

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Kommissarischer Klinikdirektor:
Univ.-Prof. Dr. med. Uwe Maus

Der Einfluss humaner Osteoblasten
auf die Tumorprogression
muskelinvasiver Urothelkarzinom-Zelllinien

Dissertation

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

vorgelegt von

Nahal Sedighi

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Bernd Bittersohl

Zweitgutachter/in: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Michèle J. Hoffmann

Für meine Familie.

Euer Rückhalt hat diesen Weg möglich gemacht.

Zusammenfassung

Ein Großteil fortgeschrittener maligner Tumorentitäten bildet Knochenmetastasen und auch das Urothelkarzinom (UC) metastasiert in den Knochen. Die Fragestellung, weshalb der Knochen eine solch affine Zielstruktur der Metastasierung darstellt, ist seit vielen Jahrzehnten Gegenstand der onkologischen Forschung. Zahlreiche Studien legen nahe, dass eine Dysregulation der Knochenhomöostase, beispielsweise infolge systemischer Skeletterkrankungen wie Osteoporose, die Kolonisierung des Knochengewebes durch Tumorzellen begünstigen kann. Der gesteigerte Knochenabbau geht mit der Freisetzung von Zytokinen, Calcium und Wachstumsfaktoren einher, welche die Proliferation, Migration und Metastasierung von Tumorzellen begünstigen und somit zur Ausbildung eines Teufelskreises beitragen. Bislang lag der Fokus in der Untersuchung der Knochenmetastasierung hauptsächlich auf dem Zusammenspiel zwischen Osteoklasten und Tumorzellen und auf der durch diese Interaktion ausgelösten *vicious cycle*. Zunehmende Erkenntnisse legen nahe, dass auch Osteoblasten wichtige Funktionen bei der Metastasierung von Tumorzellen übernehmen können und sie daher immer mehr in den Fokus weiterer Untersuchungen rücken. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher herauszufinden, inwiefern pathophysiologisch veränderte Osteoblasten von Patientinnen und Patienten mit Osteoporose tumorrelevante Parameter, wie *Homing*, Proliferation, Migration, Invasion, die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), Immunevasion und die Apoptoseinduktion von Urothelkarzinomzellen (UCC) beeinflussen können. Ein weiterer integraler Bestandteil dieses Promotionsvorhabens war es zu eruieren, ob Osteoblasten Faktoren sezernieren, die zur Vermittlung einer Chemoresistenz gegenüber Cisplatin beitragen. Dies ist besonders relevant, da sich die Cisplatin-basierte Chemotherapie beim UC seit etwa 30 Jahren kaum verbessert hat und es häufig zu Rezidiven kommt. Auch die neuen Immuntherapien sind noch durch eine teilweise niedrige Ansprechrates gekennzeichnet. Zur Untersuchung wurden Zellviabilitäts-, Invasions- und Migrationsassays, immunzytochemische Färbungen, Western Blots, PCR und durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Um parakrine Effekte der Osteoblasten *in vitro* zu analysieren, wurde aus deren Überständen ein konditioniertes Medium (KM) hergestellt. Drei muskelinvasive UCC (UMUC-3, VMCUB-1, BFTC-905) wurden getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass Osteoblasten aus osteoporotischem Knochengewebe die Invasivität, Migration und Immunevasion von UCC signifikant fördern können. Das KM der Osteoblasten scheint tumorfördernde Faktoren zu enthalten, die zur Metastasierung des UC beitragen. Künftig könnte es daher therapeutisch sinnvoll sein, die Interaktion zwischen Osteoblasten und Tumorzellen pharmakologisch zu adressieren.

