen analysiert wurde (siehe Abschnitt 1.2.5).

Die lichtmikroskopischen Bilder der BFTC-905 in Abb. 27 (A) zeigten, dass bis zum Abschluss des Beobachtungszeitraumes nach 12 h sowohl in DMEM als auch KM eine ähnliche Anzahl von Zellen in das zellfreie Areal migriert waren. Die weiterführenden Analysen (B) bestätigten, dass sich die migratorische Kapazität der Zellen in KM und DMEM nicht signifikant voneinander unterschied. Nach der Zugabe von Cisplatin (B) konnten in DMEM hingegen tendenziell und in KM signifikant weniger migrierte Zellen nachgewiesen werden ($p \leq 0,01$, KI (KM + CP): 8,6 - 73,7).

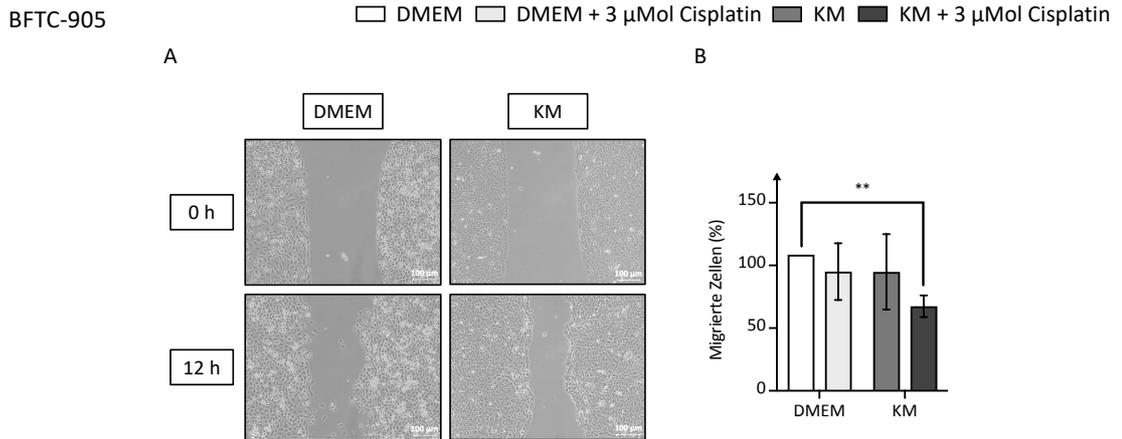


Abb. 27: Einfluss von KM und Cisplatin auf die Migration von BFTC-905. Nach der Behandlung mit Cisplatin migrierten im KM signifikant weniger Zellen in den ursprünglich zellfreien Bereich im Vergleich zur DMEM-Kontrolle ohne Cisplatinzusatz (A Lichtmikroskopische Aufnahmen zu Beginn (0 h) und Abschluss (12 h) der Migrationsanalyse in 10 x Vergrößerung, B Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle ($n = 7$, $tR = 2$)).

Für VMCUB-1 zeigte weder die Inkubation im KM noch die Cisplatinbehandlung der Zellen eine relevante Änderung der migratorischen Aktivität (Abb. 28 A/B).

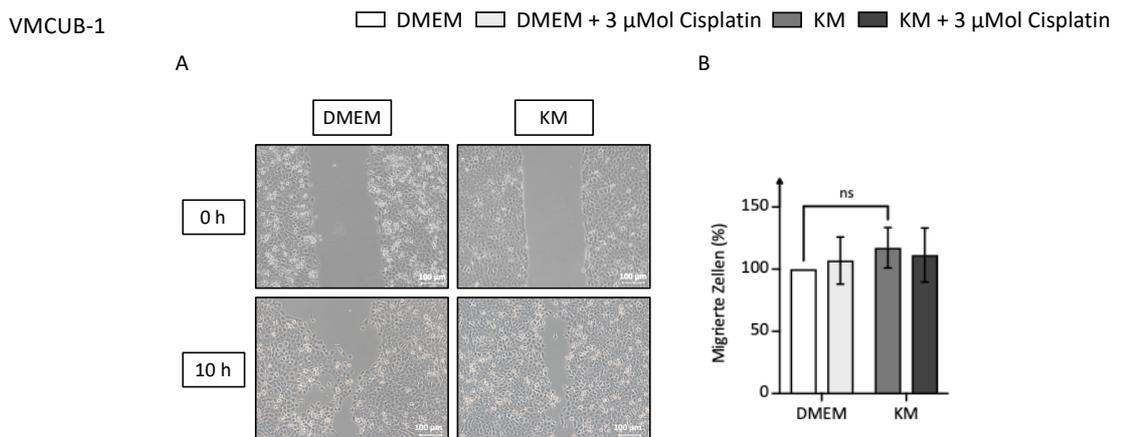


Abb. 28: Einfluss von KM und Cisplatin auf die Migration von VMCUB-1. Die migratorische Kapazität von VMCUB-1 blieb sowohl von der Kultivierung in KM als auch vom Cisplatinzusatz unbeeinflusst (A Lichtmikroskopische Aufnahmen zu Beginn (0 h) und Abschluss (10 h) der Migrationsanalyse in 10 x Vergrößerung, B Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle ($n = 8$, $tR = 2$)).

Die Inkubation von UMUC-3 mit KM der FB hatte im Vergleich eine Reduktion der Migration zur Folge, die sich sowohl in den lichtmikroskopischen Aufnahmen (A) als auch in dem zugehörigen Graphen (B) in Abb. 29 widerspiegelte ($p \leq 0,01$, KI (KM): -40,8 - -14,7). Die Zugabe von Cisplatin zu den Zellen veränderte die Migration von UMUC-3 nicht relevant.

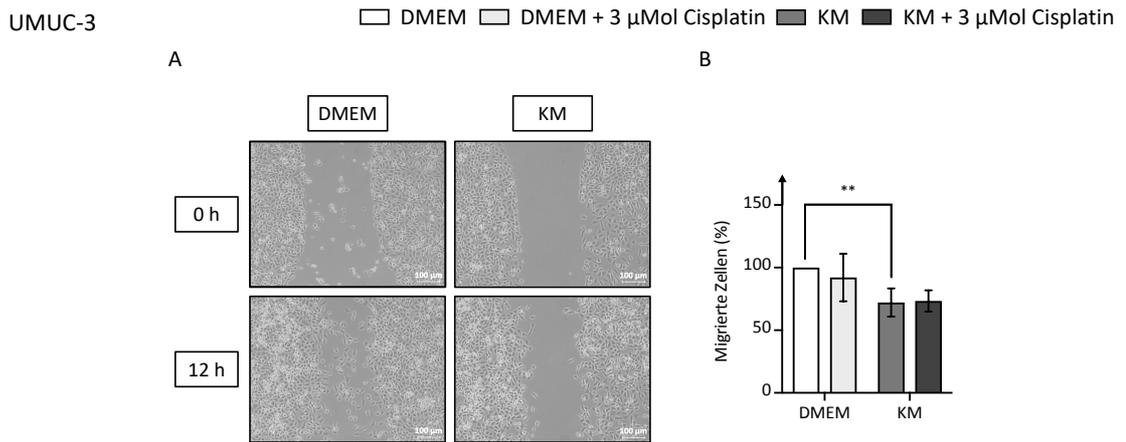


Abb. 29: Einfluss von KM und Cisplatin auf die Migration von UMUC-3. Die Kultivierung von UMUC-3 im KM reduzierte die migratorische Kapazität signifikant (A Lichtmikroskopische Aufnahmen zu Beginn (0 h) und Abschluss (12 h) der Migrationsanalyse in 10 x Vergrößerung, B Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 9, tR = 2)).

4.2.7 Modulation der Invasivität der UCC

Neben den migratorischen Aspekten wurden die invasiven Eigenschaften der UCC näher betrachtet. Zudem wurden neben einer Invasionsanalyse die Effekte des KM auf die Proteinexpression des CSC-Markers CD44 auf der Zelloberfläche eruiert.

4.2.7.1 Invasionsanalyse

Wie in Abb. 30 dargestellt, konnte für BFTC-905 nach einer Inkubation mit den Überständen (KM) der FB nach 24 h im Vergleich zur DMEM-Kontrolle keine wesentliche Änderung der Anzahl invasiver Zellen detektiert werden (A). Wurden die BFTC-905 allerdings mit KM vorkonditioniert (VK-KM-Gruppe, Abschnitt 3.3.4) kam es zu einem visuell deutlich erkennbaren Anstieg der invasiven Zellen auf der Membran. Die zugehörige Auswertung (B) belegt die statistische Signifikanz dieses Invasivitätsfördernden Effekts einer Vorkonditionierung der BFTC-905 ($p \leq 0,001$, KI (VK-KM): 5789 - 7545).

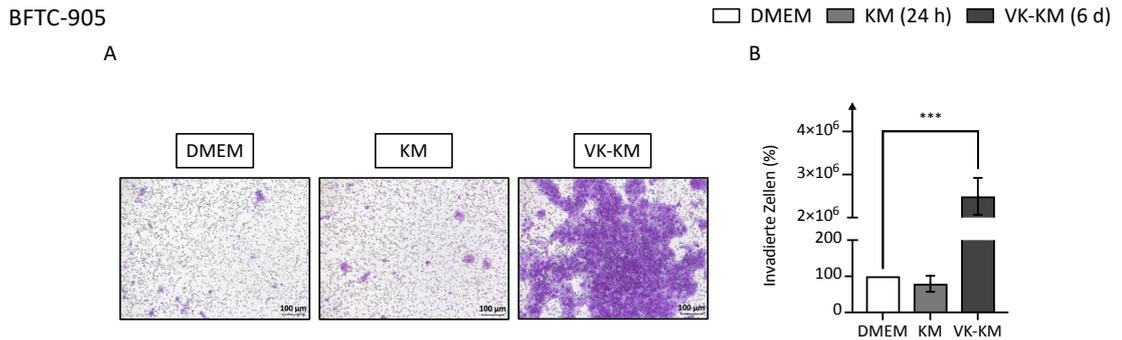


Abb. 30: Invasionsanalyse von BFTC-905 nach 24h Inkubation und nach Vorkonditionierung mit KM. Die Vorkonditionierung von BFTC-905 steigerte die Anzahl invasiver Zellen signifikant (A Lichtmikroskopische Aufnahmen der Membranen nach Abschluss der Inkubationszeit in 10 x Vergrößerung, B Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 6, tR = 6)).

Für VMCUB-1 (Abb. 31) ließen sich lichtmikroskopisch nach Inkubation in KM sichtbar mehr invasive Zellen auf den Membranen erkennen (A), weshalb auf eine ergänzende Vorkonditionierung der Zellen verzichtet wurde. Auch für VMCUB-1 stellte sich die Invasivität-fördernde Wirkung (B) des KM statistisch signifikant dar ($p \leq 0,01$, KI: 55,5 - 187).

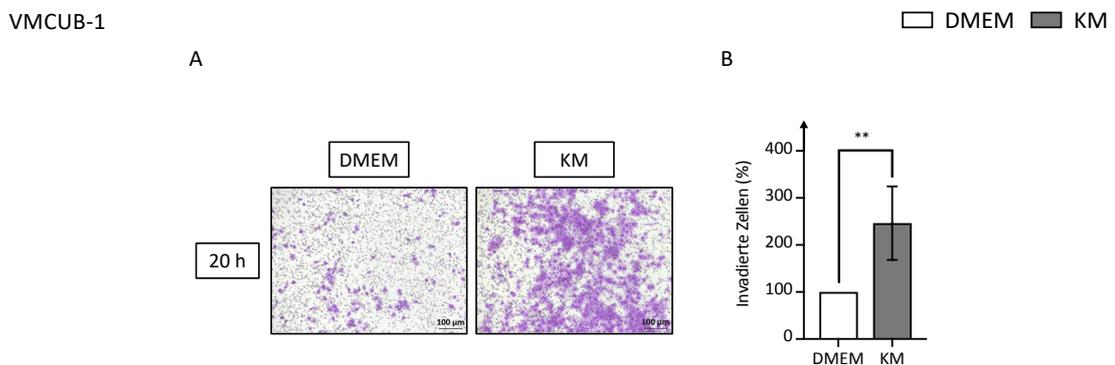


Abb. 31: Invasionsanalyse von VMCUB-1 im KM. Nach dem Einsatz von KM wurden für VMCUB-1 (20 h) signifikant mehr invasive Zellen detektiert (A Lichtmikroskopische Aufnahmen der Membranen nach Abschluss der Inkubationszeit in 10 x Vergrößerung, B Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 6, tR = 6)).

Ebenso demonstrierten die lichtmikroskopischen Aufnahmen für UMUC-3 (Abb. 32) (A) eine deutliche Zunahme der invasiven Zellen auf der Membran für die KM-Gruppe im Vergleich zur DMEM-Kontrolle. Dieser Effekt (B) war ebenfalls statistisch signifikant ($p \leq 0,05$, KI: 45,3 – 207).

UMUC-3

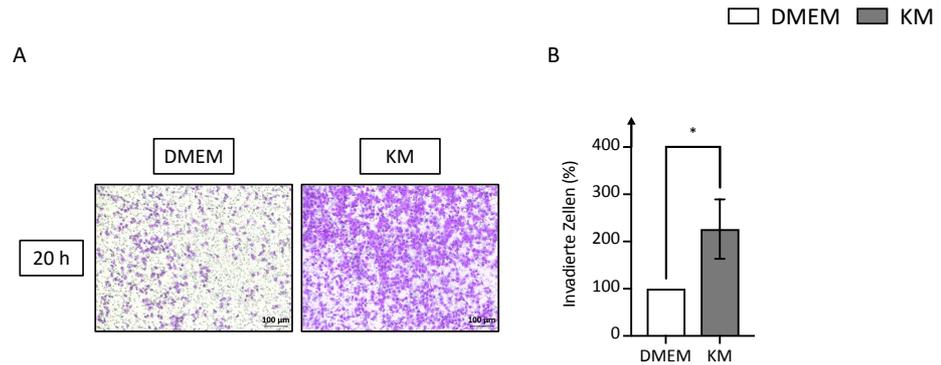


Abb. 32: Invasionsanalyse von UMUC-3 im KM. Nach Einsatz von KM (20h) wurden für UMUC-3 signifikant mehr invasive Zellen detektiert (A Lichtmikroskopische Aufnahmen der Membranen nach Abschluss der Inkubationszeit in 10 x Vergrößerung, B Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 6, tR = 6)).

In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse führte der Einsatz von KM in den Invasionsanalysen für alle untersuchten UCC zu einer gesteigerten Invasivität.

4.2.7.2 Evaluation der CD44-Expression

Im Anschluss an die Invasionsanalysen wurden die Auswirkungen der FB auf die Proteinexpression des Invasivitäts- und CSC-Markers CD44 untersucht, dessen gesteigerte Expression gemäß Literatur mit einer erhöhten Invasivität, Migration und EMT-Induktion von MIUC assoziiert ist [109].

Die Vorkonditionierung von BFTC-905 (Abb. 33) mit KM bewirkte eine Zunahme der CD44-Expression um ca. das 12-Fache verglichen mit der DMEM-Kontrolle ($p \leq 0,01$, KI: 10,7 - 32,8).

BFTC-905

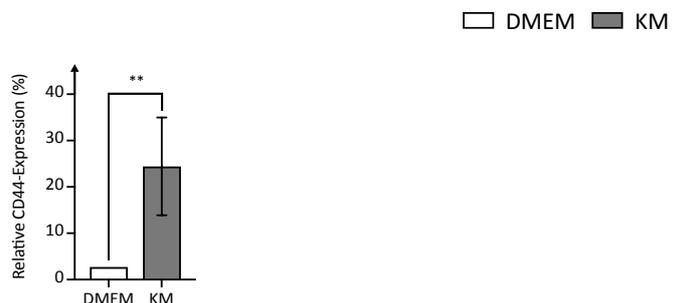


Abb. 33: Einfluss von KM auf die Proteinexpression von CD44 für BFTC-905. Die Inkubation von BFTC-905 mit KM steigerte die Expression von CD44 signifikant im Vergleich zur DMEM-Kontrolle (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 3, tR = 3)).

Im Unterschied hierzu exprimierte VMCUB-1 (Abb. 34) im KM signifikant weniger CD44 auf der Zelloberfläche ($p \leq 0,001$, KI: -2,5 - -1,8).

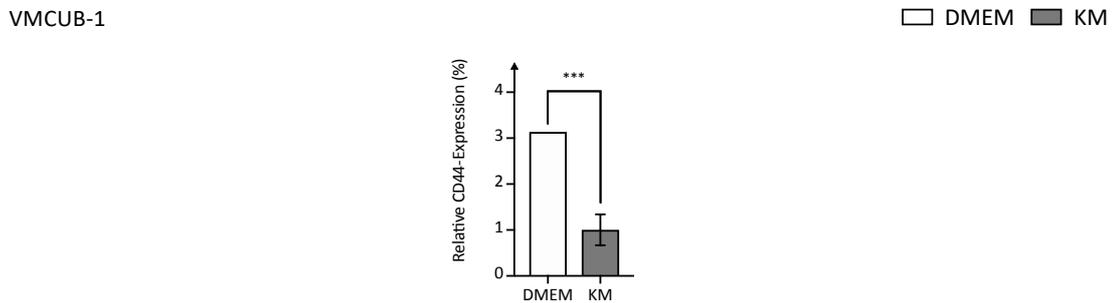


Abb. 34: Einfluss von KM auf die Proteinexpression von CD44 für VMCUB-1. Die Inkubation von VMCUB-1 mit KM reduzierte die Expression von CD44 signifikant im Vergleich zur DMEM-Kontrolle (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle ($n = 3$, $tR = 3$)).

Auch für UMUC-3 (Abb. 35) konnte nach der Vorkonditionierung mit KM ein signifikant niedrigeres CD44-Expressionsniveau detektiert werden ($p \leq 0,01$, KI: -3,4 - -1,7).

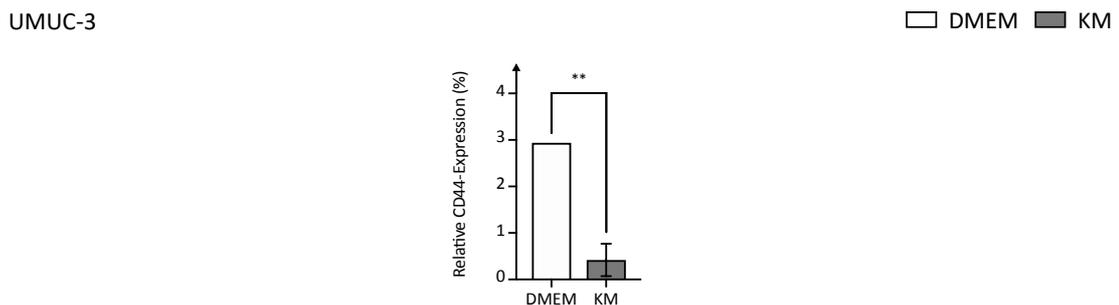


Abb. 35: Einfluss von KM auf die Proteinexpression von CD44 für UMUC-3. Die Inkubation von UMUC-3 mit KM reduzierte die Expression von CD44 signifikant im Vergleich zur DMEM-Kontrolle (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle ($n = 3$, 3 tR)).

4.2.8 Einfluss von FB auf die Metastasierung und den zellulären Phänotyp

Da nach der Ausbildung von Fernmetastasen in aller Regel keine kurative Therapie eines MIUC der Harnblase mehr möglich ist, sind die Untersuchungen zum Einfluss des KM auf Aspekte der Metastasierung der UCC ein zentraler Schwerpunkt dieser Arbeit [1]. Im Fokus standen insbesondere die Analysen des zellulären Phänotyps auf Ebene der Gen- und Proteinexpression inklusive der damit einhergehenden Aufarbeitung eines EMT-induzierenden Potenzials des KM auf die UCC.

4.2.8.1 Lichtmikroskopische Phänotypisierung

Initial erfolgte der Vergleich lichtmikroskopischer Aufnahmen der UCC nach Inkubation im KM und DMEM, um hier einen ersten Eindruck zu den Auswirkungen des KM auf den Phänotyp der UCC zu gewinnen.

Beim Vergleich der Bilder in Abb. 36 fällt auf, dass die ursprünglich epithelialen Zellverbände der BFTC-905 nach der Kultivierung im KM sichtbar aufgelockert erschienen. Zudem waren bei BFTC-905 im KM insgesamt mehr Zellen mit einer spindelförmigen, mesenchymalen Morphologie erkennbar.

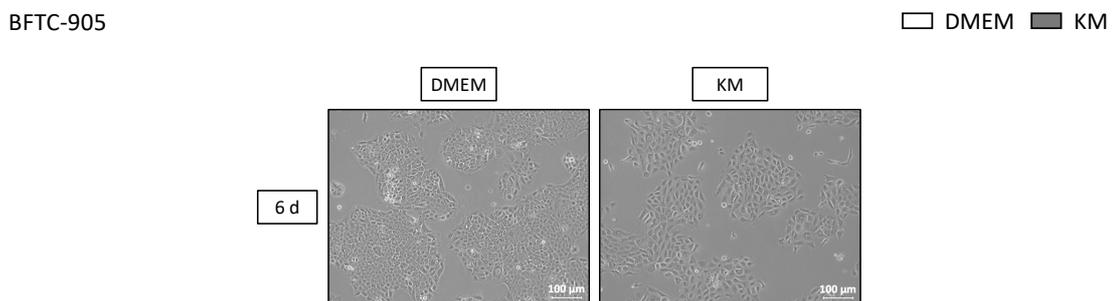


Abb. 36: Zellmorphologie von BFTC-905 nach Vorkonditionierung mit KM. Die Kultivierung von BFTC-905 in KM bewirkte eine Auflockerung der epithelialen Zellverbände sowie eine Zunahme von Zellen mit einem visuell mesenchymalen Phänotyp (lichtmikroskopische Aufnahmen, 10 x Vergrößerung).

Für VMCUB-1 ließen sich lichtmikroskopisch keine wesentlichen morphologischen Veränderungen nach der Inkubation mit KM erfassen (Abb. 37).

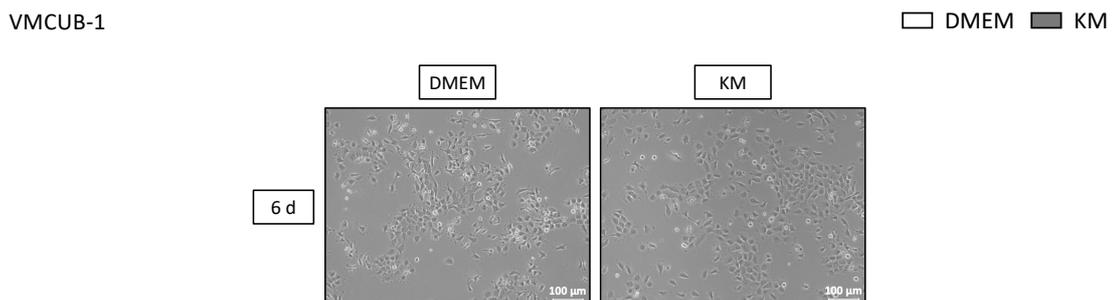


Abb. 37: Zellmorphologie von VMCUB-1 nach Vorkonditionierung mit KM. Die Kultivierung von VMCUB-1 in KM bewirkte keine mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Zellmorphologie von VMCUB-1 (lichtmikroskopische Aufnahmen, 10 x Vergrößerung).

Ähnlich wie für VMCUB-1 waren auch für UMUC-3 keine deutlichen Veränderungen der Zellmorphologie nach dem Kontakt mit den parakrinen Faktoren der FB im KM sichtbar (Abb. 38).

UMUC-3

□ DMEM ■ KM

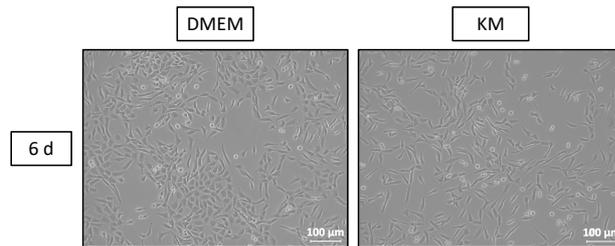


Abb. 38: Zellmorphologie von UMUC-3 nach Vorkonditionierung mit KM. Die Kultivierung von UMUC-3 in KM bewirkte keine mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Zellmorphologie von UMUC-3 (lichtmikroskopische Aufnahmen, 10 x Vergrößerung).

4.2.8.2 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Nachfolgend wurden die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Zellmorphologie um molekularbiologische Analysen des zellulären Phänotyps ergänzt.

Auf Genexpressionsebene wurde, soweit möglich, E-Cadherin als epithelialer Marker bestimmt, dessen erhöhte Expression die Zunahme epithelialer Eigenschaften annehmen lässt. Als Korrelat des mesenchymalen Phänotyps wurde das Filamentprotein Vimentin ausgewählt. Zusätzlich wurde als Effektmaß der jeweilige Vimentin/E-Cadherin-Quotient gebildet. Je größer der genannte Quotient ausfiel, desto stärker war der EMT-induzierende Effekt des KM auf die untersuchte UCC. Eine Abnahme des Quotienten sprach hingegen für eine Verstärkung epithelialer Eigenschaften und somit einer MET-Induktion. Die Ergebnisse wurden anschließend auf Proteinexpressionsebene verifiziert, wobei neben Vimentin α -SMA als zusätzlicher zweiter mesenchymaler Marker bestimmt wurde. Auf Genexpressionsebene wurden zusätzlich die Auswirkungen einer Cisplatinbehandlung auf die UCC untersucht.

In Abb. 39 werden die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen für BFTC-905 zusammengefasst. Es fällt auf, dass die FB keine relevante Änderung der E-Cadherin-Expression in BFTC-905 induzieren konnten (A), jedoch signifikant mehr Vimentin (B) exprimierte als die BFTC-905 der DMEM-Kontrolle ($p \leq 0,05$, KI (KM): -0,009 -- -0,0008). Diese Verstärkung mesenchymaler Eigenschaften von BFTC-905 durch die Signalfaktoren im KM spiegelte sich in einem höheren Vimentin/E-Cadherin-Quotienten wider. Im Gegensatz hierzu führte die Behandlung von BFTC-905 mit Cisplatin sowohl in

DMEM als auch in KM zu einer signifikanten Zunahme der E-Cadherin-Expression (A) ($p \leq 0,001$, KI (DMEM + CP): -0,6 - -0,3).

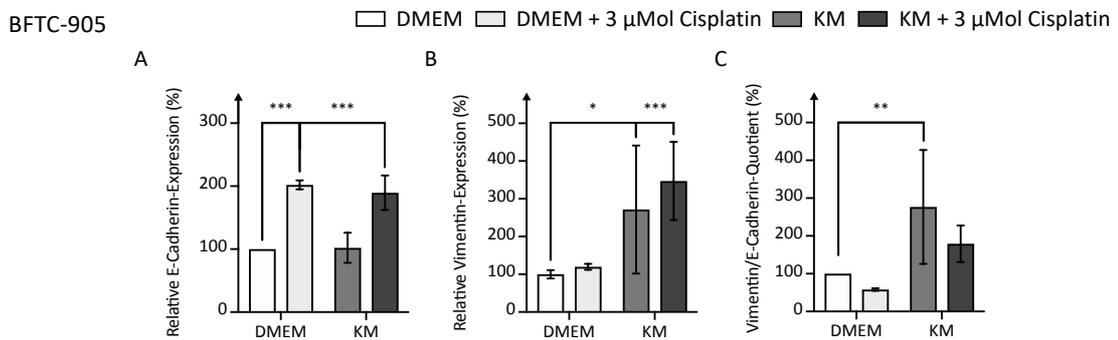


Abb. 39: Auswirkungen von KM und Cisplatin auf die mRNA-Expression von E-Cadherin (A), Vimentin (B) und den Vimentin/E-Cadherin-Quotienten (C) für BFTC-905. Die Vorkonditionierung von BFTC-905 mit KM bewirkte eine gesteigerte Vimentin-Expression (B), was in einer relevanten Erhöhung des Vimentin/E-Cadherin-Quotienten (C) resultierte. Nach der Cisplatinbehandlung exprimierten die Zellen hingegen mehr E-Cadherin (A) (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A/B/C: n = 5, tR = 3)).

Auf Proteinexpressionsebene (Abb. 40) ließ sich der EMT-induzierende Effekt des KM auf BFTC-905 bedingt in Form einer unveränderten E-Cadherin (A) und einer tendenziell gesteigerten Vimentin-Expression (B) bestätigen. Für die Förderung eines mesenchymalen Phänotyps von BFTC-905 durch die Wirkung des KM sprach zudem ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau von α -SMA (C: $p \leq 0,05$, KI: -3,3 - -102).

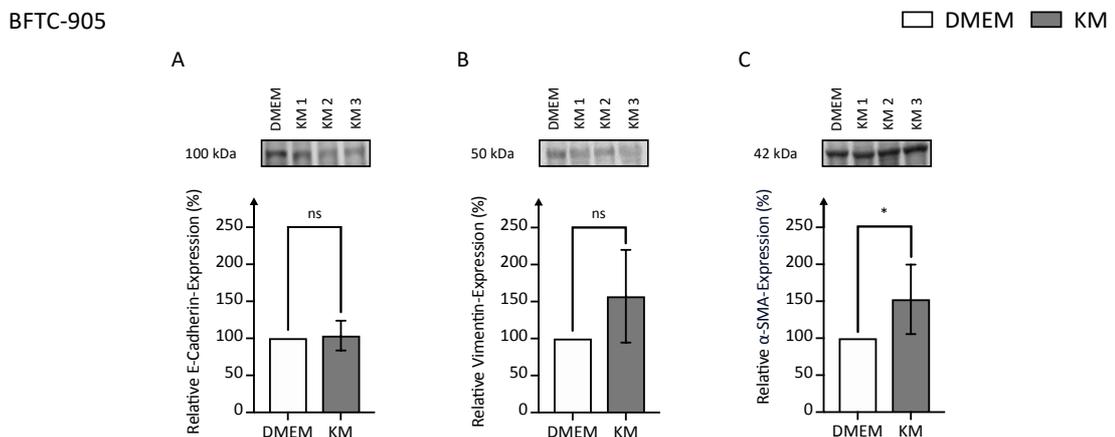


Abb. 40: Effekte von KM auf die Proteinexpression von E-Cadherin (A), Vimentin (B) und α -SMA (C) für BFTC-905. Auf Proteinebene ließen sich im Anschluss an die Vorkonditionierung von BFTC-905 mit KM eine tendenzielle Steigerung der Vimentin-Expression (B) sowie ein signifikant erhöhtes α -SMA-Expressionsniveau feststellen (C) (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A/B/C: n = 3)).

Im Gegensatz zum EMT-induzierenden Effekt des KM auf BFTC-905 wies VMCUB-1 (Abb. 41) als Folge der Inkubation mit KM eine Verstärkung des epithelialen Phänotyps

in Form einer signifikant erhöhten E-Cadherin- (A) und zugleich erniedrigten Vimentin-Expression (B) auf (A: $p \leq 0,001$, KI (KM): -0,1 - -0,03; B: $p \leq 0,001$, KI (KM): -0,0006 - -0,002). Die Inkubation in KM resultierte bei VMCUB-1 in einer relevanten Reduktion des Vimentin/E-Cadherin-Quotienten (C: $p \leq 0,001$, KI (KM): 0,5 - 1,3). Der Cisplatinzusatz zu den Zellen führte zu keiner signifikanten Änderung des Expressionsniveaus der untersuchten Zielgene.

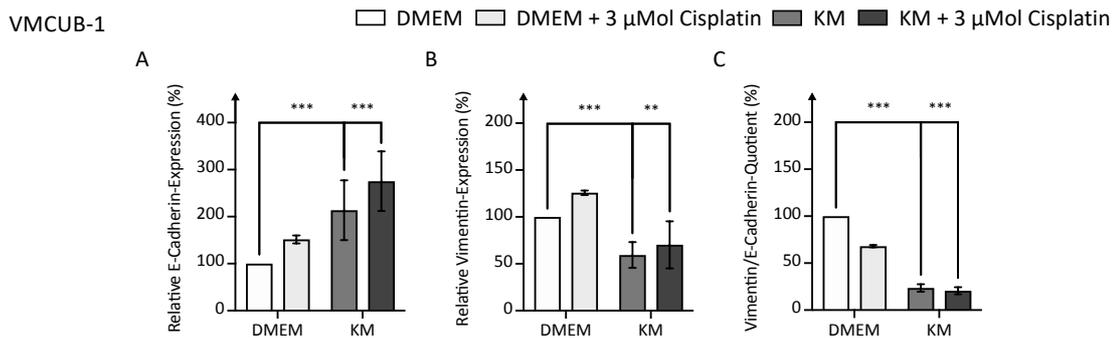


Abb. 41: Auswirkungen von FB und Cisplatin auf die mRNA-Expression von E-Cadherin (A), Vimentin (B) und den Vimentin/E-Cadherin-Quotienten (C) für VMCUB-1. Die Vorkonditionierung von VMCUB-1 mit KM bewirkte eine MET-Induktion in Form einer erhöhten E-Cadherin- (A) und erniedrigten Vimentin-Expression (B), was in einer relevanten Reduktion des Vimentin/E-Cadherin-Quotienten (C) resultierte (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A/B/C: $n = 5$, $tR = 3$)).

Die Ergebnisse der Proteinexpressionsanalysen für VMCUB-1 (Abb. 42) deckten sich weitgehend mit dem zuvor beschriebenen MET-induzierenden Effekt des KM. So konnten auch auf Proteinebene ein gesteigertes E-Cadherin (A) und erniedrigtes Vimentin-Expressionsniveau (B) der Zellen nachgewiesen werden, die mit dem KM der FB inkubiert wurden (A: $p \leq 0,05$, KI: 10,7 - 137,4; B: $p \leq 0,01$, KI: -91,0 - -58,7), wobei die Zellen nach der Kultivierung im KM dennoch signifikant mehr α -SMA exprimierten (C: $p \leq 0,05$, KI: 19,6 - 93,4).

VMCUB-1

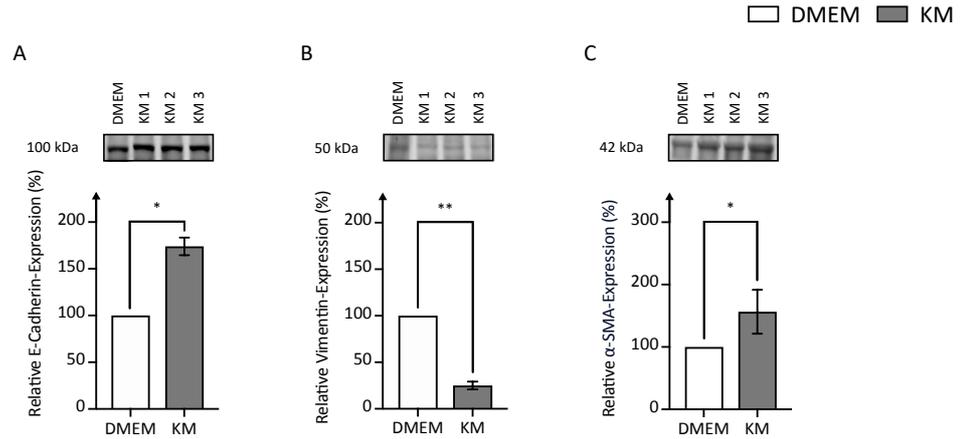


Abb. 42: Effekte von drei unterschiedlichen KM (1 - 3) auf die Proteinexpression von E-Cadherin (A), Vimentin (B) und α -SMA (C) für VMCUB-1. Nach der Vorkonditionierung mit KM exprimierten die Zellen signifikant mehr E-Cadherin (A) und weniger Vimentin (B). Trotz dieser MET-induzierenden Wirkung des KM auf VMCUB-1, wurde eine erhöhte α -SMA-Expression (C) der Zellen im KM detektiert (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A/B/C: n = 3).

Da sich UMUC-3 im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten UCC durch einen ursprünglich mesenchymalen Phänotyp mit sehr niedrigem E-Cadherin-Expressionsniveau kennzeichnet (Tabelle 15), gelang im Zuge der Genexpressionsanalysen keine adäquate E-Cadherin-Detektion. Alternativ erfolgte daher die Bestimmung des Transkriptionsfaktors ZEB-1, der wie auch Vimentin zu den mesenchymalen Markern gehört und dessen erhöhte Expression daher auf eine EMT hinweist [137]. Wie Abb. 43 veranschaulicht, exprimierte UMUC-3 nach der Kultivierung im KM mehr ZEB-1 (A), wohingegen das Vimentin-Expressionsniveau (B) nahezu unverändert blieb (A: $p \leq 0,05$, KI (KM): -1,5 - -0,1). Nach dem Zusatz von Cisplatin exprimierten die Zellen in DMEM signifikant mehr Vimentin (B: $p \leq 0,05$, KI (DMEM + CP): -1,3 - -0,01). In Summe konnten also Marker des mesenchymalen Phänotyps von UMUC-3 sowohl durch die Signalfaktoren im KM als auch durch die Zugabe von Cisplatin verstärkt nachgewiesen werden.

UMUC-3

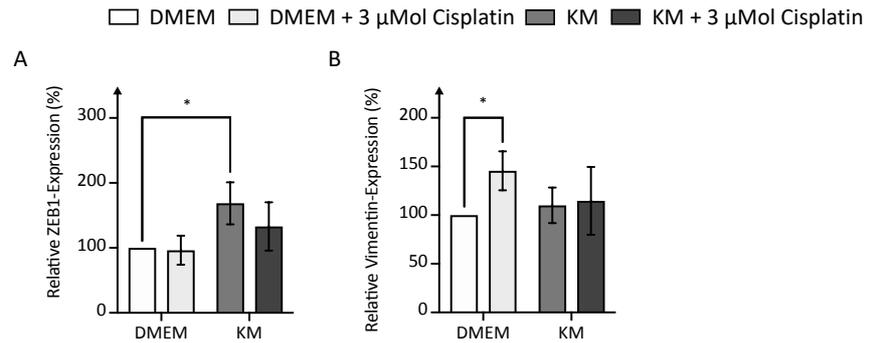


Abb. 43: Auswirkungen von KM und Cisplatin auf die mRNA-Expression von ZEB-1 (A) und Vimentin (B) für UMUC-3. Die Vorkonditionierung von UMUC-3 mit KM bewirkte eine Verstärkung der mesenchymalen Eigenschaften in Form einer erhöhten ZEB-1-Expression (A). Die Cisplatinbehandlung führte in DMEM ebenfalls zu einer Verstärkung mesenchymaler Eigenschaften, da die Zellen signifikant mehr Vimentin exprimierten (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A/B: $n = 5$, $t_r = 3$)).