Summary

A significant majority of advanced malignant tumor entities form bone metastases, including urothelial carcinoma (UC). The question of why the bone represents such an affine target structure for metastasis has been part of oncological research for many decades. Numerous studies suggest that a dysregulation of bone homeostasis, for instance as a result of systemic skeletal disorders such as osteoporosis, may promote the colonization of bone tissue by tumor cells. As a result, there is an increased breakdown of the bone substance and an increased release of cytokines, growth factors and also calcium. This increases the metastatic potential of tumor cells by promoting their migration and invasion abilities as well as their proliferation capacity, leading to a vicious cycle. So far, the focus in the investigation of bone metastasis has been mainly on the interaction between osteoclasts and tumor cells and on the vicious cycle triggered by this interaction. Increasing evidence suggests that osteoblasts are also involved in the metastasis of tumor cells and that they are therefore increasingly becoming the focus of further investigations. The aim of the present research project was to find out to what extent pathophysiologically altered osteoblasts from osteoporosis patients can influence tumor-relevant parameters such as homing, proliferation, migration, invasion, epithelial-mesenchymal transition (EMT), immune evasion and apoptosis induction of urothelial carcinoma cell lines (UCC). Another integral part of this work was to determine whether factors secreted by osteoblasts contribute to mediating chemoresistance to cisplatin, as cisplatin-based chemotherapy has not improved significantly for about 30 years and many patients suffer recurrences. And the new immunotherapies are still characterized by a partially low response rate. To explore these aspects, the study employed cell viability, invasion and migration assays, immunocytochemical staining, Western blot, PCR, and flow cytometry. To analyze the paracrine effects of human osteoblasts *in vitro*, conditioned medium (CM) was prepared from their supernatants. Three different muscle-invasive UCC lines (UMUC-3, VMCUB-1, and BFTC-905) were used to ensure a representative approach. The experiments demonstrated that osteoblasts from osteoporotic bone tissue may significantly enhance the invasiveness, migration, and immune evasion of UCC. These findings suggest that CM from osteoblasts contains tumor-promoting factors that may contribute to UC progression and metastasis. Targeting the interaction between osteoblasts and tumor cells could therefore represent a promising therapeutic strategy for improving UC treatment in the future.

Abkürzungsverzeichnis

λ	Lambda	Dlx5	Distal-less homeobox 5
β-ME	2-Mercaptoethanol	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
A	Ampere	DMSO	Dimethylsulfoxid
Abb	Abbildung, Abbildung	DNA	Desoxyribonukleinsäure
ALL	Akute lymphatische Leukämie	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ALP	Alkalische Phosphatase	DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
Apaf-1	Apoptotic Protease-activating Factor 1	DXA	Dual X-ray Absorptiometry
APC	Allophycocyanin	ECM	Extrazelluläre Matrix
Aqua dest.	Aqua destillata	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ASR	Altersstandardisierte Rate	EGF	Epidermal Growth Factor
Bax	Bcl-2 associated X Protein	ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
BCA	Bicinchoninic Acid Protein	EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
BCG	Bacillus Calmette-Guérin	ET-1	Endothelin 1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	ET_A	Endothelin A
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large	FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
BMP	Bone morphogenetic protein	FBS	Fetal bovine serum
BMU	Basic Multicellular Unit	FGF	Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin	FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Bsp	Bone sialoprotein	FLP	Filopodium-like protrusions
C	Celsius	g	G-Zahl, Relative Zentrifugalkraft
CD	Cluster of Differentiation	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
CD44v	CD44-variant isoforms	h	Stunde
CDK	Cyclin-abhängige Kinase	HA	Hyaluronsäure
cDNA	Komplementäre DNA	HCL	Hydrochloric acid
CIS	Carcinoma in situ	HGF	Hepatocyte Growth Factor
CK14	Cytokeratin 14	HIF-1	Hypoxie-induzierbare Faktor 1
cm²	Quadratzentimeter	IL	Interleukin
Col1α1	Kollagen Typ I α 1	IP3	Inositoltrisphosphat
CTGF ..	Connective Tissue Growth Factor	MAPK ..	Mitogen-activated protein kinase
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand	MET .	Mesenchymal-epitheliale Transition
CXCR	C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor		
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol		
DE	Deutschland		
DKK-1	Dickkopf-related protein 1		