Auf Proteinebene gelang für UMUC-3 der Nachweis von E-Cadherin, jedoch konnte für keines der untersuchten Zielproteine eine relevante Änderung des jeweiligen Expressionsniveaus nach der Inkubation der Zellen mit KM nachgewiesen werden (Abb. 44).

UMUC-3

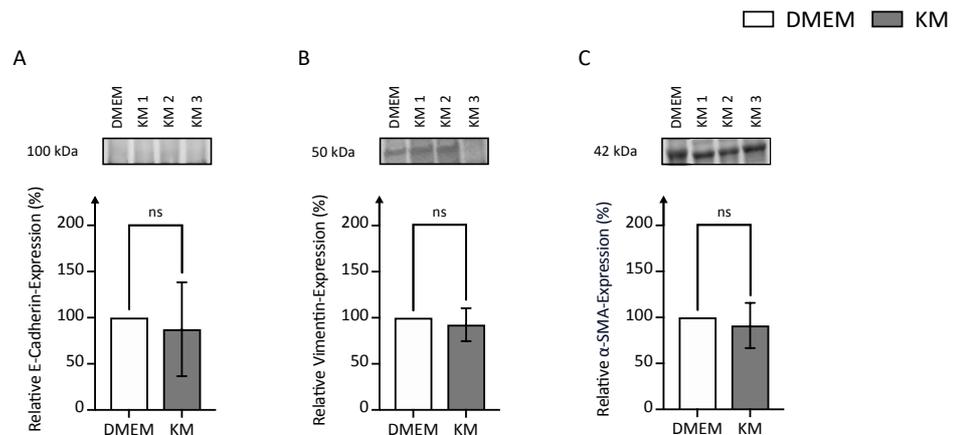


Abb. 44: Effekte von drei unterschiedlichen KM (1 - 3) auf die Proteinexpression von E-Cadherin (A), Vimentin (B) und α -SMA (C) für UMUC-3. Die Vorkonditionierung von UMUC-3 mit KM bewirkte keine relevante Änderung (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A/B/C: $n = 3$)).

In Zusammenschau der Ergebnisse konnte ein UCC-spezifischer Effekt des KM auf den molekularen Phänotyp der Zellen festgehalten werden, der für BFTC-905 und UMUC-3 in einer Verstärkung mesenchymaler Eigenschaften (EMT-Induktion) und für VMCUB-1 in einer Förderung epithelialer Charakteristika (MET-Induktion) bestand.

4.2.8.3 Auswirkungen auf die TGF- β -Signaltransduktion durch FB

Zusätzlich wurde die Wirkung von FB auf Zielgene des kanonischen TGF-Signalwegs als Induktor der EMT untersucht (Abschnitt 1.2.6.3) [140].

4.2.8.3.1 PAI-1-Expression in UCC

Das Protein PAI-1 wird als ein Produkt der SMAD-abhängigen TGF- β -Signaltransduktion von Zellen in den Extrazellulärraum sekretiert, so dass eine erhöhte PAI-1-Konzentration im Überstand auf eine verstärkte Aktivierung der TGF- β -Signalwegs hinweisen kann (Abb. 6) [141].

Abb. 45 veranschaulicht, dass die PAI-1-Konzentration in den Zellkulturüberständen nach der Vorkonditionierung von BFTC-905 mit KM mehr als doppelt so hoch war wie in der DMEM-Kontrolle ($p \leq 0,001$, KI: 153 - 173).

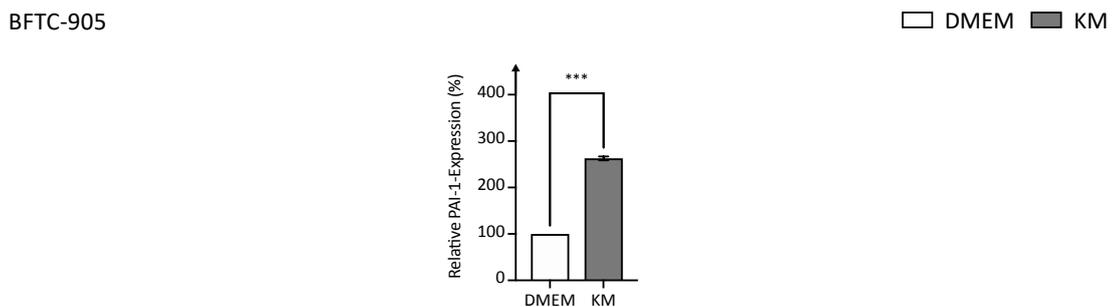


Abb. 45: Auswirkungen von KM auf die PAI-1-Sekretion von BFTC-905. Nach der Vorkonditionierung der Zellen mit KM fiel eine signifikant erhöhte PAI-1-Konzentration in den entnommenen Zellkulturüberständen auf (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle ($n = 3$, $tR = 3$)).

Nach der Kultivierung von VMCUB-1 (Abb. 46) im KM lag die gemessene PAI-1-Konzentration sogar um das 4-fache höher als in den Zellkulturüberständen der DMEM-Kontrolle ($p \leq 0,001$, KI: 333 - 384).

VMCUB-1

□ DMEM ■ KM

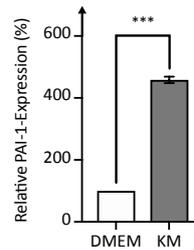


Abb. 46: Auswirkungen von KM auf die PAI-1-Sekretion von VMCUB-1. Nach der Vorkonditionierung der Zellen mit KM fiel eine signifikant erhöhte PAI-1-Konzentration in den entnommenen Zellkulturüberständen auf (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 3, tR = 3)).

Ebenso konnte auch für UMUC-3 nach erfolgter Vorkonditionierung eine signifikant erhöhte PAI-1-Konzentration in den KM-Überständen detektiert werden (Abb. 47) ($p \leq 0,001$, KI: 70 - 82).

UMUC-3

□ DMEM ■ KM

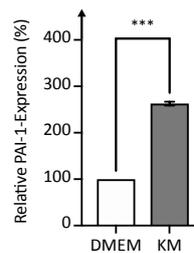


Abb. 47: Auswirkungen von KM auf die PAI-1-Sekretion von UMUC-3. Nach Vorkonditionierung der Zellen mit KM fiel eine signifikant erhöhte PAI-1-Konzentration um mehr als das Doppelte in den entnommenen Zellkulturüberständen auf (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 3, tR = 3)).

4.2.8.3.2 SMAD4-Expression

In Analogie zu PAI-1 weist auch eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors SMAD4 auf eine Aktivierung der TGF- β -Signaltransduktion hin (Abb. 6) [140]. Daher wurde im Anschluss an die Kultivierung der UCC im KM der FB das Expressionsniveau von SMAD4 analysiert.

Die zuvor gezeigte aktivierende Wirkung des KM auf den TGF- β -Signalweg für BFTC-905 (Abschnitt 4.2.8.3.1) ließ sich im Zuge der SMAD4-Expressionsanalysen (Abb. 48) nicht bestätigen. Erstaunlicherweise exprimierte BFTC-905 nach der Kultivierung im KM sogar weniger SMAD4 als die DMEM-Kontrolle ($p \leq 0,01$, KI: -63,6 - -17,1).

BFTC-905

□ DMEM ■ KM

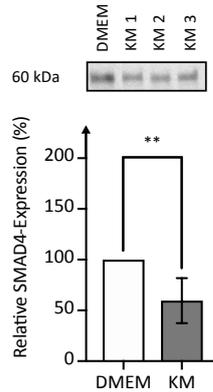


Abb. 48: Effekte von KM auf die Proteinexpression von SMAD4 für BFTC-905. Nach der Vorkonditionierung von BFTC-905 mit KM fiel ein signifikant erniedrigtes SMAD4-Expressionsniveau im Vergleich zur DMEM-Kontrolle auf (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 6)).

Im Gegensatz hierzu stieg das SMAD4-Expressionsniveau von VMCUB-1 (Abb. 49) nach der Inkubation mit KM an ($p \leq 0,05$, KI: 19,9 - 105,3). In Kongruenz zu den Ergebnissen der PAI-1-Untersuchungen konnte für VMCUB-1 somit auch bezüglich der SMAD4-Analysen eine aktivierende Wirkung des KM auf den TGF- β -Signalweg belegt werden.

VMCUB-1

□ DMEM ■ KM

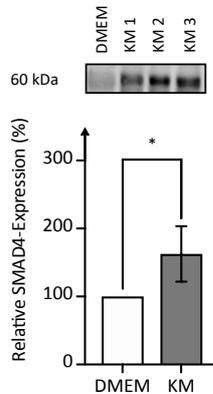


Abb. 49: Effekte von KM auf die Proteinexpression von SMAD4 für VMCUB-1. Nach der Vorkonditionierung von VMCUB-1 mit KM stieg das SMAD4-Expressionsniveau im Vergleich zur DMEM-Kontrolle um annähernd 50 % (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 6)).

Ebenso fiel die SMAD4-Expression von UMUC-3 ähnlich wie für BFTC-905 (Abb. 50) nach der Vorkonditionierung mit KM relevant ab ($p \leq 0,001$, KI: -54,1 - -25,1).

UMUC-3

□ DMEM ■ KM

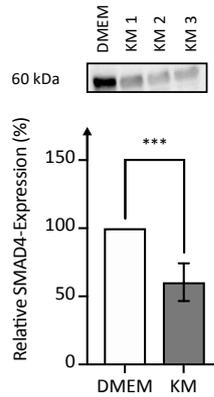


Abb. 50: Effekte von KM auf die Proteinexpression von SMAD4 für UMUC-3. Nach der Vorkonditionierung von UMUC-3 mit KM fiel ein signifikant erniedrigtes SMAD4-Expressionsniveau im Vergleich zur DMEM-Kontrolle auf (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (n = 6)).

4.2.8.4 Evaluation der CXCR4-Expression

Abschließend erfolgten die Untersuchungen zum Einfluss der FB auf die metastatische Kapazität der UCC durch Proteinexpressionsanalysen des Chemokinrezeptors und Metastasierungsmarkers CXCR4, wobei ein erhöhtes Expressionsniveau mit einer gesteigerten Metastasierungswahrscheinlichkeit assoziiert ist [58]. Die Bestimmung der CXCR4-Expression an der Zelloberfläche erfolgte mittels FACS- (Abschnitt 3.4.2.4), die Ermittlung der Gesamtproteinmenge mittels Western Blot-Analyse (Abschnitt 3.4.2.2). Wie Abb. 51 (A/B) zusammenfasst, wurde das CXCR4-Expressionsniveau von BFTC-905 durch die Inkubation mit KM nicht relevant beeinflusst.

BFTC-905

□ DMEM ■ KM

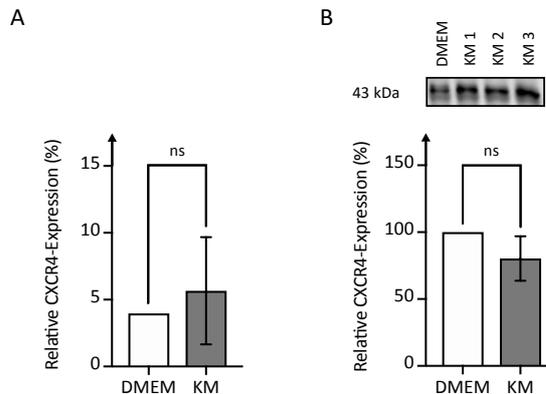


Abb. 51: Effekte von KM auf die Proteinexpression von CXCR4 für BFTC-905 via FACS- (A) und Western Blot-Analyse (B). Die Vorkonditionierung von BFTC-905 mit KM führte zu keiner signifikanten Änderung der CXCR4-Expression (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A: n = 8, tR = 3, B: n = 6)).

Nach der Kultivierung der VMCUB-1 (Abb. 52) mit KM exprimierten die Zellen hingegen mehr CXCR4. Dieser Effekt stellte sich in der FACS-Analyse tendenziell (A) und in der Western Blot-Analyse (B) statistisch signifikant dar (B: $p \leq 0,05$, KI: 28,6 - 242,7).

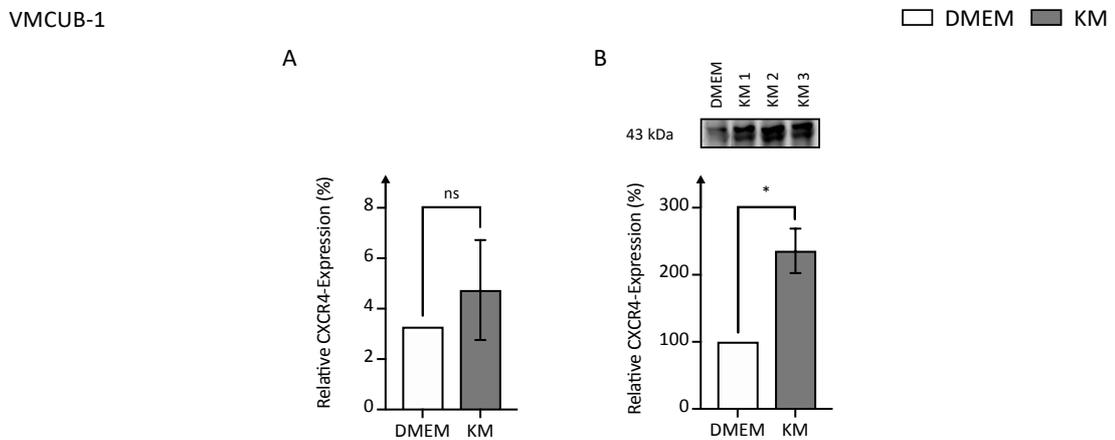


Abb. 52: Effekte von KM auf die Proteinexpression von CXCR4 für VMCUB-1 via FACS- (A) und Western Blot-Analyse (B). Die Vorkonditionierung von VMCUB-1 mit KM resultierte in der FACS-Analyse (A) in einer tendenziellen und in der Western Blot-Analyse (B) in einer signifikanten Zunahme der CXCR4-Expression der Zellen (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A: $n = 9$, $tR = 3$, B: $n = 3$)).

Für UMUC-3 (Abb. 53) bewirkte die Vorkonditionierung der Zellen mit KM einen relevanten Abfall des CXCR4-Expressionsniveaus in der FACS-Analyse (A), der in der Western Blot-Analyse (B) jedoch allenfalls tendenziell reproduzierbar war (A: $p \leq 0,001$, KI: -2,3 - -2,1).

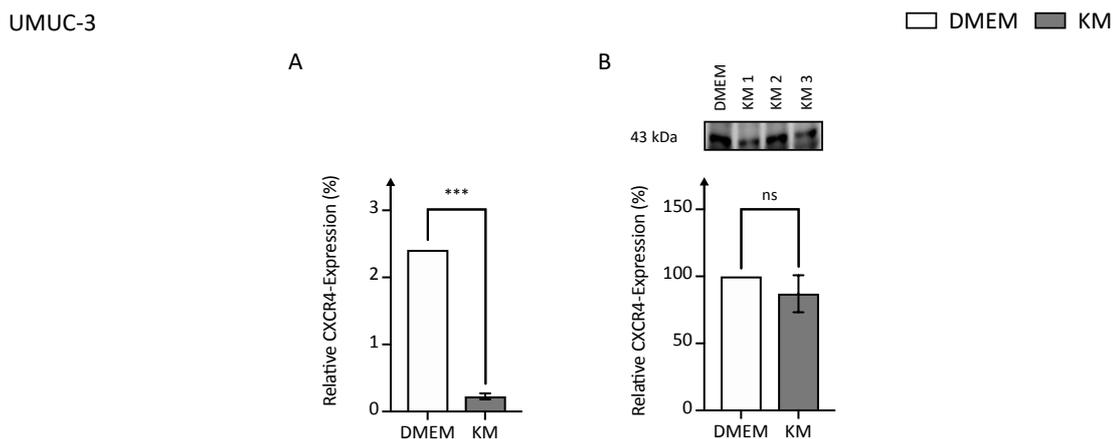


Abb. 53: Effekte von KM auf die Proteinexpression von CXCR4 für UMUC-3 via FACS- (A) und Western Blot-Analyse (B). Die Vorkonditionierung von UMUC-3 mit KM reduzierte die CXCR4-Expression der Zellen in der FACS-Analyse relevant (Mittelwert \pm SD normalisiert auf die DMEM-Kontrolle (A: $n = 9$, $tR = 3$, B: $n = 3$)).

5 Diskussion

5.1 Einfluss von KM auf tumorrelevante Eigenschaften von UCC

5.1.1 Effekte auf die Proliferation und Apoptose

Tumore in fortgeschrittenen Tumorstadien wie das muskelinvasive Harnblasenkarzinom sind mit einer erhöhten Rezidiv- und Metastasierungswahrscheinlichkeit assoziiert [4]. Ein wichtiger Aspekt dieser Tumorprogression ist die unkontrollierte Proliferation der Tumorzellen und stellt somit einen wichtigen prognostischen Faktor dar [4]. Daher wurden die Auswirkungen der FB mittels KM auf die Proliferation der UCC analysiert (Abschnitt 1.2.2). Für alle untersuchten UCC konnte eine proliferationssteigernde Wirkung durch die Inkubation mit KM detektiert werden (Abschnitt 4.2.1). Ein derartiger wachstumsfördernder Effekt von KM auf UCC wird von den Untersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen unterstützt [50, 51, 52]. Yang et al. (2021) zeigten in diesem Zusammenhang eine erhöhte Proliferation der muskelinvasiven UCC T24 und J82 nach der Behandlung mit FB-KM und auch für andere Tumorsubtypen (z. B. Prostata-, Mamma- und kolorektale Karzinome) konnte eine Proliferationssteigerung durch FB demonstriert werden [50, 51, 52].

Diesbezüglich finden sich in der Literatur gleich mehrere Erklärungsansätze. U. a. scheint das von FB sezernierte IL-6 über die Bindung an den gp130-gekoppelten (Glykoprotein 130) IL-6-Rezeptor zu einer Aktivierung des JAK/STAT-3-Signalswegs zu führen, was wiederum in einer verstärkten Expression der Zellzyklusproteine Cyclin D, PIM1/2 (engl. *Proto-oncogene serine/threonine protein kinase PIM-1/2*) und c-Myc resultiert [147, 148, 149]. Diese Effektorproteine beeinflussen den Übertritt der Zelle aus dem G₀-Stadium in den Zellzyklus und entsprechend auch die Tumorzellproliferation [147, 148]. Im Rahmen einer im Nachgang durchgeführten Proteomanalyse des KM, die in einer Folgearbeit durchgeführt wurden (näheres in Abschnitt 5.2.1), konnten passenderweise erhöhte IL-6-Spiegel detektiert werden [31]. Weiterführende Analysen sollten daher die Auswirkungen des KM auf die Aktivität des IL-6-JAK/STAT-3-Signalswegs der UCC detaillierter explorieren und Expressionsanalysen relevanter Zellzyklusproteine einschließen. Ergänzend könnte eine gezielte Inhibition

der IL-6-JAK/STAT-3-Signaltransduktion, z. B. durch den Einsatz des STAT-3-Inhibitors WP1066, Rückschlüsse auf das Potenzial einer therapeutischen Adressierung dieses wachstumsfördernden Signalwegs ermöglichen [150].

Ein anderer denkbarer Erklärungsansatz für die gezeigte proliferationssteigernde Wirkung des KM auf die UCC besteht in einer Inhibition der Apoptose der Tumorzellen [57, 58]. Daher wurde ergänzend zu den Proliferationsanalysen der Einfluss des KM auf die Apoptose der UCC untersucht. Hierzu erfolgten Expressionsanalysen der antiapoptotischen Regulatorproteine Bcl-XL, Survivin und Bcl-2 (Abschnitt 4.2.2) [60, 61, 62]. Für VMCUB-1 und UMUC-3 konnte in diesem Kontext tatsächlich eine erhöhte Expression von Bcl-XL (VMCUB-1) bzw. Bcl-2 (UMUC-3) registriert und somit eine vermutlich antiapoptotische Wirkung des KM nachgewiesen werden. Da sich die löslichen Faktoren im KM auf BFTC-905 jedoch in Summe eher proapoptotisch auswirkte, sind die Ergebnisse weder gänzlich kongruent, noch können diese Effekte die beschriebene Proliferationssteigerung für sich alleinstehend erklären. Auf Grund der heterogenen und UCC-spezifischen Ergebnisse sollten weiterführende Untersuchungen unter Einbezug ergänzender Methoden (bspw. FACS oder Western Blot) und erweiterter Zielparameter (BAX, BAK, BAD, Effektorcaspasen 3/6/7) angestrebt werden, wobei letzteres dazu beiträgt sowohl die intrinsische als auch extrinsische Aktivierung der Apoptose näher zu beleuchten (Abb. 2).

Da Cisplatin als Chemotherapeutikum erwiesenermaßen einen proapoptotischen Effekt auf Tumorzellen hat, wurde in den Apoptoseanalysen zusätzlich die Fragestellung beleuchtet, ob die beschriebenen Effekte des KM durch einen Zusatz von Cisplatin weiter beeinflusst werden [64]. Zwar konnte die zu erwartende proapoptotische Wirkung des Cisplatin für alle drei UCC bestätigt werden, Hinweise auf eine Verstärkung der proapoptotischen Wirkung des KM ergaben sich hingegen nicht.

5.1.2 Modulation der Cisplatinresistenz und des Stammzellcharakters

Mit Hilfe der Analysen zur Cisplatinresistenz konnte demonstriert werden, dass sich die löslichen Faktoren der FB im KM protektiv auf die UCC auswirken, indem die Cisplatinempfindlichkeit gesenkt wurde (Abschnitt 4.2.3). Dieser Effekt erwies sich für alle

UCC im niedrigen Cisplatin-Konzentrationsbereich (0,4 μM - 2 μM) als statistisch signifikant. Da die genauen Cisplatin-Konzentrationen im Gewebe im Laufe einer Chemotherapie von einer Vielzahl von Einflussfaktoren (Anzahl der Chemotherapie-Zyklen, eingesetzte Cisplatin-Dosen, Struktur des Zielgewebes, Applikationsform (peritoneal vs. peripher) und Weitere) abhängig sind, sollte ein möglichst repräsentativer Cisplatin-Konzentrationsbereich abgedeckt werden [1, 151, 152]. Allenfalls 30 - 40 % aller Patienten mit einem MIUC sprechen primär auf eine Cisplatin-basierte Chemotherapie an, zugleich gibt es keine wirksameren monotherapeutischen Alternativen [10]. Im Rahmen dieser erschreckend niedrigen Zahlen ist der gezeigte protektive Effekt der FB durchaus von hoher Bedeutung [153]. Auch andere Projektgruppen konnten einen solchen schützenden Einfluss von FB auf UCC gegenüber Cisplatin belegen [61, 66, 67]. So zeigten Long et al. (2019) in diesem Zusammenhang nicht nur eine signifikante Reduktion der Cisplatinsensitivität der muskelinvasiven UCC T24 und 5637 durch FB, sondern identifizierten auch einen potenziellen zu Grunde liegenden Resistenzmechanismus in Form einer verstärkten Aktivität der IGF-1/ER β (IGF-1 engl. *insulin-like growth factor*; ER β Östrogenrezeptor β) [61]. Da die Apoptoseanalysen keinen Hinweis auf ein generell erhöhtes Bcl-2-Expressionsniveau lieferten (Abschnitt 4.2.2) ist anzunehmen, dass die von Long et al. beschriebene Signalkaskade für den resistenzfördernden Effekt des KM in dieser Arbeit allenfalls eine untergeordnete Rolle spielte [61]. Gleichwohl sind auch für andere Signalwege, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren, in der Literatur eine Cisplatinresistenz-fördernde Wirkung beschrieben [28, 154]. Ein Beispiel stellen die Analysen des zellulären Phänotyps dar, da eine EMT-Induktion bekanntermaßen mit einer verringerten Cisplatinsensitivität einhergeht [28, 154]. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für eine erhöhte tumorale CXCR4-Expression nachgewiesen [155, 156, 157]. Da die KM-Wirkung in Bezug auf die genannten Zielparameter für die einzelnen UCC teils heterogen ausfiel, ist jedoch von weiteren unabhängigen Resistenz-vermittelnden Faktoren auszugehen [31]. Die bereits erwähnten Proteomanalysen des KM (Abschnitt 5.2.1) lieferten hierzu einige Hinweise. Bereits bevor das KM in Kontakt mit den UCC gelangte, konnte in diesem eine relevant erhöhte PAI-1-Konzentration detektiert werden [31]. Die in Abschnitt 4.2.8.3.1 dargelegten Ergebnisse im Rahmen der durchgeführten PAI-1-Analysen lassen sich

entsprechend schwer interpretieren, da davon auszugehen ist, dass bereits vor der Inkubation der UCC im KM erhöhte Mengen von PAI-1 vorlagen (weitere Details hierzu in Abschnitt 5.1.5.2) [31].

Nichtsdestotrotz gilt das PAI-1-Protein nicht nur als Indikator einer verstärkten TGF- β -Signaltransduktion (Abschnitt 1.2.6.3), sondern hat selbst für viele Tumorarten eine bedeutende Funktion bei der Resistenzvermittlung gegenüber dem Wirkstoff Cisplatin [158, 159, 160]. Der Arbeitsgruppe Xi et al. (2019) ist es sogar gelungen die Wirkung von Cisplatin durch den synergistischen Einsatz des PAI-1-Inhibitors ACT001 auf Glioblastomzellen effektiv zu erhöhen [160]. Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll in Folgearbeiten die Cisplatinresistenz-Analysen unter zusätzlichem Einsatz eines PAI-1-Inhibitors zu wiederholen, um dadurch kausale Zusammenhänge bezüglich der resistenzfördernden Wirkung des KM aufzudecken. Neben PAI-1 wurde in den Proteomanalysen des KM auch ein signifikant erhöhter IL-8-Spiegel gemessen [31]. Auch für dieses von FB sezernierte C-X-C-Motiv-Chemokin ist in der Literatur für verschiedene Tumorarten eine Erhöhung der Cisplatinresistenz durch die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs beschrieben [77, 161, 162].

Neben diesen Faktoren, die den Cisplatinresistenz-fördernden Effekt des KM erklären könnten, wurde im Rahmen des vorliegenden Projektes noch ein weiterer bedeutsamer Einflussfaktor analysiert. Wie in Abschnitt 1.2.3 erklärt wird, scheinen auch Tumorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften maßgeblich für eine gesteigerte Cisplatinresistenz des MIUC der Harnblase verantwortlich zu sein [80, 81, 153]. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen wurde der Einfluss des KM auf die Expression von zwei Markern von Tumorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften analysiert. In den CK14-Expressionsanalysen (Abschnitt 4.2.4) konnte weder für BFTC-905, noch für VMCUB-1 eine Veränderung der Expression durch die löslichen Faktoren im KM registriert werden. Zwar erhöhte die Zugabe von Cisplatin das CK14-Expressionsniveau, dieser Effekt stellte sich allerdings unabhängig vom verwendeten Nährmedium ein. Da CK14 nur von epithelialen UCC exprimiert wird, wurde UMUC-3 als mesenchymale Zelllinie in den Untersuchungen nicht berücksichtigt [9].

Für den CSC- und Invasivitätsmarker CD44 fiel im Vergleich dazu eine gesteigerte Expression durch BFTC-905 im KM auf, jedoch exprimierten VMCUB-1 und UMUC-3 das

Glykoprotein in signifikant geringerem Ausmaß [109, 115, 163]. Da die CSC-Marker durch das MIUC der Harnblase variabel exprimiert werden und der fehlende Nachweis einzelner weniger Oberflächenmarker nur wenig aussagekräftig ist, sollten in zukünftigen Untersuchungen zusätzliche CSC-Marker berücksichtigt werden [153].

5.1.3 Effekte auf den Immunphänotyp

Der Umstand einer hohen Rate an cisplatinresistenten MIUC untermauert die große klinische Bedeutung und den Bedarf an Untersuchungen zu den Auswirkungen von KM auf den Immunphänotyp der UCC, insbesondere hinsichtlich der Entwicklung weiterer Therapiealternativen wie die bereits zugelassenen Immuncheckpoint-Inhibitoren [1]. Das KM bewirkte für BFTC-905 eine relevante Erhöhung des Expressionsniveaus von PD-L1 und PD-L2. Da eine Zunahme der genannten Co-inhibitorischen immunmodulatorischen Liganden auf der Tumorzelloberfläche als Schutzmechanismus vor den zytotoxischen Effekten der CD8⁺-T-Zellen dient, lässt sich aus den Untersuchungsergebnissen ein prokanzerogener immunsuppressiver Effekt des KM auf BFTC-905 ableiten [146]. In Kongruenz hierzu konnten auch Zhang et al. (2023) in einer aktuellen Studie nachweisen, dass FB die PD-L1-Expression der muskelinvasiven UCC T24 signifikant steigerte [164]. Die Autoren führten den immunsupprimierenden Effekt der FB auf das von ihnen sekretierte Zytokin CXCL12 zurück, welches die Autophagie und somit den intrazellulären Abbau von PD-L1 inhibiert [164]. Eine vergleichbare von FB ausgehende immunsupprimierende Wirkung findet sich in der Literatur auch für andere Tumorentitäten [165, 166, 167, 168]. Bspw. konnten die Autoren Mu et al. (2019) darlegen, dass FB die PD-L1-Expression von Magenkarzinomzellen relevant steigerten und die Arbeitsgruppe Inoue et al. (2019) beschrieb eine auf FB zurückzuführende CXCL2-vermittelte PD-L1-Expressionserhöhung bei pulmonalen Adenokarzinomzellen [167, 168]. Dennoch ist der Einfluss von FB auf den Immunphänotyp des MIUC der Harnblase ein eher neues Forschungsfeld, denn mit den PD-L1- und PD-L2-Expressionsanalysen wurde bis dato nur ein kleiner Teil der Wirkung von FB auf das immunologische Milieu der UCC betrachtet [86]. Viele der Faktoren, die in den im Anschluss an diese Arbeit durchgeführten Proteomanalysen des KM detektiert werden konnten, gelten als

hochgradig immunogen (u. a. CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, MMPs und IL-6) [31, 86]. Ihre immunmodulatorischen Effekte entfalten sich nicht nur durch eine direkte Einwirkung auf die Tumorzellen (z. B. MMP-induzierte Resistenzerhöhung der Tumorzellen gegenüber der Zellyse durch NK-Zellen), sondern auch indirekt durch eine Beeinflussung anderer immunologisch relevanter Zellen [86]. Beispiele für eine indirekte Beeinflussung des immunologischen Milieus des TMM durch FB sind sowohl ein gesicherter IL-6-induzierter M1-zu-M2-Phänotypen-Shift der Tumor-assoziierten Makrophagen als auch eine TGF- β -abhängige Inhibierung der Aktivität proinflammatorischer dendritischer Zellen [86, 169]. Die aufgeführten Effekte verdeutlichen, wie komplex und facettenreich die immunologischen Auswirkungen der FB im TMM sind.

5.1.4 Auswirkungen auf die Migration und Invasivität

Obwohl einige Autoren auf einen migrationsfördernden Effekt von FB auf verschiedene Tumorsubtypen (z. B. Bronchial- und Magenkarzinome, Glioblastome) hinweisen, zeigte sich in den Migrationsanalysen für UMUC-3 ein geringer migrationshemmender Einfluss des KM (Abschnitt 4.2.6) [170, 171, 172]. Die migratorische Aktivität von BFTC-905 und VMCUB-1 blieb im Wesentlichen unverändert. Eine Wiederholung der Untersuchungen mit vorkonditionierten UCC könnte eine sinnvolle Ergänzung darstellen (Tabelle 17).

Obwohl die Ergebnisse der Invasivitätsanalysen prinzipiell die Auswirkungen einer längeren KM-Inkubationszeit der UCC insbesondere für BFTC-905 unterstreichen, genügte für VMCUB-1 und UMUC-3 nichtsdestotrotz bereits eine vergleichsweise kurze Inkubation, um signifikante Effekte zu erheben. Zusammengefasst konnte für alle drei UCC ein invasionsfördernder Effekt des KM ermittelt werden (Abschnitt 4.2.7.1). Diese Erkenntnisse decken sich mit den Resultaten der Arbeitsgruppe Yeh et al. (2015), die ebenfalls eine durch FB induzierte signifikant gesteigerte Invasivität der muskelinvasiven UCC T24, UMUC-3 und 5637 nachweisen konnten [173]. Für die besagte Arbeit wurden immortalisierte FB mit UCC Co-kultiviert, sodass die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation eine sinnvolle Ergänzung zur Wirkung primärer FB auf die invasiven Eigenschaften von UCC darstellt [173]. Der einheitliche invasionsfördernde Effekt der

FB ist hinsichtlich der Heterogenität des MIUC (Abschnitt 5.2.4) bemerkenswert, da verschiedenste UCC in ähnlicher Weise auf die löslichen Faktoren des KM reagierten [173]. Eine Inhibierung der von den FB ausgehenden Invasivitätsförderung könnte somit ein vielversprechender Therapieansatz sein. Yeh et al. (2015) führten die Effekte der FB auf die Sekretion und Wirkung von IL-6 zurück, da die Addition eines IL-6-neutralisierenden Antikörpers die Invasivitätsförderung aufhob [173]. Wie es auch für andere tumorrelevante Eigenschaften diskutiert wurde, könnte IL-6 den gezeigten invasivitätsfördernden Effekt für die untersuchten UCC dieser Arbeit erklären, da in den angeschlossenen Proteomanalysen des KM relevant erhöhte IL-6-Spiegel registriert wurden [31]. Eine Wiederholung der Invasivitätsanalysen unter zusätzlichem Einsatz eines IL-6-Inhibitors wie z. B. Tocilizumab könnte folglich einen kausalen Zusammenhang diesbezüglich aufdecken [173]. Da mutmaßlich verschiedenste relevante prokanzerogene Effekte der FB durch die Wirkung von IL-6 vermittelt werden, könnte dieser Inhibitor, der z. B. seit einigen Jahren in der Therapie der rheumatoiden Arthritis Anwendung findet, auch für die Behandlung des MIUC der Harnblase eingesetzt werden [174].

Ergänzend zu den zellbasierten Invasivitätsanalysen wurden die Auswirkungen des KM auf die Expression des Invasivitäts- und CSC-Markers CD44 der UCC eruiert (Abschnitt 4.2.7.2). Ein gesteigertes Expressionsniveau dieses Glykoproteins korreliert für das MIUC der Harnblase gemäß Literatur mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem verschlechterten Outcome und einer lymphonodulären Metastasierung [115, 175]. Außerdem weisen CD44⁺-Tumorzellen eine erhöhte Invasivität und Metastasierungsrate auf und exprimieren verstärkt mesenchymale EMT-Marker [115, 175]. Vor diesem Hintergrund wiesen Wu et al. (2018) sowohl in vitro als auch in vivo eine positive Korrelation zwischen erhöhten IL-6-Spiegeln, einer Invasivitätssteigerung und einer vermehrten CD44-Expression von UCC nach [115].

Diese Beobachtungen konnten mit den Ergebnissen der CD44-Expressionsanalysen dieser Arbeit jedoch nicht vollumfänglich bestätigt werden. Trotz des dargestellten einheitlichen invasivitätsfördernden Effekts des KM auf die UCC exprimierte lediglich BFTC-905 im KM vermehrt CD44 auf der Zelloberfläche.

5.1.5 Einfluss auf den zellulären Phänotyp und die Metastasierung

5.1.5.1 Effekte auf die Epithelial-mesenchymale Transition

Die Untersuchungen zum Einfluss des KM auf den zellulären Phänotyp zeigten UCC-spezifische Ergebnisse. Für BFTC-905 bestand die Wirkung des KM am ehesten in einer EMT-Induktion [135, 176]. Die damit einhergehende Verstärkung mesenchymaler Eigenschaften spiegelte sich in einer relevanten Steigerung der Vimentin- und α -SMA-Expression wider (Abschnitt 4.2.8) [120, 176]. Passend hierzu wurden auch lichtmikroskopisch vermehrt BFTC-905-Zellen mit einer mesenchymalen Morphologie nach der Inkubation mit KM beobachtet (Abschnitt 4.2.8). Eine EMT-Induktion für das MIUC der Harnblase ist mit einer erhöhten Chemotherapieresistenz, Muskelinvasivität, Neoangiogenese und Metastasierungsrate sowie einer ungünstigen Gesamtprognose assoziiert [120, 133, 135]. Hieraus lässt sich ableiten, dass sich die löslichen Faktoren der FB im KM auch auf diese tumorrelevante Eigenschaft von BFTC-905 prokanzerogen und aggressivitätssteigernd auswirkten. Eine EMT-induzierende Wirkung von FB auf die muskelinvasive UCC RT4 wurde ebenfalls durch die Arbeitsgruppe Goulet et al. (2019) beschrieben [177]. Das in einigen vorherigen Abschnitten bereits erwähnte IL-8/CXCL8 könnte auch im Kontext der EMT-induzierenden Wirkung des KM auf BFTC-905 eine wichtige Funktion übernehmen, da Zhou et al. (2021) für dieses Chemokin bereits eine Expressionssteigerung der mesenchymalen Marker Vimentin, Snail, Slug und Twist durch Aktivierung des ERK/AKT/STAT3-Signalwegs (engl. ERK *extracellular-signal-regulated kinase*; AKT syn. PKB *protein kinase B*) nachweisen konnten [31, 178]. Doch auch für weitere von FB sezernierte Faktoren, wie CCL2/MCP-1 und IL-6, wurde ein EMT-induzierender Effekt auf muskelinvasive UCC beschrieben [31, 100, 177, 179]. Zukünftige Projekte sollten daher mögliche Zusammenhänge zwischen den aufgeführten Mediatoren und der demonstrierten EMT-induzierenden Wirkung des KM auf BFTC-905 verifizieren.

Ähnlich zu BFTC-905 bewirkte das KM auch für UMUC-3 eine Verstärkung mesenchymaler Eigenschaften, hier durch eine gesteigerte ZEB-1-Expression (Abschnitt 4.2.8.2). Dieser mesenchymale Transkriptionsfaktor wurde in den Genexpressionsanalysen an Stelle von E-Cadherin bestimmt, da UMUC-3 als primär

mesenchymale UCC nur ein sehr niedriges E-Cadherin-Expressionsniveau aufweist [137]. Da eine gesteigerte ZEB-1-Expression eine Reduktion der E-Cadherin-Expression bedingt [120, 133, 135], sprechen die vorliegenden Ergebnisse ebenfalls für eine EMT-induzierende Wirkung des KM auf UMUC-3 und somit für eine Verstärkung des aggressiven Phänotyps dieser UCC. Neben den schon für BFTC-905 beschriebenen allgemeinen Folgen einer EMT finden sich in der Literatur diverse Hinweise dafür, dass ZEB-1 selbst ein Onkogen ist [180]. So gilt eine verstärkte ZEB-1-Expression u. a. für Endometrium- und kolorektale Karzinome als prognoseweisendes Aggressivitätsmerkmal [180, 181, 182]. Auf Proteinebene konnten keine signifikanten Änderungen in der E-Cadherin-, Vimentin- und α -SMA-Expression für UMUC-3 registriert werden, sodass eine Ausweitung der Analysen mit Erfassung zusätzlicher EMT-Marker wie der mesenchymalen Transkriptionsfaktoren Snail, Slug und Twist zielführend sein könnte (Abb. 5).