mg	Milligramm	PVDF	Polyvinylidenfluorid
MIBC ..	Muskelinvasives Blasenkarzinom	qPCR	Quantitative PCR
min	Minute	RANK	Receptor Activator of NF-κB
ml	Milliliter	Rb	Retinoblastom
mm³	Kubikmillimeter	RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
MMP	Matrix-Metalloproteasen	RNA	Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie	R-PE	R-Phycoerythrin
MSC	Mesenchymale Stromazellen	RT	Reverse Transkriptase
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin	RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
n	Anzahl der KM-Gesamtpools	Runx2	Runt-related Transcription factor 2
NaCl	Natriumchlorid	s	Sekunden
NFκB	Nuclear factor κ-light-chain- enhancer of activated B cells	SD	Standardabweichung
nm	Nanometer	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
NMIBC	Nicht muskelinvasives Blasenkarzinom	SMAD	Sma- and mad-related protein
NSCLC	Non-small-cell lung cancer	Sox4	SRY-Box Transcription Factor 4
Ocn	Osteocalcin	SRE	Skeletal-related events
OPG	Osteoprotegerin	t	Knochendichte
OPN	Osteopontin	TACE	Transarterielle Chemoembolisation
Osx	Osterix	TNF	Tumornekrosefaktor
P	Passage	TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
p53	Tumorsuppressorprotein p53	TUR-B	Transurethrale Blasenresektion
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1	UC	Urothelkarzinom
PBS	Phosphate buffered saline	UCC	Urothelkarzinomzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	V	Volt
PDGF	Platelet-derived Growth Factor	VLA	Very late antigen
PD-L	Programmed cell death ligand	WB	Western Blot
PET-CT	Positronen-Emissions- Tomographie-CT	Wnt	Wingless signaling in Drosophila
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen	ZEB	Zinc Finger E-box-binding Homeobox
PMN	Prämetastatische Nische	α-SMA	α-Smooth Muscle Actin
pmol	Pikomol	μg	Mikrogramm
PTHrP	Parathormone-related peptide	μl	Mikroliter
		μm	Mikrometer
		μm²	Quadratmikrometer

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	DAS KNOCHENMIKROMILIEU.....	1
1.1.1	KNOCHENMETASTASEN	1
1.1.2	TUMORPROGRESSIVE EIGENSCHAFTEN DES KNOCHENMIKROMILIEUS	2
1.1.3	MORPHOLOGIE VON KNOCHENMETASTASEN	3
1.1.4	KNOCHENHOMÖOSTASE	5
1.2	HUMANE OSTEOLASTEN	6
1.2.1	ALLGEMEINES.....	6
1.2.2	OPG/RANK/RANKL-SYSTEM	7
1.2.3	EINFLUSS HUMANER OSTEOLASTEN AUF DIE TUMORPROGRESSION.....	9
1.2.4	EINFLUSS AUF DIE EMT	10
1.2.5	EINFLUSS AUF MIGRATION UND INVASION	12
1.2.6	EINFLUSS AUF EXTRAVASATION UND KOLONISIERUNG.....	12
1.2.7	EINFLUSS DER OSTEOLASTEN AUF DIE THERAPIERESISTENZ.....	13
1.2.8	EINFLUSS DER OSTEOLASTEN AUF DIE APOPTOSE	14
1.3	OSTEOPOROSE.....	15
1.3.1	ALLGEMEINER ÜBERBLICK	15
1.3.2	OSTEOLASTEN IN OSTEOPOROSE	17
1.4	UROTHELKARZINOM.....	18
1.4.1	EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE	18
1.4.2	TUMORSTAGING.....	19
1.4.3	SYMPTOMATIK UND DIAGNOSTIK	20
1.4.4	THERAPIE.....	20
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
2	MATERIALIEN	23
2.1	ZELLKULTURMEDIENT	23
2.2	DATENBANKEN UND SOFTWARE	24
2.3	CHEMIKALIEN	24
2.4	GERÄTE	27
2.5	VERBRAUCHSMATERIALIEN	29
2.6	KITS	30
2.7	PUFFERREZEPTUREN FÜR WESTERN-BLOT-ANALYSEN	31
2.8	ANTIKÖRPER	32
2.9	LÖSUNGEN FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE UND FUNKTIONELLE ANALYSEN	33
2.10	OLIGONUKLEOTIDPRIMER.....	34
2.11	PROBENHERKUNFT (HUMANE OSTEOLASTENKULTUREN) UND ETHISCHE FREIGABE.....	34
2.12	UROTHELKARZINOM-ZELLINIEN	34
3	METHODEN	35
3.1	ÜBERGREIFENDE ARBEITEN IN DER ZELLKULTUR	35
3.1.1	ALLGEMEINES.....	35