Erstaunlicherweise reagierte VMCUB-1 auf die Behandlung mit dem KM gegensätzlich zu den anderen beiden UCC im Sinne einer MET-Induktion. Sowohl in den Gen- als auch Proteinexpressionsanalysen ließ sich dieser Effekt aus einer erhöhten E-Cadherin- bei zugleich erniedrigter Vimentin-Expression der Zellen in KM ableiten. Wie in Abschnitt 1.2.6.1 erläutert ist die genaue tumorbiologische Bedeutung des MET-Phänomens noch nicht in Gänze geklärt [183]. Nach aktuellem Kenntnisstand ist das Wiedererlangen epithelialer Charakteristika für metastasierte Tumorzellen im Zielgewebe jedoch auch ein essenzieller Bestandteil der metastatischen Kaskade (Abb. 4) [176, 183]. Die Erkenntnis, dass die Veränderungen des zellulären Phänotyps nicht irreversibel und unidirektional sind, sondern vielmehr eine hochgradige Plastizität aufweisen, führte zu der Entwicklung des Hybrid-EMT-Modells [176]. Hierbei wird postuliert, dass sich der zelluläre Phänotyp von Tumorzellen dynamisch an die aktuellen Gegebenheiten anpasst, so dass es nicht nur einen EMT- (E) bzw. MET (M)-Phänotyp gibt, sondern eine Vielzahl von Zwischenstadien (E/M), in denen jeweils epitheliale oder mesenchymale Charakteristika überwiegen [176, 183]. Gleichwohl häufen sich die Hinweise darauf, dass eine MET-Induktion bzw. die Verstärkung epithelialer Eigenschaften von Tumorzellen mit einer reduzierten Aggressivität durch eine herabgesetzte migratorische, invasive und metastatische Kapazität einhergeht [184]. Ob

die MET-Induktion von VMCUB-1 durch die löslichen Faktoren der FB im KM somit als pro- oder antikanzerogen zu werten ist, lässt sich abschließend nicht bewerten.

Nichtsdestotrotz lässt sich aus den Ergebnissen der Untersuchungen zum zellulären Phänotyp von BFTC-905 und UMUC-3 ein therapeutisches Potenzial durch eine Modulation der Signalfaktoren der FB im TMM ableiten. Sollte es im Verlauf möglich sein die EMT-induzierenden Faktoren zu identifizieren, könnte ihre Wirkung aller Wahrscheinlichkeit nach medikamentös unterbunden werden. Denkbar wäre z. B. der Einsatz selektiver Inhibitoren, die die entsprechenden Zytokine neutralisieren oder den Zytokin-Rezeptorkomplex bzw. die nachgeschaltete intrazelluläre Signaltransduktion binden oder inhibieren, wie es bereits Siveen et al. in ihrer Arbeit zur medikamentösen Modulation des STAT3-Weges darlegen konnten (2014) [185]. Dennoch untermauert der für VMCUB-1 beobachtete entgegengesetzte Effekt des KM die Heterogenität der Tumorzellen und sollte die Einbindung weiterer UCC in künftigen Arbeiten nach sich ziehen (Abschnitt 5.2.4).

Neben dem Einfluss des KM, wurde auf mRNA-Ebene zusätzlich die Fragestellung bearbeitet, ob die Wirkung der löslichen Mediatoren der FB durch eine additive Cisplatinzugabe zusätzlich moduliert wird. Zwar bewirkte Cisplatin für BFTC-905 eine weitere Verstärkung epithelialer Eigenschaften (MET) und für UMUC-3 entgegengesetzt eine EMT-Induktion, die jeweiligen Effekte wurden im Wesentlichen aber nicht durch das verwendete Nährmedium beeinflusst.

5.1.5.2 Auswirkungen auf die TGF- β -Signaltransduktion

TGF- β gilt als potenter EMT-Induktor für Tumorzellen, der tumorrelevante Eigenschaften wie die Proliferation, Chemotherapieresistenz und Zellmotilität beeinflussen kann, weshalb die Auswirkungen des KM auf den TGF- β -Signalweg der UCC untersucht wurde (Abschnitt 1.2.6.3) [140, 142, 186]. Mit Hilfe der PAI-1- und SMAD4-Analysen wurden in dieser Arbeit direkt zwei Aspekte der SMAD-abhängigen-TGF- β -Signaltransduktion betrachtet. Im Zuge der PAI-1-Untersuchungen fiel für alle drei UCC eine signifikant erhöhte PAI-1-Konzentration in den KM-Überständen im Vergleich zur Kontrolle auf, die auf eine verstärkte TGF- β -Signalaktivität hinweisend sein könnte [141, 159]. Allerdings schränken die Ergebnisse der in einem Folgeprojekt

durchgeführten Proteomanalysen des KM die Aussagekraft der PAI-1-Untersuchungen ein [31]. In diesem Rahmen konnten bereits unmittelbar nach der Entnahme des KM aus den FB-Kulturen erhöhte PAI-1-Spiegel gemessen werden, so dass unklar ist, ob das PAI-1 ausschließlich durch die FB oder zusätzlich auch durch die UCC in das Medium sezerniert wurde [31]. Ein weiterer limitierender Faktor der PAI-1-Analysen ist, dass dieses nicht ausschließlich TGF- β -abhängig exprimiert wird, sondern auch der Regulation anderer Signalmoleküle unterliegt (wie z. B. den Transkriptionsfaktoren SP1 (engl. *specificity protein 1*), AP1 (engl. *activator protein 1*) und p53) [159]. Es bleibt daher unklar, ob die erhöhten PAI-1-Konzentrationen im KM tatsächlich auf eine verstärkte Aktivität der SMAD-abhängigen-TGF- β -Signaltransduktion zurückzuführen sind. Dennoch ist es denkbar, dass PAI-1, welches bereits durch die FB in das KM gelangte, einige der gezeigten Effekte vermittelt haben könnte. Denn neben der bereits diskutierten Cisplatinresistenzförderung (Abschnitt 5.1.2), scheint PAI-1 bspw. auch die Invasivität von Tumorzellen zu steigern [158, 159].

Erschwert wurde die Interpretation der Ergebnisse durch die ergänzenden Untersuchungen zur Wirkung des KM auf die SMAD4-Expression der UCC. Auch wenn die erhöhten PAI-1-Spiegel im KM grundsätzlich eher auf eine Aktivierung der TGF- β -Signaltransduktion hinwiesen und für BFTC-905 und UMUC-3 eine EMT-Induktion gezeigt werden konnte, exprimierten diese nach Kontakt mit KM signifikant weniger SMAD4 (Abschnitt 4.2.8.3.2). Im Gegensatz hierzu konnte für VMCUB-1 eine erhöhte Expression von SMAD4 nach der Inkubation mit KM nachgewiesen werden, obwohl zuvor eine MET-induzierende Wirkung der löslichen FB-Faktoren auf diese UCC festgehalten werden konnte. Möglicherweise könnten daher Expressionsanalysen weiterer Bestandteile des TGF- β -Signalwegs (z. B. TGF- β -Rezeptor I/II [140]) die Interpretation der aufgeführten Ergebnisse zu erleichtern. Ebenso wären Untersuchungen der SMAD-unabhängigen Signalwege hilfreich, um eine zielgerichtete Aussage zur Bedeutung von TGF- β für die in dieser Arbeit gezeigten Effekte zu treffen. Wie groß das therapeutische Potenzial durch eine gezielte medikamentöse Inhibition der TGF- β -Signaltransduktion sein könnte, ist durch die Vielzahl aktuell laufender Phase-I und Phase-II Studien bereits erkennbar [187].

5.1.5.3 Einfluss auf die CXCR4-Expression

Die Aktivierung des CXCR4-Chemokinrezeptors durch die Interaktion mit seinem spezifischen Liganden CXCL12 (syn. SDF-1) ist für maligne Tumore wie das MIUC mit einer gesteigerten invasiven und metastatischen Kapazität assoziiert [188, 189]. Daher wird CXCR4 als gängiger Metastasierungsmarker bestimmt und eine verstärkte Expression kann als Kennzeichen des aggressiven Phänotyps von UCC gewertet werden [188, 189]. Die CXCR4-abhängige Erweiterung der metastatischen und invasiven Kapazität der Tumorzellen wird in diesem Zusammenhang auf die Aktivierung verschiedener Signalwege (z. B. RAS/RAF/MAPK-Signalweg (engl. RAS *rat sarcoma*; RAF *rapidly accelerated fibrosarcoma*; MAPK *mitogen-activated protein kinase*) zurückgeführt, die u. a. eine intrazelluläre Aktin-Polymerisation, die Ausbildung von Pseudopodien und einen generellen zytoskelettalen Umbau bewirken, wodurch die Zellmobilität zunimmt [188]. Auf Grund dieser Beobachtungen wurden erste Ansätze einer therapeutischen Inhibierung der CXCL12-CXCR4-Interaktion erprobt und tatsächlich konnten u. a. Wang et al. (2011) eine reduzierte Invasivität der UCC EJ-M3 durch die Blockade des CXCR4-Rezeptors zeigen [188, 189]. Neben den veränderten metastatischen Fähigkeiten der Tumorzellen scheint CXCL12, das in großen Mengen von FB des TMM produziert und sekretiert wird, auch die Extravasation disseminierter Tumorzellen im Zielgewebe zu beeinflussen (Abschnitt 1.2.6.1) [106, 189]. Hierbei wandern die metastasierenden Tumorzellen anhand des CXCL12-Konzentrationsgradienten mit Hilfe des CXCR4-Rezeptors auf ihrer Zelloberfläche zielgerichtet durch das Gewebe, wo sie anschließend Metastasen ausbilden [106, 189]. Vor diesem Hintergrund wurden die Auswirkungen des KM auf die CXCR4-Expression der UCC untersucht, wobei sowohl FACS- als auch Western Blot-Analysen durchgeführt wurden (Abschnitt 4.2.8.4). Für BFTC-905 bewirkte die Inkubation mit KM keine relevante Änderung der CXCR4-Expression. VMCUB-1 exprimierte den Chemokinrezeptor im KM insbesondere in den Western Blot-Analysen signifikant stärker als in der Kontrolle, wohingegen das CXCR4-Expressionsniveau von UMUC-3 zumindest in den FACS-Untersuchungen im KM reduziert war. Da für alle drei UCC in den Invasionsanalysen eine signifikant gesteigerte Invasivität nachgewiesen werden konnte,

scheint dieser Effekt nicht, vor allem nicht ausschließlich, auf eine veränderte CXCR4-Expression zurückzuführen zu sein.

5.2 Limitationen und Perspektiven des Versuchskonzept

5.2.1 Vor- und Nachteile von KM

Ein relevanter Anteil der aktuellen Datenlage bezüglich der Wirkung parakriner Signalstoffe im TMM konnte mit Hilfe von KM generiert werden [39, 154, 190, 191]. Das Grundprinzip der KM-Methode ist sowohl in Hinblick auf die Gewinnung als auch die Anwendung simpel [192]. Zu Beginn werden Zellen, in diesem Fall FB in Kultur genommen. Im Laufe der Inkubationszeit reichern die proliferierenden FB das Zellkulturmedium mit löslichen Faktoren an [192]. Dieses wird anschließend abgenommen und die Tumorzellkulturen damit inkubiert, wodurch die löslichen Faktoren der FB in direkten Kontakt mit den Tumorzellen gelangen und tumorrelevante Eigenschaften beeinflussen können [192]. Ein Grund für die häufige Verwendung von KM in der TMM-Forschung ist, dass nicht nur ein allgemeiner Überblick über die Wirkung des FB-Sekretoms auf die Tumorzellen gewonnen werden kann, sondern auch einzelne ausgewählte Signalmoleküle spezifisch analysiert werden können [192, 193]. Darüber hinaus lässt sich KM mit überschaubarem technischen und zeitlichen Aufwand herstellen und lagern [193].

Bei allen beschriebenen methodischen Vorteilen müssen bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit auch die Limitationen der KM-Methodik Berücksichtigung finden. Ein zu nennender Nachteil ist, dass die bidirektionale Interaktion zwischen den FB und den UCC mit KM nicht abgebildet werden kann [103, 193]. Um dieser Limitation zu begegnen, könnte in zukünftigen Arbeiten daher an Stelle von KM z. B. auf indirekte oder direkte Co-Kulturen zurückgegriffen werden, da diese eine reziproke Kommunikation zwischen den Zellen ermöglichen [36, 56, 103, 193, 194]. Da durch Co-Kultivierungsmethoden häufig neben der parakrinen Signalübertragung auch direkte physikalische Zellkontakte möglich sind, könnten im Rahmen dieses Ansatzes auch weitere Interaktionsmechanismen untersucht werden (Abschnitt 1.2.1) [36, 45, 56, 103, 190].

Eine weitere Einschränkung der KM-Methodik besteht darin, dass viele der in der Literatur beschriebenen Effekte von FB auf Tumorzellen indirekt vermittelt werden [36, 89]. Nennenswert ist bspw. die Beeinflussung der Cisplatinresistenz, des zellulären Phänotyps und der invasiven bzw. metastatischen Eigenschaften maligner Zellen durch einen gezielten, von FB koordinierten Umbau der ECM [36, 89]. Aber auch die Modifikation des Immunphänotyps der Tumorzellen erfolgt nicht nur durch die Sekretion löslicher Signalfaktoren, sondern ebenso durch eine direkte Interaktion mit den verschiedenen Immunzellen des TMM (z. B. neutrophile Granulozyten, NK-Zellen, T-Zellen) [89]. Um derartige Effekte zu erfassen und ein realistischeres TMM-Modell zu generieren, wäre es in Folgearbeiten zu diesem Projekt sinnvoll, auf ergänzende Methoden wie dreidimensionale Zellkulturen, Mouse-Xenografts oder „Tumor-on-a-chip“-Modelle, zurückgreifen [36, 56, 103].

Da ein grundsätzlicher Einfluss von FB auf UCC mit Hilfe der vorliegenden Arbeit ausführlich demonstriert und erste Signalwege identifiziert werden konnten, sollte der nächste Schritt eine detaillierte Analyse der im KM enthaltenen Mediatoren sein. Erste Untersuchungen hierzu wurden bereits durchgeführt und publiziert, in deren Rahmen das Proteome Profiler Human XL Oncology Array Kit der Fa. R&D Systems eingesetzt wurde [31]. Dieses erfasst insgesamt 84 onkologisch bedeutsame Proteine [31]. Perspektivisch könnte eine weitere Aufschlüsselung des KM mit umfangreicheren Methoden wie z. B. der Hochdurchsatz-Proteomik erfolgen [192]. Darüber hinaus könnten Techniken Anwendung finden, die weitere Vektoren der parakrinen Signalübermittlung wie miRNAs oder extrazelluläre Vesikel (Abschnitt 1.2.1) miterfassen.

5.2.2 Behandlungskonzept der UCC mit KM

Als mögliche Schwachstelle des Behandlungskonzepts der UCC mit KM (Tabelle 17) wurde initial die Nährstoffkonstitution des KM als möglicher Einflussfaktor überprüft, da ein relevantes Defizit an Nährstoffen Einfluss auf den aggressiven Phänotyp von Tumorzellen haben kann [195]. Hierbei war die Annahme, dass die FB im Laufe ihrer Kultivierungszeit das Medium nicht nur mit löslichen Faktoren konditionierten, sondern

auch einen Teil der Nährstoffe verbrauchten. Eine grundlegende Frage war daher, ob das Nährstoffangebot des KM weiterhin ausreichen würde, um den Bedarf der Tumorzellen zu decken. Aus den zugehörigen Nährstoff-Untersuchungen ließ sich kein Anhalt für ein kompromittierendes Defizit ableiten (Abschnitt 4.1), sodass keine Verzerrung der übrigen Untersuchungsergebnisse zu erwarten war.

Während ein unzureichender Nährstoffgehalt somit als mögliche Schwachstelle ausgeschlossen werden konnte, wiesen insbesondere die Ergebnisse der Invasionsanalysen von BFTC-905 (Abschnitt 4.2.7.1) auf eine andere Einschränkung des Behandlungskonzeptes mit KM hin. Für eine kurze Exposition der Zellen gegenüber KM (Inkubationszeit 24 h) zeigte sich in den Untersuchungen keine wesentliche Veränderung der invasiven Eigenschaften. Wurden hingegen vorkonditionierte Zellen (Tabelle 17, Inkubationszeit 120 h) für die Invasionsanalysen verwendet, fiel eine ausgeprägte Steigerung der Invasivität von BFTC-905 auf. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Länge der Kontaktzeit der UCC mit dem KM ein relevanter Einflussfaktor für dessen Wirkung darstellt. In diesem Kontext erscheint es sinnvoll, sämtliche Versuchsansätze für alle UCC mit vorkonditionierten Zellen zu wiederholen. Dies könnte insbesondere für Experimente, die bisher nur mit einer sehr kurzen KM-Kontaktzeit durchgeführt wurden, möglicherweise analog zu den Invasionsanalysen, ebenfalls statistisch signifikante Ergebnisse liefern (z. B. Migrationsanalysen).

5.2.3 Fibroblasten vs. Cancer associated fibroblasts (CAF)

Bereits in der Einleitung dieser Arbeit wurde dargelegt, dass sich in der Literatur zum Einfluss von FB auf den aggressiven Phänotyp von Tumorzellen sowohl Hinweise auf eine pro- als auch antikanzerogene Wirkung finden lassen (Abschnitt 1.2) [5, 88, 194]. Ein möglicher Erklärungsansatz für die Diversität der Ergebnisse ist die Auswahl der verwendeten FB. So fällt auf, dass andere Arbeitsgruppen keine Hautpräparate für die Isolation der FB nutzten, sondern auf andere Gewebe zurückgegriffen haben. Al-Ansari et al. (2013), Matsumura et al. (2019) und andere Autoren isolierten die in ihrer Arbeit verwendeten FB bspw. aus Brustgewebe [129, 196]. Da es einige Belege dafür gibt, dass primäre FB deutliche gewebespezifische Unterschiede in Bezug auf ihren zellulären

Phänotyp, ihr Proteom und Sekretom aufweisen, könnte dies ein Erklärungsansatz für die beschriebene Heterogenität der Effekte auf Tumorzellen sein [197]. Gleichwohl können sogar FB der gleichen anatomischen Lokalisation in wichtigen Eigenschaften wie z. B. der Proliferation unterschiedlich auf die Anwesenheit von Zytokinen und Wachstumsfaktoren reagieren, da sie individuellen epigenetischen Einflüssen unterliegen [197]. Zusätzlich müssen auch die jeweils vorherrschenden in vitro Kultivierungsbedingungen als Ursache für die Wirkunterschiede von FB auf maligne Zellen berücksichtigt werden, da aus der initial isolierten heterogenen Zellpopulation besonders vorteilhafte Phänotypen durch wiederholtes Passagieren unbeabsichtigt selektiert werden können [197].

Vor diesem Hintergrund nehmen Arbeiten, in deren Rahmen die FB nicht aus primär gesunden Ursprungsgeweben, sondern direkt aus Tumorpräparaten extrahiert wurden, einen besonderen Stellenwert ein [62, 198, 170]. Wie in Abschnitt 1.2.1 dargestellt, kann der enge anhaltende Austausch mit den Tumorzellen dazu führen, dass die FB in einen aktivierten Zustand überführt werden, in dem sie auch als CAF (engl. *cancer-associated fibroblasts*) bezeichnet werden [11, 12, 21, 199, 200]. Auch wenn eine präzise molekulare Differenzierung zwischen nicht-aktivierten FB und aktivierten CAF nach momentanem Kenntnisstand nicht möglich ist, geht die Adaptation des CAF-Phänotyps erwiesenermaßen mit einer gesteigerten proliferativen, migratorischen und sekretorischen Aktivität sowie erhöhten Kontraktilität der Zellen einher [12, 19, 49, 120, 201]. Als Grundlage für die veränderten zellulären Eigenschaften der CAF werden genetische Alterationen angeführt, zu denen u. a. ein Verlust der Tumorsuppressorgene P53- und RBP-Jκ (engl. ;RBP-Jκ *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*) sowie eine Überaktivität des Hippo-Signalwegs (YAP/TAZ-Onkogene, engl. YAP *yes-associated protein*; TAZ *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*) gehören [11, 202, 203, 204]. Da die Induktion eines CAF-Phänotyps einen dynamischen Prozess darstellt, der nicht von allen FB einheitlich und simultan durchlaufen wird, sind selbst im TMM desselben Tumors ausgeprägt heterogene CAF-Subtypen vorzufinden [201]. Die aufgeführten Unterschiede zwischen nicht-aktivierten FB und CAF sind daher aller Wahrscheinlichkeit nach eine weitere Ursache für die in der Literatur beschriebenen heterogenen Effekte auf Tumorzellen [201]. Besonders differenziert

müssen Arbeiten betrachtet werden, die den Begriff CAF nicht nur für FB, sondern auch für andere Zelltypen des TMM mit einem mesenchymalen Ursprung verwenden, wie Epithelzellen, mesenchymale Stromazellen, Endothelzellen und Adipozyten [194]. Da die genannten Zelltypen bereits physiologisch in grundlegenden Aspekten wie ihrer Herkunft, ihren Zellfunktionen und -eigenschaften sowie ihrem Differenzierungsgrad voneinander abweichen, ist ein direkter Vergleich mit FB nur bedingt möglich [194].

Es könnte aufschlussreich sein die Versuchsansätze dieser Arbeit mit solchen FB zu wiederholen, die aus gesundem Harnblasengewebe oder möglicherweise sogar direkt aus dem TMM von MIUC isoliert wurden. Dadurch könnte die grundlegende Fragestellung untersucht werden, inwieweit sich die Wirkung nicht-aktivierter dermalen FB von FB unterscheidet, die bereits in direktem Kontakt mit Tumorzellen standen. Orientierend an anderen Arbeitsgruppen und Forschungsunternehmungen wäre auch eine synthetische Induktion des CAF-Phänotyps von FB (bspw. mittels in vitro Behandlung mit TGF- β) denkbar [28, 205].

5.2.4 Auswahl der Urothelkarzinom-Zelllinien

Neben den FB des TMM ist auch das MIUC der Harnblase selbst für eine hochgradige intra- und intertumorale Heterogenität bekannt [153, 206]. Eine der führenden Ursachen hierfür ist die ausgeprägte genomische Instabilität dieser Tumorentität, die gleichzeitig eine der zentralen Herausforderungen für die Entwicklung individualisierter Therapiekonzepte darstellt [153, 206]. Um im Ansatz diese hohe tumorale Diversität abzubilden, wurden für die Experimente der vorliegenden Arbeit die drei muskelinvasiven kommerziellen UCC BFTC-905, VMCUB-1 und UMUC-3 ausgewählt [143, 144, 145]. Diese unterschieden sich in zentralen Eigenschaften wie ihrer individuellen Verdopplungszeit, Cisplatinempfindlichkeit und histologischen Morphologie [143, 144, 145]. Zudem zählen BFTC-905 und VMCUB-1 zu den primär epithelialen UCC, während UMUC-3 durch einen mesenchymalen Phänotyp charakterisiert ist [143, 144, 145]. Im Rahmen der unterschiedlichen Eigenschaften zeigte sich eine heterogene Wirkung des KM auf die einzelnen UCC (Tabelle 22 - 24 im Anhang). Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, zukünftig auch andere UCC in

die Untersuchungen einzubinden. Möglicherweise könnte dadurch die Wirkung des KM auf bestimmte Tumorentitäten präziser prognostiziert werden, sodass im Idealfall Patienten identifiziert werden, die von einer therapeutischen Adressierung der durch FB beeinflussten Signalkaskaden im TMM profitieren könnten. Zudem wäre eine zusätzliche Option anstelle kommerzieller UCC, Tumorzellen zu verwenden, die direkt aus Primärtumoren isoliert wurden um so realitätsnähere TMM-Modelle zu entwickeln.

5.3 Fazit

Das MIUC der Harnblase gehört zu den häufigen malignen Tumoren und ist auf Grund einer zügigen Resistenzentwicklung bei zugleich begrenzten therapeutischen Optionen bis heute mit einer hohen Mortalität assoziiert [1, 2]. Da für verschiedene Tumorarten eine Aggressivitätsförderung durch FB des TMM beschrieben wurde, die Evidenz diesbezüglich für das MIUC der Harnblase jedoch limitiert ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von KM der parakrine Einfluss von FB auf tumorrelevante Eigenschaften der drei muskelinvasiven UCC BFTC-905, VMCUB-1 und UMUC-3 untersucht [12]. Zusammengefasst konnte für jede der drei UCC eine Beeinflussung durch die löslichen Signalmediatoren der FB im KM nachgewiesen werden. Während sich einige Effekte für die untersuchten Zelllinien einheitlich prokanzerogen darstellten (wie eine Förderung der Proliferation, Cisplatinresistenz und Invasivität), fielen andere heterogen und UCC-spezifisch (u. a. EMT-Induktion bei BFTC-905 gegenüber einer MET-Induktion bei VMCUB-1) aus. Trotz der Heterogenität lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit grundsätzlich ein therapeutisches Potenzial für das MIUC der Harnblase ableiten. So könnte eine gezielte Blockierung prokanzergener Einflüsse zu einer Verlangsamung der Tumorprogression führen, das Ansprechen auf die zur Verfügung stehenden Therapieoptionen und die Prognose der Patienten entscheidend verbessern. Das übergeordnete Ziel künftiger Untersuchungen sollte entsprechend sein, die genauen Signalmediatoren und -kaskaden zu identifizieren, die die prokanzerogenen Effekte der FB vermittelt haben könnten.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF):. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0, 2020, AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/> (abgerufen am 15.06.2023, 12:53 Uhr). 2020.
2. (Hrsg) RK-IHudGdeKiDeV. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Berlin, 2021;13. Ausgabe.
3. Kraywinkel K, Fiebig, J., Schulz, G. B. Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms in Deutschland. *Onkologie* 2018, Springer Medizin Verlag GmbH, ein Teil von Springer Nature 2018:24:6–13.
4. Youssef RF, Lotan Y. Predictors of outcome of non-muscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer. *ScientificWorldJournal* 2011;11:369-81. (In eng). DOI: 10.1100/tsw.2011.28.
5. Caramelo B, Zagorac S, Corral S, Marqués M, Real FX. Cancer-associated Fibroblasts in Bladder Cancer: Origin, Biology, and Therapeutic Opportunities. *Eur Urol Oncol* 2023 (In eng). DOI: 10.1016/j.euo.2023.02.011.
6. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF):. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Kurzversion 2.1, 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/>, (abgerufen am 13.07.2023, 14:16 Uhr). 2019.
7. Ulfing N. Die Harnblase (Vesica urinaria). In: Ulfing N, ed. *Kurzlehrbuch Histologie*. 5., unveränderte Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2019.
8. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Ableitende Harnwege. In: Lüllmann-Rauch R, Asan E, eds. *Taschenlehrbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2019.
9. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature Reviews Cancer* 2014;15:25. (Review Article). DOI: 10.1038/nrc3817.
10. Lewerich J, Schmid SC, Gschwend JE, Retz M. [Value of immunotherapy in the perioperative treatment of localized muscle invasive bladder cancer]. *Urologie* 2023;62(3):279-287. (In ger). DOI: 10.1007/s00120-022-01983-5.
11. Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KJ. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology* 2018;15(6):366-381. (In eng). DOI: 10.1038/s41571-018-0007-1.
12. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016;16(9):582-98. (In eng). DOI: 10.1038/nrc.2016.73.
13. Truffi M, Sorrentino L, Corsi F. Fibroblasts in the Tumor Microenvironment. In: Birbrair A, ed. *Tumor Microenvironment: Non-Hematopoietic Cells*. Cham: Springer International Publishing; 2020:15-29.

14. Ermakov MS, Nushtaeva AA, Richter VA, Koval OA. Cancer-associated fibroblasts and their role in tumor progression. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektiv* 2022;26(1):14-21. (In eng). DOI: 10.18699/vjgb-22-03.
15. Ping Q, Wang C, Cheng X, et al. TGF- β 1 dominates stromal fibroblast-mediated EMT via the FAP/VCAN axis in bladder cancer cells. *J Transl Med* 2023;21(1):475. (In eng). DOI: 10.1186/s12967-023-04303-3.
16. Kim DK, Jeong J, Lee DS, et al. PD-L1-directed PIGF/VEGF blockade synergizes with chemotherapy by targeting CD141(+) cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *Nat Commun* 2022;13(1):6292. (In eng). DOI: 10.1038/s41467-022-33991-6.
17. Li M, Li M, Yin T, et al. Targeting of cancer-associated fibroblasts enhances the efficacy of cancer chemotherapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Med Rep* 2016;13(3):2476-84. (In eng). DOI: 10.3892/mmr.2016.4868.
18. Mertens JC, Fingas CD, Christensen JD, et al. Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Cancer Res* 2013;73(2):897-907. (In eng). DOI: 10.1158/0008-5472.Can-12-2130.
19. Arima Y, Matsueda S, Saya H. Significance of Cancer-Associated Fibroblasts in the Interactions of Cancer Cells with the Tumor Microenvironment of Heterogeneous Tumor Tissue. *Cancers (Basel)* 2023;15(9) (In eng). DOI: 10.3390/cancers15092536.
20. Ghahremanifard P, Chanda A, Bonni S, Bose P. TGF- β Mediated Immune Evasion in Cancer-Spotlight on Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancers (Basel)* 2020;12(12) (In eng). DOI: 10.3390/cancers12123650.
21. Sadlonova A, Bowe DB, Novak Z, et al. Identification of molecular distinctions between normal breast-associated fibroblasts and breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Microenviron* 2009;2(1):9-21. (In eng). DOI: 10.1007/s12307-008-0017-0.
22. Nurmik M, Ullmann P, Rodriguez F, Haan S, Letellier E. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *Int J Cancer* 2020;146(4):895-905. (In eng). DOI: 10.1002/ijc.32193.
23. Yamashita M, Ogawa T, Zhang X, et al. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer* 2012;19(2):170-6. (In eng). DOI: 10.1007/s12282-010-0234-5.
24. Min KW, Kim DH, Noh YK, Son BK, Kwon MJ, Moon JY. Cancer-associated fibroblasts are associated with poor prognosis in solid type of lung adenocarcinoma in a machine learning analysis. *Sci Rep* 2021;11(1):16779. (In eng). DOI: 10.1038/s41598-021-96344-1.
25. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A, et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet* 2015;47(4):320-9. (In eng). DOI: 10.1038/ng.3225.
26. Pallangyo CK, Ziegler PK, Greten FR. IKK β acts as a tumor suppressor in cancer-associated fibroblasts during intestinal tumorigenesis. *J Exp Med* 2015;212(13):2253-66. (In eng). DOI: 10.1084/jem.20150576.
27. Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*: Springer Berlin Heidelberg, 2019.

28. Huang L, Xu AM, Liu S, Liu W, Li TJ. Cancer-associated fibroblasts in digestive tumors. *World J Gastroenterol* 2014;20(47):17804-18. (In eng). DOI: 10.3748/wjg.v20.i47.17804.
29. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers* 2015;7(4):2443-2458.
30. Avalle L, Raggi L, Monteleone E, et al. STAT3 induces breast cancer growth via ANGPTL4, MMP13 and STC1 secretion by cancer associated fibroblasts. *Oncogene* 2022;41(10):1456-1467. (In eng). DOI: 10.1038/s41388-021-02172-y.
31. Frerichs LM, Frerichs B, Petzsch P, et al. Tumorigenic effects of human mesenchymal stromal cells and fibroblasts on bladder cancer cells. *Frontiers in Oncology* 2023;13 (Original Research) (In English). DOI: 10.3389/fonc.2023.1228185.
32. David JM, Dominguez C, Hamilton DH, Palena C. The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance. *Vaccines (Basel)* 2016;4(3) (In eng). DOI: 10.3390/vaccines4030022.
33. Fabris L, Sato K, Alpini G, Strazzabosco M. The Tumor Microenvironment in Cholangiocarcinoma Progression. *Hepatology* 2021;73 Suppl 1(Suppl 1):75-85. (In eng). DOI: 10.1002/hep.31410.
34. Desbois M, Wang Y. Cancer-associated fibroblasts: Key players in shaping the tumor immune microenvironment. *Immunol Rev* 2021;302(1):241-258. (In eng). DOI: 10.1111/imr.12982.
35. Kojima Y, Acar A, Eaton EN, et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(46):20009-14. (In eng). DOI: 10.1073/pnas.1013805107.
36. Yamaguchi H, Sakai R. Direct Interaction between Carcinoma Cells and Cancer Associated Fibroblasts for the Regulation of Cancer Invasion. *Cancers (Basel)* 2015;7(4):2054-62. (In eng). DOI: 10.3390/cancers7040876.
37. Wang B, Liu W, Liu C, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Promote Radioresistance of Breast Cancer Cells via the HGF/c-Met Signaling Pathway. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2023;116(3):640-654. (In eng). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2022.12.029.
38. Huang B, Huang M, Li Q. Cancer-Associated Fibroblasts Promote Angiogenesis of Hepatocellular Carcinoma by VEGF-Mediated EZH2/VASH1 Pathway. *Technol Cancer Res Treat* 2019;18:1533033819879905. (In eng). DOI: 10.1177/1533033819879905.
39. Chen S, Morine Y, Tokuda K, et al. Cancer-associated fibroblast-induced M2-polarized macrophages promote hepatocellular carcinoma progression via the plasminogen activator inhibitor-1 pathway. *Int J Oncol* 2021;59(2) (In eng). DOI: 10.3892/ijo.2021.5239.
40. Sakamoto H, Koma YI, Higashino N, et al. PAI-1 derived from cancer-associated fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma promotes the invasion of cancer cells and the migration of macrophages. *Lab Invest* 2021;101(3):353-368. (In eng). DOI: 10.1038/s41374-020-00512-2.

41. Chung KY, Quek JM, Neo SH, Too HP. Polymer-Based Precipitation of Extracellular Vesicular miRNAs from Serum Improve Gastric Cancer miRNA Biomarker Performance. *J Mol Diagn* 2020;22(5):610-618. (In eng). DOI: 10.1016/j.jmoldx.2020.01.016.
42. Yang XX, Sun C, Wang L, Guo XL. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes. *J Control Release* 2019;308:119-129. (In eng). DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.07.021.
43. Niu Z, Pang RTK, Liu W, Li Q, Cheng R, Yeung WSB. Polymer-based precipitation preserves biological activities of extracellular vesicles from an endometrial cell line. *PLoS One* 2017;12(10):e0186534. (In eng). DOI: 10.1371/journal.pone.0186534.
44. Ye F, Liang Y, Wang Y, et al. Cancer-associated fibroblasts facilitate breast cancer progression through exosomal circTBPL1-mediated intercellular communication. *Cell Death Dis* 2023;14(7):471. (In eng). DOI: 10.1038/s41419-023-05986-8.
45. Satoyoshi R, Kuriyama S, Aiba N, Yashiro M, Tanaka M. Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* 2015;34(5):650-60. (In eng). DOI: 10.1038/onc.2013.584.
46. Maeda T, Alexander CM, Friedl A. Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2004;64(2):612-21. (In eng). DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-2439.
47. Subramaniam KS, Tham ST, Mohamed Z, Woo YL, Mat Adenan NA, Chung I. Cancer-associated fibroblasts promote proliferation of endometrial cancer cells. *PLoS One* 2013;8(7):e68923. (In eng). DOI: 10.1371/journal.pone.0068923.
48. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(21):12072-7. (In eng). DOI: 10.1073/pnas.211053698.
49. Aboussekhra A, Islam SS, Alraouji NN. Activated breast stromal fibroblasts exhibit myoepithelial and mammary stem cells features. *Transl Oncol* 2023;35:101721. (In eng). DOI: 10.1016/j.tranon.2023.101721.
50. Heichler C, Scheibe K, Schmied A, et al. STAT3 activation through IL-6/IL-11 in cancer-associated fibroblasts promotes colorectal tumour development and correlates with poor prognosis. *Gut* 2020;69(7):1269-1282. (In eng). DOI: 10.1136/gutjnl-2019-319200.
51. Chen WJ, Ho CC, Chang YL, et al. Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling. *Nat Commun* 2014;5:3472. (In eng). DOI: 10.1038/ncomms4472.
52. Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, et al. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res* 2010;70(17):6945-56. (In eng). DOI: 10.1158/0008-5472.Can-10-0785.
53. Plaster M, Singh S, Tavana H. Fibroblasts Promote Proliferation and Matrix Invasion of Breast Cancer Cells in Co-Culture Models. *Advanced Therapeutics* 2019;2(11):1900121. DOI: <https://doi.org/10.1002/adtp.201900121>.
54. Chen B, Sang Y, Song X, et al. Exosomal miR-500a-5p derived from cancer-associated fibroblasts promotes breast cancer cell proliferation and metastasis

- through targeting USP28. *Theranostics* 2021;11(8):3932-3947. (In eng). DOI: 10.7150/thno.53412.
55. Shen Z, Qin X, Yan M, et al. Cancer-associated fibroblasts promote cancer cell growth through a miR-7-RASSF2-PAR-4 axis in the tumor microenvironment. *Oncotarget* 2017;8(1):1290-1303. (In eng). DOI: 10.18632/oncotarget.13609.
 56. Samoszuk M, Tan J, Chorn G. Clonogenic growth of human breast cancer cells co-cultured in direct contact with serum-activated fibroblasts. *Breast Cancer Res* 2005;7(3):R274-83. (In eng). DOI: 10.1186/bcr995.
 57. Wang C, Shang C, Gai X, et al. Sulfatase 2-Induced Cancer-Associated Fibroblasts Promote Hepatocellular Carcinoma Progression via Inhibition of Apoptosis and Induction of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:631931. (In eng). DOI: 10.3389/fcell.2021.631931.
 58. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16(11):2927-31. (In eng). DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-09-2329.
 59. Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, Dicato M, Diederich M. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:1-8. (In eng). DOI: 10.1196/annals.1299.001.
 60. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res* 2015;141(4):389-97. (In eng). DOI: 10.4103/0971-5916.159250.
 61. Long X, Xiong W, Zeng X, et al. Cancer-associated fibroblasts promote cisplatin resistance in bladder cancer cells by increasing IGF-1/ER β /Bcl-2 signalling. *Cell Death Dis* 2019;10(5):375. (In eng). DOI: 10.1038/s41419-019-1581-6.
 62. Yan H, Guo BY, Zhang S. Cancer-associated fibroblasts attenuate Cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells by promoting STAT3 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;470(4):947-54. (In eng). DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.131.
 63. Long X, Xiong W, Zeng X, et al. Cancer-associated fibroblasts promote cisplatin resistance in bladder cancer cells by increasing IGF-1/ER β /Bcl-2 signalling. *Cell Death & Disease* 2019;10. DOI: 10.1038/s41419-019-1581-6.
 64. Aldossary SA. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. *Biomed Pharmacol J* 2019;12(1).
 65. Makovec T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol* 2019;53(2):148-158. (In eng). DOI: 10.2478/raon-2019-0018.
 66. Cui Y, Zhang S, Hu X, Gao F. Tumor-associated fibroblasts derived exosomes induce the proliferation and cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma cells through RIG-I/IFN- β signaling. *Bioengineered* 2022;13(5):12462-12474. (In eng). DOI: 10.1080/21655979.2022.2076008.
 67. Luo G, Zhang Y, Wu Z, Zhang L, Liang C, Chen X. Exosomal LINC00355 derived from cancer-associated fibroblasts promotes bladder cancer cell resistance to cisplatin by regulating miR-34b-5p/ABCB1 axis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2021;53(5):558-566. (In eng). DOI: 10.1093/abbs/gmab023.
 68. Peltanova B, Liskova M, Gumulec J, et al. Sensitivity to Cisplatin in Head and Neck Cancer Cells Is Significantly Affected by Patient-Derived Cancer-Associated Fibroblasts. *Int J Mol Sci* 2021;22(4) (In eng). DOI: 10.3390/ijms22041912.