3.1.2	ZELLKULTURBEDINGUNGEN	35
3.1.3	ZELLKULTURMEDIENTEN	35
3.1.4	ZELLZÄHLUNG MITTELS NEUBAUER-ZÄHLKAMMER (HÄMOZYTOMETER)	36
3.1.5	PASSAGIEREN DER OSTEOLASTEN UND DER UCC	36
3.1.6	KRYOKONSERVIERUNG UND REKULTIVIERUNG	37
3.2	KULTIVIERUNG HUMANER OSTEOLASTEN	37
3.2.1	ISOLIERUNG VON HUMANEN OSTEOLASTEN AUS KNOCHENGeweBE	37
3.2.2	HERSTELLUNG DES KONDITIONIERTEN MEDIUMS (KM)	37
3.3	FUNKTIONELLE VERSUCHE	38
3.3.1	DURCHFÜHRUNG DES MIGRATIONSSASSAYS	38
3.3.2	DURCHFÜHRUNG DES INVASIONSASSAYS	39
3.4	ANALYSE DER ZELLVIABILITÄT	40
3.4.1	CELLTITER BLUE®-ASSAY	40
3.4.2	PROLIFERATIONSANALYSE	41
3.4.3	EVALUATION DER RESISTENZVERMITTLUNG DURCH KM	41
3.5	BEHANDLUNGSSCHEMA DER VORKONDITIONIERUNG	42
3.6	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN	42
3.7	IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON VIMENTIN UND E-CADHERIN	43
3.7.1	FIXIERUNG MIT ROTI®-HISTOFIX (4 %)	43
3.7.2	ANTIKÖRPERFÄRBUNG	44
3.8	WESTERN-BLOT-ANALYSEN DER UCC	45
3.8.1	PRÄPARATION VON PROTEINLYSATEN	45
3.8.2	PROTEINISOLIERUNG UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	45
3.8.3	PROBENVORBEREITUNG UND SDS-PAGE	46
3.8.4	BLOTTING	47
3.8.5	BLOCKEN DER MEMBRAN UND IMMUNMARKIERUNG	47
3.8.6	DETEKTION DER BANDEN UND AUSWERTUNG	47
3.9	PAI-1 ELISA	48
3.10	PCR-ANALYSE DER PROTEINE Bcl-2, Bcl-XL, CK14 UND E-CADHERIN	48
3.10.1	VORBEHANDLUNG DER UCC	48
3.10.2	RNA-ISOLIERUNG MIT RNEASY-MINI-KIT (QIAGEN) UND DNASE-VERDAU	49
3.10.3	RNA-MESSUNG IM SPEKTRALPHOTOMETER	49
3.10.4	TRANSKRIPTION DER RNA IN cDNA	49
3.11	STATISTISCHE ANALYSE	51
4	ERGEBNISSE	52
4.1	GRUNDLAGEN	52
4.2	EINFLUSS VON KM AUF DIE PROLIFERATION	52
4.3	FRAGE NACH EVENTUELLEM NÄHRSTOFFMANGEL	54
4.4	EINFLUSS DES KM AUF DIE MIGRATION DER UCC	55
4.5	EINFLUSS VON KM AUF DIE INVASIVITÄT	57
4.5.1	FUNKTIONELLE INVASIONSANALYSE	57

4.5.2	EINFLUSS VON KM AUF DIE CD44-EXPRESSION	60
4.6	EINFLUSS DES KM AUF DIE EPITHELIAL-MESENCHYMALE TRANSITION (EMT)	61
4.6.1	AUSWIRKUNGEN DES KM AUF DEN TGF- β -SIGNALWEG.....	62
4.6.2	EINFLUSS AUF DIE PROTEINEXPRESSION VON VIMENTIN UND E-CADHERIN.....	65
4.6.3	EINFLUSS AUF DIE GENEXPRESSION VON E-CADHERIN	68
4.6.4	EINFLUSS DES OSTEOLASTEN-KM AUF DIE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON VIMENTIN UND E-CADHERIN.....	71
4.6.5	EINFLUSS DES KM AUF DIE PROTEINEXPRESSION VON α -SMA.....	73
4.7	EINFLUSS DES KM AUF DEN ZELLULÄREN IMMUNPHÄNOTYP	75
4.8	EINFLUSS DES KM AUF DIE CXCR4-PROTEINEXPRESSION VON	76
4.9	EINFLUSS DES KM AUF DIE CK14-mRNA-EXPRESSION.....	78
4.10	EINFLUSS DES KM AUF DAS APOPTOSEVERHALTEN DER UCC.....	79
4.11	EINFLUSS DES KM AUF DIE CISPLATIN-SENSITIVITÄT.....	83
5	DISKUSSION	85
5.1	EVALUATION EINES ETWAIGEN NÄHRSTOFFMANGELS DURCH DIE INKUBATION MIT KM	85
5.2	EINFLUSS DER HUMANEN OSTEOLASTEN AUF TUMORPROGRESSIVE PARAMETER DER UCC	87
5.2.1	EINFLUSS DES OSTEOLASTEN-KM AUF DIE PROLIFERATION	87
5.2.2	EINFLUSS AUF DIE ZELLMIGRATION UND INVASIVITÄT.....	88
5.2.3	EINFLUSS DES OSTEOLASTEN-KM AUF DIE PROTEINEXPRESSION VON CD44	91
5.2.4	EINFLUSS DES OSTEOLASTEN-KM AUF DIE PROTEINEXPRESSION VON CK14	92
5.2.5	AUSWIRKUNGEN DES OSTEOLASTEN-KM AUF DIE EMT.....	93
5.2.6	EINFLUSS DES KM AUF DEN ZELLULÄREN IMMUNPHÄNOTYP.....	97
5.2.7	EINFLUSS DES OSTEOLASTEN-KM AUF APOPTOSEFAKTOREN DER UCC	98
5.2.8	EINFLUSS DES KM AUF DIE CISPLATIN-SENSITIVITÄT.....	99
5.3	FAZIT	101
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	102
7	DANKSAGUNG	1