69. Zhang Y, Wang Z, Yu J, et al. Cancer stem-like cells contribute to cisplatin resistance and progression in bladder cancer. *Cancer Lett* 2012;322(1):70-7. (In eng). DOI: 10.1016/j.canlet.2012.02.010.
70. Tsuyada A, Chow A, Wu J, et al. CCL2 mediates cross-talk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells. *Cancer Res* 2012;72(11):2768-79. (In eng). DOI: 10.1158/0008-5472.Can-11-3567.
71. Liao CP, Adisetiyo H, Liang M, Roy-Burman P. Cancer-associated fibroblasts enhance the gland-forming capability of prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2010;70(18):7294-303. (In eng). DOI: 10.1158/0008-5472.Can-09-3982.
72. Huang TX, Guan XY, Fu L. Therapeutic targeting of the crosstalk between cancer-associated fibroblasts and cancer stem cells. *Am J Cancer Res* 2019;9(9):1889-1904. (In eng) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6780671/pdf/ajcr0009-1889.pdf>).
73. Mai W, Liu Q, Li J, et al. Comprehensive analysis of the oncogenic and immunological role of FAP and identification of the ceRNA network in human cancers. *Aging (Albany NY)* 2023;15(9):3738-3758. (In eng). DOI: 10.18632/aging.204707.
74. Real PJ, Sierra A, De Juan A, Segovia JC, Lopez-Vega JM, Fernandez-Luna JL. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene* 2002;21(50):7611-8. (In eng). DOI: 10.1038/sj.onc.1206004.
75. Wang H, Huang H, Wang L, et al. Cancer-associated fibroblasts secreted miR-103a-3p suppresses apoptosis and promotes cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. *Aging (Albany NY)* 2021;13(10):14456-14468. (In eng). DOI: 10.18632/aging.103556.
76. Guo H, Ha C, Dong H, Yang Z, Ma Y, Ding Y. Cancer-associated fibroblast-derived exosomal microRNA-98-5p promotes cisplatin resistance in ovarian cancer by targeting CDKN1A. *Cancer Cell Int* 2019;19:347. (In eng). DOI: 10.1186/s12935-019-1051-3.
77. Zhai J, Shen J, Xie G, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived IL-8 mediates resistance to cisplatin in human gastric cancer. *Cancer Lett* 2019;454:37-43. (In eng). DOI: 10.1016/j.canlet.2019.04.002.
78. Feng B, Wu J, Shen B, Jiang F, Feng J. Cancer-associated fibroblasts and resistance to anticancer therapies: status, mechanisms, and countermeasures. *Cancer Cell Int* 2022;22(1):166. (In eng). DOI: 10.1186/s12935-022-02599-7.
79. Skowron MA, Niegisch G, Fritz G, 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* 2015;34:144. (In eng). DOI: 10.1186/s13046-015-0259-x.
80. Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, et al. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol* 2011;2011:941876. (In eng). DOI: 10.1155/2011/941876.
81. Dean M. Cancer stem cells: Implications for cancer causation and therapy resistance. *Discov Med* 2005;5(27):278-82. (In eng).

82. Srivastava AK, Han C, Zhao R, et al. Enhanced expression of DNA polymerase eta contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112(14):4411-6. (In eng). DOI: 10.1073/pnas.1421365112.
83. Berger D. Tumorplastizität - Malignität ist nicht nur eine Sache von Mutationen. *Im Fokus Onkologie* 2021;24(5):23-23. DOI: 10.1007/s15015-021-3659-0.
84. Cathomas R, Lorch A, Bruins HM, et al. The 2021 Updated European Association of Urology Guidelines on Metastatic Urothelial Carcinoma. *Eur Urol* 2022;81(1):95-103. (In eng). DOI: 10.1016/j.eururo.2021.09.026.
85. Inman BA, Longo TA, Ramalingam S, Harrison MR. Atezolizumab: A PD-L1-Blocking Antibody for Bladder Cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23(8):1886-1890. (In eng). DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-16-1417.
86. Ziani L, Chouaib S, Thiery J. Alteration of the Antitumor Immune Response by Cancer-Associated Fibroblasts. *Front Immunol* 2018;9:414. (In eng). DOI: 10.3389/fimmu.2018.00414.
87. Hutton C, Heider F, Blanco-Gomez A, et al. Single-cell analysis defines a pancreatic fibroblast lineage that supports anti-tumor immunity. *Cancer Cell* 2021;39(9):1227-1244.e20. (In eng). DOI: 10.1016/j.ccell.2021.06.017.
88. Kennel KB, Bozlar M, De Valk AF, Greten FR. Cancer-Associated Fibroblasts in Inflammation and Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res* 2023;29(6):1009-1016. (In eng). DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-22-1031.
89. Monteran L, Erez N. The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology* 2019;10(1835) (Review) (In English). DOI: 10.3389/fimmu.2019.01835.
90. Hartmann N, Giese NA, Giese T, et al. Prevailing role of contact guidance in intrastromal T-cell trapping in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20(13):3422-33. (In eng). DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-13-2972.
91. Kai F, Drain AP, Weaver VM. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. *Dev Cell* 2019;49(3):332-346. (In eng). DOI: 10.1016/j.devcel.2019.03.026.
92. Kaur A, Ecker BL, Douglass SM, et al. Remodeling of the Collagen Matrix in Aging Skin Promotes Melanoma Metastasis and Affects Immune Cell Motility. *Cancer Discov* 2019;9(1):64-81. (In eng). DOI: 10.1158/2159-8290.Cd-18-0193.
93. Ecker BL, Kaur A, Douglass SM, et al. Age-Related Changes in HAPLN1 Increase Lymphatic Permeability and Affect Routes of Melanoma Metastasis. *Cancer Discov* 2019;9(1):82-95. (In eng). DOI: 10.1158/2159-8290.Cd-18-0168.
94. Yang Z, Xu Y, Bi Y, et al. Immune escape mechanisms and immunotherapy of urothelial bladder cancer. *J Clin Transl Res* 2021;7(4):485-500. (In eng) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8445627/pdf/jclintranslres-2021-7-4-485.pdf>).
95. Crispen PL, Kusmartsev S. Mechanisms of immune evasion in bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2020;69(1):3-14. (In eng). DOI: 10.1007/s00262-019-02443-4.
96. Liu WH, Chen YY, Zhu SX, et al. B7-H4 expression in bladder urothelial carcinoma and immune escape mechanisms. *Oncol Lett* 2014;8(6):2527-2534. (In eng). DOI: 10.3892/ol.2014.2522.

97. Staff AC. An introduction to cell migration and invasion. *Scand J Clin Lab Invest* 2001;61(4):257-68. (In eng). DOI: 10.1080/00365510152378978.
98. Sträuli P, Haemmerli G. The role of cancer cell motility in invasion. *Cancer Metastasis Rev* 1984;3(2):127-41. (In eng). DOI: 10.1007/bf00047660.
99. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003;200(4):429-47. (In eng). DOI: 10.1002/path.1398.
100. Asif PJ, Longobardi C, Hahne M, Medema JP. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Cancer Invasion and Metastasis. *Cancers (Basel)* 2021;13(18) (In eng). DOI: 10.3390/cancers13184720.
101. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res* 2006;66(23):11271-8. (In eng). DOI: 10.1158/0008-5472.Can-06-2044.
102. Kwa MQ, Herum KM, Brakebusch C. Cancer-associated fibroblasts: how do they contribute to metastasis? *Clin Exp Metastasis* 2019;36(2):71-86. (In eng). DOI: 10.1007/s10585-019-09959-0.
103. Olsen CJ, Moreira J, Lukanidin EM, Ambartsumian NS. Human mammary fibroblasts stimulate invasion of breast cancer cells in a three-dimensional culture and increase stroma development in mouse xenografts. *BMC Cancer* 2010;10:444. (In eng). DOI: 10.1186/1471-2407-10-444.
104. Wang P, Nishitani MA, Tanimoto S, et al. Bladder cancer cell invasion is enhanced by cross-talk with fibroblasts through hepatocyte growth factor. *Urology* 2007;69(4):780-4. (In eng). DOI: 10.1016/j.urology.2007.01.063.
105. Yan Y, Wang LF, Wang RF. Role of cancer-associated fibroblasts in invasion and metastasis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2015;21(33):9717-26. (In eng). DOI: 10.3748/wjg.v21.i33.9717.
106. Oudin MJ, Weaver VM. Physical and Chemical Gradients in the Tumor Microenvironment Regulate Tumor Cell Invasion, Migration, and Metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2016;81:189-205. (In eng). DOI: 10.1101/sqb.2016.81.030817.
107. Mishra P, Banerjee D, Ben-Baruch A. Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy. *J Leukoc Biol* 2011;89(1):31-9. (In eng). DOI: 10.1189/jlb.0310182.
108. Liu J, Chen S, Wang W, et al. Cancer-associated fibroblasts promote hepatocellular carcinoma metastasis through chemokine-activated hedgehog and TGF- β pathways. *Cancer Lett* 2016;379(1):49-59. (In eng). DOI: 10.1016/j.canlet.2016.05.022.
109. Wang W, Zhang M, Huang Z, et al. Knockdown of CXCL5 inhibits the invasion, metastasis and stemness of bladder cancer lung metastatic cells by downregulating CD44. *Anticancer Drugs* 2022;33(1):e103-e112. (In eng). DOI: 10.1097/cad.0000000000001153.
110. Deng J, Jiang R, Meng E, Wu H. CXCL5: A coachman to drive cancer progression. *Front Oncol* 2022;12:944494. (In eng). DOI: 10.3389/fonc.2022.944494.
111. Huang M, Li Y, Zhang H, Nan F. Breast cancer stromal fibroblasts promote the generation of CD44+CD24- cells through SDF-1/CXCR4 interaction. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29(1):80. (In eng). DOI: 10.1186/1756-9966-29-80.

112. Shan S, Lv Q, Zhao Y, et al. Wnt/ β -catenin pathway is required for epithelial to mesenchymal transition in CXCL12 over expressed breast cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(10):12357-67. (In eng) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4680367/pdf/ijcep0008-12357.pdf>).
113. Zhang Y, Yao F, Yao X, et al. Role of CCL5 in invasion, proliferation and proportion of CD44+/CD24- phenotype of MCF-7 cells and correlation of CCL5 and CCR5 expression with breast cancer progression. *Oncol Rep* 2009;21(4):1113-21. (In eng) (https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or_00000331/download).
114. Mishra MN, Chandavarkar V, Sharma R, Bhargava D. Structure, function and role of CD44 in neoplasia. *J Oral Maxillofac Pathol* 2019;23(2):267-272. (In eng). DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_246_18.
115. Wu CT, Lin WY, Chen WC, Chen MF. Predictive Value of CD44 in Muscle-Invasive Bladder Cancer and Its Relationship with IL-6 Signaling. *Ann Surg Oncol* 2018;25(12):3518-3526. (In eng). DOI: 10.1245/s10434-018-6706-0.
116. Xu H, Tian Y, Yuan X, et al. The role of CD44 in epithelial-mesenchymal transition and cancer development. *Onco Targets Ther* 2015;8:3783-92. (In eng). DOI: 10.2147/ott.S95470.
117. Nagano O, Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci* 2004;95(12):930-5. (In eng). DOI: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03179.x.
118. Jothy S. CD44 and its partners in metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2003;20(3):195-201. (In eng). DOI: 10.1023/a:1022931016285.
119. Stepan AE, Pirici D, Bălăsoiu M, et al. E-cadherin \div CD44 immunophenotype in the epithelial-mesenchymal transition of bladder urothelial carcinomas. *Rom J Morphol Embryol* 2015;56(1):85-91. (In eng).
120. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation* 2009;119(6):1420-1428. DOI: 10.1172/JCI39104.
121. Hussain S, Peng B, Cherian M, Song JW, Ahirwar DK, Ganju RK. The Roles of Stroma-Derived Chemokine in Different Stages of Cancer Metastases. *Front Immunol* 2020;11:598532. (In eng). DOI: 10.3389/fimmu.2020.598532.
122. Deryugina EI, Kiosses WB. Intratumoral Cancer Cell Intravasation Can Occur Independent of Invasion into the Adjacent Stroma. *Cell Rep* 2017;19(3):601-616. (In eng). DOI: 10.1016/j.celrep.2017.03.064.
123. Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, et al. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst* 2019;9(2):109-127. (In eng). DOI: 10.1016/j.cels.2019.07.003.
124. Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, et al. Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell* 2005;8(3):227-39. (In eng). DOI: 10.1016/j.ccr.2005.08.003.
125. Neophytou CM, Panagi M, Stylianopoulos T, Papageorgis P. The Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metastasis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)* 2021;13(9) (In eng). DOI: 10.3390/cancers13092053.

126. Chung B, Esmaeili AA, Gopalakrishna-Pillai S, et al. Human brain metastatic stroma attracts breast cancer cells via chemokines CXCL16 and CXCL12. *NPJ Breast Cancer* 2017;3:6. (In eng). DOI: 10.1038/s41523-017-0008-8.
127. Wang FT, Sun W, Zhang JT, Fan YZ. Cancer-associated fibroblast regulation of tumor neo-angiogenesis as a therapeutic target in cancer. *Oncol Lett* 2019;17(3):3055-3065. (In eng). DOI: 10.3892/ol.2019.9973.
128. Sugino T, Kawaguchi T, Suzuki T. Sequential process of blood-borne lung metastases of spontaneous mammary carcinoma in C3H mice. *Int J Cancer* 1993;55(1):141-7. (In eng). DOI: 10.1002/ijc.2910550125.
129. Matsumura Y, Ito Y, Mezawa Y, et al. Stromal fibroblasts induce metastatic tumor cell clusters via epithelial-mesenchymal plasticity. *Life Sci Alliance* 2019;2(4) (In eng). DOI: 10.26508/lsa.201900425.
130. Dong G, Chen P, Xu Y, Liu T, Yin R. Cancer-associated fibroblasts: Key criminals of tumor pre-metastatic niche. *Cancer Lett* 2023;566:216234. (In eng). DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216234.
131. Shu S, Yang Y, Allen CL, et al. Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts by melanoma exosome microRNA favours a pre-metastatic microenvironment. *Sci Rep* 2018;8(1):12905. (In eng). DOI: 10.1038/s41598-018-31323-7.
132. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(3):178-96. (In eng). DOI: 10.1038/nrm3758.
133. Garg M, Singh R. Epithelial-to-mesenchymal transition: Event and core associates in bladder cancer. *Front Biosci (Elite Ed)* 2019;11:150-165. (In eng).
134. Fiori ME, Di Franco S, Villanova L, Bianca P, Stassi G, De Maria R. Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance. *Mol Cancer* 2019;18(1):70. (In eng). DOI: 10.1186/s12943-019-0994-2.
135. Baumgart E, Cohen MS, Silva Neto B, et al. Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors. *Clin Cancer Res* 2007;13(6):1685-94. (In eng). DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-06-2330.
136. McConkey DJ, Choi W, Marquis L, et al. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28(3-4):335-44. (In eng). DOI: 10.1007/s10555-009-9194-7.
137. Yun SJ, Kim WJ. Role of the epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer: from prognosis to therapeutic target. *Korean J Urol* 2013;54(10):645-50. (In eng). DOI: 10.4111/kju.2013.54.10.645.
138. Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796(2):75-90. (In eng). DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.03.002.
139. Anggorowati N, Ratna Kurniasari C, Damayanti K, et al. Histochemical and Immunohistochemical Study of α -SMA, Collagen, and PCNA in Epithelial Ovarian Neoplasm. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017;18(3):667-671. (In eng). DOI: 10.22034/apjcp.2017.18.3.667.

140. Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci* 2019;20(11) (In eng). DOI: 10.3390/ijms20112767.
141. 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 and Normal Cells. *J Vis Exp* 2020(164) (In eng). DOI: 10.3791/61830.
142. Zhuang J, Lu Q, Shen B, et al. TGF β 1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT. *Sci Rep* 2015;5:11924. (In eng). DOI: 10.1038/srep11924.
143. Tzeng CC, Liu HS, Li C, et al. Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan. *Anticancer Res* 1996;16(4a):1797-804. (In eng).
144. Williams RD. Human urologic cancer cell lines. *Invest Urol* 1980;17(5):359-63. (In eng).
145. Grossman HB, Wedemeyer G, Ren L, Wilson GN, Cox B. Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures. *J Urol* 1986;136(4):953-9. (In eng). DOI: 10.1016/s0022-5347(17)45139-1.
146. Kim J. Immune checkpoint blockade therapy for bladder cancer treatment. *Investig Clin Urol* 2016;57 Suppl 1(Suppl 1):S98-s105. (In eng). DOI: 10.4111/icu.2016.57.S1.S98.
147. Luo J, Yan R, He X, He J. Constitutive activation of STAT3 and cyclin D1 overexpression contribute to proliferation, migration and invasion in gastric cancer cells. *Am J Transl Res* 2017;9(12):5671-5677. (In eng) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752917/pdf/ajtr0009-5671.pdf>).
148. Avalle L, Pensa S, Regis G, Novelli F, Poli V. STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: A matter of balance. *Jakstat* 2012;1(2):65-72. (In eng). DOI: 10.4161/jkst.20045.
149. Knüpfer H, Preiss R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat* 2007;102(2):129-35. (In eng). DOI: 10.1007/s10549-006-9328-3.
150. Xiao J, Gong Y, Chen Y, et al. IL-6 promotes epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells possibly through the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017;313(2):F310-f318. (In eng). DOI: 10.1152/ajprenal.00428.2016.
151. Panteix G, Beaujard A, Garbit F, et al. Population pharmacokinetics of cisplatin in patients with advanced ovarian cancer during intraperitoneal hyperthermia chemotherapy. *Anticancer Res* 2002;22(2b):1329-36. (In eng).
152. Gurney H. How to calculate the dose of chemotherapy. *Br J Cancer* 2002;86(8):1297-302. (In eng). DOI: 10.1038/sj.bjc.6600139.
153. Kang HW, Kim WJ, Choi W, Yun SJ. Tumor heterogeneity in muscle-invasive bladder cancer. *Transl Androl Urol* 2020;9(6):2866-2880. (In eng). DOI: 10.21037/tau.2020.03.13.
154. Shintani Y, Fujiwara A, Kimura T, et al. IL-6 Secreted from Cancer-Associated Fibroblasts Mediates Chemoresistance in NSCLC by Increasing Epithelial-

- Mesenchymal Transition Signaling. *J Thorac Oncol* 2016;11(9):1482-92. (In eng). DOI: 10.1016/j.jtho.2016.05.025.
155. Zhuang XM, Zhou B. CXCR4 enhances cisplatin resistance of human tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2019;48(2):122-128. (In eng). DOI: 10.1111/jop.12813.
 156. Li J, Jiang K, Qiu X, et al. Overexpression of CXCR4 is significantly associated with cisplatin-based chemotherapy resistance and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer. *BMB Rep* 2014;47(1):33-8. (In eng). DOI: 10.5483/bmbrep.2014.47.1.069.
 157. Xie S, Tu Z, Xiong J, et al. CXCR4 promotes cisplatin-resistance of non-small cell lung cancer in a CYP1B1-dependent manner. *Oncol Rep* 2017;37(2):921-928. (In eng). DOI: 10.3892/or.2016.5289.
 158. Che Y, Wang J, Li Y, et al. Cisplatin-activated PAI-1 secretion in the cancer-associated fibroblasts with paracrine effects promoting esophageal squamous cell carcinoma progression and causing chemoresistance. *Cell Death Dis* 2018;9(7):759. (In eng). DOI: 10.1038/s41419-018-0808-2.
 159. Pavón MA, Arroyo-Solera I, Céspedes MV, Casanova I, León X, Mangués R. uPA/uPAR and SERPINE1 in head and neck cancer: role in tumor resistance, metastasis, prognosis and therapy. *Oncotarget* 2016;7(35):57351-57366. (In eng). DOI: 10.18632/oncotarget.10344.
 160. Xi X, Liu N, Wang Q, et al. ACT001, a novel PAI-1 inhibitor, exerts synergistic effects in combination with cisplatin by inhibiting PI3K/AKT pathway in glioma. *Cell Death Dis* 2019;10(10):757. (In eng). DOI: 10.1038/s41419-019-1986-2.
 161. Stronach EA, Cunnea P, Turner C, et al. The role of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptors in platinum response in high grade serous ovarian carcinoma. *Oncotarget* 2015;6(31):31593-603. (In eng). DOI: 10.18632/oncotarget.3415.
 162. Joshi S, Pandey R, Kumar A, Gupta V, Arya N. Targeted blockade of interleukin-8 negates metastasis and chemoresistance via Akt/Erk-NF κ B axis in oral cancer. *Cytokine* 2023;166:156155. (In eng). DOI: 10.1016/j.cyto.2023.156155.
 163. Xu H, Niu M, Yuan X, Wu K, Liu A. CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target. *Exp Hematol Oncol* 2020;9(1):36. (In eng). DOI: 10.1186/s40164-020-00192-0.
 164. Zhang Z, Yu Y, Zhang Z, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived CXCL12 enhances immune escape of bladder cancer through inhibiting P62-mediated autophagic degradation of PDL1. *J Exp Clin Cancer Res* 2023;42(1):316. (In eng). DOI: 10.1186/s13046-023-02900-0.
 165. Eskandari-Malayeri F, Rezaei M. Immune checkpoint inhibitors as mediators for immunosuppression by cancer-associated fibroblasts: A comprehensive review. *Front Immunol* 2022;13:996145. (In eng). DOI: 10.3389/fimmu.2022.996145.
 166. Freeman P, Mielgo A. Cancer-Associated Fibroblast Mediated Inhibition of CD8+ Cytotoxic T Cell Accumulation in Tumours: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)* 2020;12(9) (In eng). DOI: 10.3390/cancers12092687.
 167. Mu L, Yu W, Su H, et al. Relationship between the expressions of PD-L1 and tumour-associated fibroblasts in gastric cancer. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019;47(1):1036-1042. (In eng). DOI: 10.1080/21691401.2019.1573741.

168. Inoue C, Miki Y, Saito R, et al. PD-L1 Induction by Cancer-Associated Fibroblast-Derived Factors in Lung Adenocarcinoma Cells. *Cancers (Basel)* 2019;11(9) (In eng). DOI: 10.3390/cancers11091257.
169. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature reviews Clinical oncology* 2017;14(7):399-416. (In eng). DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.217.
170. Camci-Unal G, Newsome D, Eustace BK, Whitesides GM. Fibroblasts Enhance Migration of Human Lung Cancer Cells in a Paper-Based Coculture System. *Adv Healthc Mater* 2016;5(6):641-7, 626. (In eng). DOI: 10.1002/adhm.201500709.
171. Yang TS, Yang XH, Chen X, et al. MicroRNA-106b in cancer-associated fibroblasts from gastric cancer promotes cell migration and invasion by targeting PTEN. *FEBS Lett* 2014;588(13):2162-9. (In eng). DOI: 10.1016/j.febslet.2014.04.050.
172. Trylcova J, Busek P, Smetana K, Jr., et al. Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells in vitro. *Tumour Biol* 2015;36(8):5873-9. (In eng). DOI: 10.1007/s13277-015-3259-8.
173. Yeh CR, Hsu I, Song W, et al. Fibroblast ER α promotes bladder cancer invasion via increasing the CCL1 and IL-6 signals in the tumor microenvironment. *Am J Cancer Res* 2015;5(3):1146-57. (In eng).
174. Ogata A, Kato Y, Higa S, Yoshizaki K. IL-6 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis: A comprehensive review. *Mod Rheumatol* 2019;29(2):258-267. (In eng). DOI: 10.1080/14397595.2018.1546357.
175. Anand V, Khandelwal M, Appunni S, 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* 2019;145(11):2649-2661. (In eng). DOI: 10.1007/s00432-019-03024-9.
176. Singh R, Maurya N, Tripathi K, et al. Pilot study on quantifying the epithelial/mesenchymal hybrid state in the non-muscle invasive and muscle invasive bladder tumors: A promising marker of diagnosis and prognosis. *Advances in Cancer Biology - Metastasis* 2023;9:100112. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.adcanc.2023.100112>.
177. Goulet CR, Champagne A, Bernard G, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling. *BMC Cancer* 2019;19(1):137. (In eng). DOI: 10.1186/s12885-019-5353-6.
178. Zhou Q, Jin P, Liu J, Li S, Liu W, Xi S. HER2 overexpression triggers the IL-8 to promote arsenic-induced EMT and stem cell-like phenotypes in human bladder epithelial cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 2021;208:111693. (In eng). DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111693.
179. Rao Q, Chen Y, Yeh CR, et al. Recruited mast cells in the tumor microenvironment enhance bladder cancer metastasis via modulation of ER β /CCL2/CCR2 EMT/MMP9 signals. *Oncotarget* 2016;7(7):7842-55. (In eng). DOI: 10.18632/oncotarget.5467.
180. Majid S, Dar AA, Saini S, et al. MicroRNA-23b functions as a tumor suppressor by regulating Zeb1 in bladder cancer. *PLoS One* 2013;8(7):e67686. (In eng). DOI: 10.1371/journal.pone.0067686.

181. Spoelstra NS, Manning NG, Higashi Y, et al. The transcription factor ZEB1 is aberrantly expressed in aggressive uterine cancers. *Cancer Res* 2006;66(7):3893-902. (In eng). DOI: 10.1158/0008-5472.Can-05-2881.
182. Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, et al. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2006;131(3):830-40. (In eng). DOI: 10.1053/j.gastro.2006.06.016.
183. Hugo H, Ackland ML, Blick T, et al. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 2007;213(2):374-83. (In eng). DOI: 10.1002/jcp.21223.
184. Ascensão K, Dilek N, Augsburg F, Panagaki T, Zuhra K, Szabo C. Pharmacological induction of mesenchymal-epithelial transition via inhibition of H₂S biosynthesis and consequent suppression of ACLY activity in colon cancer cells. *Pharmacol Res* 2021;165:105393. (In eng). DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105393.
185. Siveen KS, Sikka S, Surana R, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 2014;1845(2):136-54. (In eng). DOI: 10.1016/j.bbcan.2013.12.005.
186. Zou J, Huang R, Li H, et al. Secreted TGF-beta-induced protein promotes aggressive progression in bladder cancer cells. *Cancer Manag Res* 2019;11:6995-7006. (In eng). DOI: 10.2147/cmar.S208984.
187. Liu S, Ren J, Ten Dijke P. Targeting TGF β signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6(1):8. (In eng). DOI: 10.1038/s41392-020-00436-9.
188. Yang DL, Xin MM, Wang JS, et al. Chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12 expressions and clinical significance in bladder cancer. *Genet Mol Res* 2015;14(4):17699-707. (In eng). DOI: 10.4238/2015.December.21.43.
189. Wang H, Yang D, Wang K, Wang J. Expression and Potenzial role of chemokine receptor CXCR4 in human bladder carcinoma cell lines with different metastatic ability. *Mol Med Rep* 2011;4(3):525-8. (In eng). DOI: 10.3892/mmr.2011.440.
190. Alkasalias T, Flaberg E, Kashuba V, et al. Inhibition of tumor cell proliferation and motility by fibroblasts is both contact and soluble factor dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(48):17188-93. (In eng). DOI: 10.1073/pnas.1419554111.
191. Hong HN, Won YJ, Shim JH, et al. Cancer-associated fibroblasts promote gastric tumorigenesis through EphA2 activation in a ligand-independent manner. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018;144(9):1649-1663. (In eng). DOI: 10.1007/s00432-018-2683-8.
192. Niada S, Giannasi C, Magagnotti C, Andolfo A, Brini AT. Proteomic analysis of extracellular vesicles and conditioned medium from human adipose-derived stem/stromal cells and dermal fibroblasts. *J Proteomics* 2021;232:104069. (In eng). DOI: 10.1016/j.jprot.2020.104069.
193. Bogdanowicz DR, Lu HH. Studying cell-cell communication in co-culture. *Biotechnol J* 2013;8(4):395-6. (In eng). DOI: 10.1002/biot.201300054.
194. Alkasalias T, Moyano-Galceran L, Arsenian-Henriksson M, Lehti K. Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Shield or Spear? *Int J Mol Sci* 2018;19(5) (In eng). DOI: 10.3390/ijms19051532.

195. Ahmadiankia N, Bagheri M, Fazli M. Nutrient Deprivation Modulates the Metastatic Potenzial of Breast Cancer Cells. *Rep Biochem Mol Biol* 2019;8(2):139-146. (In eng) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6844606/pdf/rbmb-8-139.pdf>).
196. Al-Ansari MM, Hendrayani SF, Shehata AI, Aboussekhra A. p16(INK4A) represses the paracrine tumor-promoting effects of breast stromal fibroblasts. *Oncogene* 2013;32(18):2356-64. (In eng). DOI: 10.1038/onc.2012.270.
197. LeBleu VS, Neilson EG. Origin and functional heterogeneity of fibroblasts. *Faseb j* 2020;34(3):3519-3536. (In eng). DOI: 10.1096/fj.201903188R.
198. Xu H, Zhao J, Li J, et al. Cancer associated fibroblast-derived CCL5 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through activating HIF1 α /ZEB1 axis. *Cell Death Dis* 2022;13(5):478. (In eng). DOI: 10.1038/s41419-022-04935-1.
199. Yoshida GJ, Azuma A, Miura Y, Orimo A. Activated Fibroblast Program Orchestrates Tumor Initiation and Progression; Molecular Mechanisms and the Associated Therapeutic Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20(9):2256. (<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2256>).
200. Gonda TA, Varro A, Wang TC, Tycko B. Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Semin Cell Dev Biol* 2010;21(1):2-10. (In eng). DOI: 10.1016/j.semcdb.2009.10.001.
201. Mezawa Y, Orimo A. Phenotypic heterogeneity, stability and plasticity in tumor-promoting carcinoma-associated fibroblasts. *Febs j* 2022;289(9):2429-2447. (In eng). DOI: 10.1111/febs.15851.
202. Bottoni G, Katarkar A, Tassone B, et al. CSL controls telomere maintenance and genome stability in human dermal fibroblasts. *Nat Commun* 2019;10(1):3884. (In eng). DOI: 10.1038/s41467-019-11785-7.
203. Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2013;15(6):637-46. (In eng). DOI: 10.1038/ncb2756.
204. Procopio MG, Laszlo C, Al Labban D, et al. Combined CSL and p53 downregulation promotes cancer-associated fibroblast activation. *Nat Cell Biol* 2015;17(9):1193-204. (In eng). DOI: 10.1038/ncb3228.
205. Ringuette Goulet C, Bernard G, Tremblay S, Chabaud S, Bolduc S, Pouliot F. Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGF β Signaling. *Mol Cancer Res* 2018;16(7):1196-1204. (In eng). DOI: 10.1158/1541-7786.Mcr-17-0784.
206. Chen C, Qi XJ, Cao YW, et al. Bladder Tumor Heterogeneity: The Impact on Clinical Treatment. *Urol Int* 2015;95(1):1-8. (In eng). DOI: 10.1159/000370165.

7 Anhang

7.1 Zusammenfassende Übersicht der UCC-spezifischen Effekte des KM

Anmerkung: Wie die zuvor aufgeführten Ergebnisse verdeutlichen, fiel die Wirkung des KM auf die untersuchten UCC stellenweise unterschiedlich aus. Zur verbesserten Gesamtübersicht fassen die nachstehenden Tabellen die überwiegenden Effekte für die einzelnen UCC zusammen.

Wie Tabelle 22 zu entnehmen ist förderte die Behandlung von BFTC-905 mit KM größtenteils den aggressiven Phänotyp dieser Zelllinie.

Tabelle 22: Übersicht über die Effekte von KM auf die untersuchten Aggressivitätsmerkmale von BFTC-905.

Aggressivitätsmerkmal	Förderung	Inhibition
Proliferative Kapazität	↑	
Apoptose (Bcl-XL, Bcl-2, Survivin)		↓
Cisplatinresistenz	↑	
CSC-Phänotyp (CK14)		Kein Effekt
Immunphänotyp (PD-L1 & PD-L2)	↑	
Migratorische Aktivität		Kein Effekt
Invasive Kapazität	↑	
CD44-Expression	↑	
Zellulärer Phänotyp/EMT	↑ (EMT)	
TGF-Beta (PAI-1)	↑	
TGF-Beta (SMAD4)		↓
CXCR4-Expression		Kein Effekt

In Tabelle 23 wird deutlich, dass auch für VMCUB-1 für viele Merkmale eine Aggressivitäts-fördernde Wirkung des KM auf die Zellen gezeigt werden konnte. Dennoch fällt auf, dass in den umfassenden Untersuchungen zum zellulären Phänotyp für VMCUB-1 ein eher antikanzerogener Effekt in Form einer MET-Induktion detektiert wurde.

Tabelle 23: Übersicht über die Effekte von KM auf die untersuchten Aggressivitätsmerkmale von VMCUB-1.

Aggressivitätsmerkmal	Förderung	Inhibition
Proliferative Kapazität	↑	
Apoptose (Bcl-XL, Bcl-2, Survivin)	↑	
Cisplatinresistenz	↑	
CSC-Phänotyp (CK14)		Kein Effekt
Immunphänotyp (PD-L1 & PD-L2)		Kein Effekt
Migratorische Aktivität		Kein Effekt

Invasive Kapazität	↑	
CD44-Expression	↑	
Zellulärer Phänotyp/EMT		↓ (MET)
TGF-Beta (PAI-1)	↑	
TGF-Beta (SMAD4)	↑	
CXCR4-Expression		↓

Für UMUC-3 fielen die Effekte des KM so heterogen aus, dass weder eine pro- noch antikanzerogene Wirkung überwog (Tabelle 24).

Tabelle 24: Übersicht über die Effekte von KM auf die untersuchten Aggressivitätsmerkmale von UMUC-3.

Aggressivitätsmerkmal	Förderung	Inhibition
Proliferative Kapazität		Kein Effekt
Apoptose (Bcl-XL, Bcl-2, Survivin)	↑	
Cisplatinresistenz	↑	
CSC-Phänotyp (CK14)		Nicht analysiert
Immunphänotyp (PD-L1 & PD-L2)		↓
Migratorische Aktivität		↓
Invasive Kapazität	↑	
CD44-Expression		↓
Zellulärer Phänotyp/EMT	↑ (EMT)	
TGF-Beta (PAI-1)	↑	
TGF-Beta (SMAD4)		↓
CXCR4-Expression		↓

8 Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich aufrichtig bei allen Personen bedanken, die mich auf meinem Weg unterstützt haben und ohne deren Beitrag diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Als Erstes gilt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Bernd Bittersohl, für seine stetige Unterstützung, sein wissenschaftliches Vertrauen und seine wertvollen Anregungen. Stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen zu haben, hat maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso möchte ich meiner Doktormutter, Frau Priv. Doz. Dr. rer. nat. Michèle Hoffmann, meinen herzlichen Dank aussprechen. Ihre konstruktiven Ratschläge, ihre wissenschaftliche Begleitung und ihre beständige Hilfsbereitschaft haben mich in jeder Phase dieser Arbeit unterstützt und motiviert.

Ein weiterer herzlicher Dank geht an Frau Priv. Doz. Dr. rer. nat. Vera Grotheer für ihre wertvolle Unterstützung und die vielen hilfreichen Diskussionen. Ihre fachliche Expertise und ihr offenes Feedback haben entscheidend zur Weiterentwicklung dieser Dissertation geführt.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. rer. nat. Christoph Suschek danken, für seine vielen konstruktiven Ideen, Hinweise zu Optimierungsmöglichkeiten und die Chance, diese Dissertation überhaupt beginnen zu können.

Mein großer Dank gilt auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Teams des unfallchirurgischen Forschungslabors. Dank eurer Unterstützung beim Erlernen der Methoden und dem großartigen Miteinander war es jeden Tag eine Freude, ins Labor zu kommen! Gleiches gilt für die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des urologischen Forschungslabors. Herzlichen Dank für die Unterstützung und schnelle Hilfe in allen Situationen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie – meinem Papa, meiner Schwester Katharina und meinem Bruder Fabian. Ihr habt mich auf diesem Weg stets unterstützt, ermutigt und mir in schwierigen Momenten beigestanden. Ohne eure Geduld, euer Verständnis und eure unerschütterliche Rückendeckung wäre, neben dieser Arbeit, vieles in den vergangenen Jahren nicht möglich gewesen. Dafür bin ich euch von Herzen dankbar.

Lucie, danke für einfach alles: für deine Unterstützung, die gemeinsame Zeit im Labor und im Studium, und dafür, dass du immer an meiner Seite bist – und für das bisher Beste von allem, für Paul. Ohne dich hätte ich das alles nicht geschafft.