1 Einleitung

1.1 Das Knochenmikromilieu

1.1.1 Knochenmetastasen

Die führende Ursache für den tumorassoziierten Tod ist nicht der Primärtumor, sondern die Metastasierung (Mundy, 2002). Die hohe Aggressivität von Metastasen liegt in der Tatsache begründet, dass metastasierte Tumorzellen widerstandsfähiger und effizienter sind als die Zellen des Primärtumors (Bozzuto et al., 2010). Der Knochen ist nach der Lunge und Leber am dritthäufigsten von Metastasen betroffen. Knochenmetastasen stellen eine oftmals vorkommende Komplikation maligner Tumorerkrankungen und den häufigsten Knochentumor im Erwachsenenalter dar. Hierbei kann grundsätzlich jede Tumorentität in den Knochen metastasieren, jedoch sind es vor allem Tumore der Brust, Lunge und der Prostata, die Knochenmetastasen bilden (Piccioli et al., 2015). Im Falle des metastasierten Harnblasenkarzinoms zeigten Autopsien, dass die postmortale Prävalenz von Knochenmetastasen 40 % beträgt (Clézardin et al., 2021). Gekennzeichnet durch starke Schmerzen und eine hohe Inzidenz skelettaler und blutbildender Komplikationen, wie Frakturen, Knochenmarksaplasien, Ausbildung von Nervenkompressionssyndromen und Hyperkalzämie, führen Knochenmetastasen zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität und zu häufigen Hospitalisierungen (Cecchini et al., 2005, Hiraga, 2019). Skelettmetastasen sind ein Anzeichen für eine fortgeschrittene Tumorerkrankung (Zacharia et al., 2021). Die gängigen Bildgebungsverfahren zur Erkennung von Knochenmetastasen umfassen konventionell-radiologische Aufnahmen, die Knochenszintigraphie und computertomographische Aufnahmen. Diese Techniken erfassen jedoch vorwiegend die Reaktion des Knochenstromas auf die disseminierten Tumorzellen, anstatt die Tumorherde direkt darzustellen. Dadurch werden sowohl die Früherkennung von Metastasen als auch die Beurteilung des Therapieerfolgs eingeschränkt. Um die diagnostischen Verfahren von Knochenmetastasen zu optimieren, kommen zunehmend empfindlichere Methoden wie die Positronen-Emissions-Tomographie-CT (PET-CT) und die Ganzkörper-Magnetresonanztomographie (MRT) zum Einsatz (Ban et al., 2021). Im Gegensatz zu lokal begrenzten Primärtumoren, welche operativ resezier- und mittels adjuvanter Therapie heilbar sind, können Knochenmetastasen meist nur noch palliativ behandelt werden (Valastyan and Weinberg, 2011). Zur Behandlung der Knochenschmerzen und zur Verringerung des Risikos pathologischer Frakturen kommen Bisphosphonate, der monoklonale Antikörper Denosumab, welcher als Inhibitor des *Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand* (RANKL) fungiert sowie das Radiopharmakon und Calciumanalogon Radium-223 zum Einsatz, welche die osteoklastäre Knochenresorption inhibieren (Grávalos et al., 2016). Es ist zu erwarten, dass die Prävalenz von

Knochenmetastasen in den kommenden Jahren zunehmen wird. Der Grund dafür liegt in der verbesserten Überlebenszeit von onkologischen Patientinnen und Patienten durch den Einsatz neuer therapeutischer Ansätze. Dadurch entwickeln mehr Menschen Knochenmetastasen, die zuvor möglicherweise bereits aufgrund ihres Primärtumors verstorben wären (Clézardin et al., 2021).

1.1.2 Tumorprogressive Eigenschaften des Knochenmikromilieus

Seit dem 19. Jahrhundert beschäftigt sich die Forschung mit der Thematik der organotropen Metastasierung und der Frage, weshalb der Knochen eine derart affine Zielstruktur der Metastasierung darstellt. 1889 formulierte der Chirurg Stephen Paget die sogenannte *seed-and-soil*-Theorie, welche besagt, dass die Metastasierung von der wechselseitigen Interaktion zwischen disseminierten Tumorzellen (*seed*) und dem empfänglichen Gewebe (*soil*) abhängig ist und dass der Zielort der Metastasierung kein zufälliges Ereignis darstellt. Er schlussfolgerte, dass nur dann Metastasen entstehen, wenn *seed* und *soil*, also Tumorzelle und Mikromilieu, miteinander kompatibel sind (Fidler, 2003). Bis heute findet seine Theorie weitgehend Zuspruch. Betrachtet man den Knochen und seinen einzigartigen Aufbau, scheint es vor allem das rote Knochenmark zu sein, welches die Zielstruktur für Skelettmetastasen bildet. Diese Beobachtung erklärt das typische Verteilungsmuster metastatischer Läsionen, welche vornehmlich an Regionen mit einer hohen Konzentration an rotem Knochenmark vorkommen, wie dem axialen Skelett (Basu and Alavi, 2007). Die Knochenmatrix stellt ein reichhaltiges Reservoir an Wachstumsfaktoren dar, darunter *Transforming Growth Factor β* (TGF- β), *Insulin-like Growth Factor* (IGF), *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs), *Fibroblast Growth Factor* (FGF) und *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), welche durch die osteoklastäre Resorption der Knochenmatrix freigesetzt werden (Roodman, 2004). Zusätzlich fördern die freigesetzten Wachstumsfaktoren die Proliferation von Tumorzellen und sind in der Lage, den Phänotyp der Tumorzellen in einen aggressiveren umzuwandeln (Mundy, 2002). Anhand von *In-vivo*-Modellen konnte bei Mamma- und Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden, dass nicht die Anzahl der disseminierten Tumorzellen für das Wachstum von Knochenmetastasen entscheidend ist, sondern vielmehr die Knochenmikroumgebung und die dort wirkenden wachstumsfördernden und progressionsfördernden Faktoren (Wang et al., 2015). Der Knochen stellt eine prämetastatische Nische (PMN) dar, welche durch die von Tumorzellen sezernierten Stoffe bereits im Voraus zugunsten der Ansiedlung disseminierter Tumorzellen moduliert wird. Beispielsweise konnte anhand von Zellen des Mammakarzinoms demonstriert werden, dass die Tumorzellen bereits an ihrem Ursprungsort u. a. das Enzym Lysyloxidase in den Kreislauf sezernieren. Dieses Enzym regt die Knochenresorption an und unterstützt folglich die Kolonisierung disseminierter

Tumorzellen (Sowder and Johnson, 2019). Eine weitere Besonderheit des Knochenmikromilieus, welche sich die Tumorzellen zunutze machen, ist die vor Ort herrschende Hypoxie. Die sauerstoffabhängige Genexpression des intranukleär wirksamen Transkriptionsfaktors, des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF-1), scheint eine wichtige Funktion in Bezug auf die Knochenmetastasierung einzunehmen. Unter hypoxischen Bedingungen wird die Hydroxylierung von HIF-1 und sein anschließender proteasomaler Abbau durch das Tumorsuppressorprotein Von-Hippel-Lindau gehemmt. Dadurch kann der Transkriptionsfaktor im Zellkern verbleiben und seine Zielgene aktivieren (Le et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass hypoxische Bedingungen und HIF-1-Zielgene wesentliche Schritte der metastatischen Kaskade aktivieren. Dazu gehören die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die Angiogenese, die Invasion, die Bildung einer PMN und die Aktivierung der *tumor dormancy*. Beispielsweise reguliert HIF-1 das Enzym Lysyloxidase, das mit der Bildung der PMN in Zusammenhang steht sowie die Metalloproteinasen (MMP), die in den Prozess der Tumordinvasion involviert sind (Hiraga, 2018). Ebenso spielt der im Knochen herrschende niedrige pH-Wert eine Rolle im Prozess der Tumormetastasierung. Ein saures Milieu stimuliert die Aktivität der Osteoklasten und begünstigt dadurch die Freisetzung tumorprogressiver Wachstumsfaktoren (Hensel and Thalmann, 2016). Zusätzlich scheinen diese beiden physikalischen Eigenschaften des Knochens, die hypoxische Umgebung und der saure pH, zu einer Entwicklung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung beizutragen (Shannon et al., 2003). Schwach basischen Medikamenten wie Adriamycin wird durch den anfallenden pH-Gradienten die intrazelluläre Akkumulation erschwert (Skovsgaard, 1977). Es wird zunehmend deutlicher, dass der Austausch zwischen Tumorzellen und den verschiedenen Kompartimenten des Knochens und dessen Zellen eine entscheidende Funktion bei der Knochenmetastasierung und der Entwicklung von Behandlungsresistenzen einnimmt (Pang et al., 2019, Futakuchi et al., 2016).

1.1.3 Morphologie von Knochenmetastasen

Eine gestörte Knochenhomöostase stellt nicht nur die Grundlage für systemische Skeletterkrankungen dar, sondern schafft auch ein günstigeres Umfeld für die Absiedlung disseminierter Tumorzellen und die Entstehung von Metastasen (Fornetti et al., 2018). Wenn sich Tumorzellen im Knochenmark eingenistet haben, können sie auf Osteoblasten und Osteoklasten einwirken und somit die Knochenhomöostase auf zwei verschiedene Weisen zugunsten ihrer eigenen Ansiedlung stören. Klassischerweise unterscheidet man die häufiger vorkommenden osteolytischen von den osteoblastischen Knochenmetastasen. Morphologische Analysen haben jedoch gezeigt, dass in den meisten Metastasen sowohl osteolytische als auch osteoblastische Anteile gemeinsam vorhanden sind und die beiden Morphologien nicht getrennt voneinander zu betrachten sind (Mundy, 2002).

1.1.3.1 Osteolytische Metastasen

Bei den osteolytischen Metastasen stehen die osteoklastäre Knochenresorption und die Hemmung der Osteoblasten im Vordergrund. Dies führt zu einem Ungleichgewicht zwischen Knochenresorption und -formation, was eine verstärkte Osteolyse und damit eine fortschreitende Knochendestruktion zur Folge hat (Ottewell, 2016). Der *Crosstalk* zwischen den Tumorzellen und dem Knochenmikromilieu aktiviert diverse Signalwege und treibt auf diese Weise den sogenannten *vicious cycle* der Knochenmetastasierung an. Tumorzellen sezernieren Parathormon-verwandtes Peptid (PTHrP) sowie die Zytokine Interleukin (IL-)1, IL-6 und IL-11, welche wiederum die Expression von RANKL in Osteoblasten stimulieren. RANKL bindet auf der Oberfläche osteoklastärer Vorläuferzellen an seinen spezifischen Rezeptor *Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B* (RANK), wodurch die Differenzierung der Osteoklasten angeregt wird. Aktivierte Osteoklasten sezernieren daraufhin Cysteinproteasen wie Cathepsin K, die den Abbau von Typ-I-Kollagen in der Knochenmatrix vermitteln. Dadurch werden in der Knochenmatrix gespeicherte Wachstumsfaktoren, wie TGF- β , IGFs, FGF und PDGF freigesetzt. Diese Faktoren fördern wiederum die Proliferation der Tumorzellen und stimulieren die weitere Freisetzung von PTHrP, wodurch der *vicious cycle* entsteht (Kingsley et al., 2007, Shupp et al., 2018). Die Beobachtung, dass das von Tumorzellen sezernierte PTHrP eine wichtige Funktion in der Entstehung osteolytischer Metastasen einnimmt, konnte dadurch verdeutlicht werden, dass der Einsatz PTHrP-neutralisierender Antikörper zu einer Reduktion osteolytischer Metastasen in Mausmodellen des Mammakarzinoms beigetragen hat (Zheng et al., 2013). Ebenso nimmt das Zytokin TGF- β , das von Osteoblasten produziert und in die Knochenmatrix eingebaut wird, eine wichtige Funktion bei der Bildung osteolytischer Metastasen ein. Es fördert tumorprogressive Eigenschaften der Tumorzellen, wie die Induktion der EMT und führt zur Steigerung ihrer migratorischen Fähigkeiten (Kingsley et al., 2007, Zhang et al., 2019, Karlsson et al., 2018). Zeitgleich wird im Falle der osteolytischen Metastasen die osteogene Differenzierung seitens der Tumorzellen durch die Ausschüttung von Faktoren wie Activin A, Dickkopf-1 (DKK-1), Noggin und Sclerostin gehemmt (Clézardin et al., 2021). PTHrP reduziert zusätzlich die Produktion des löslichen Rezeptors Osteoprotegerin (OPG), womit dessen hemmender Einfluss auf die RANKL/RANK-Interaktion und ein weiterer wichtiger Regulator des physiologischen Knochenstoffwechsels entfällt (Mundy, 2002). Einige Tumorentitäten, wie beispielsweise das Prostatakarzinom, sind ebenfalls in der Lage, das Protein RANKL zu synthetisieren und somit Osteoklasten und die damit verbundene osteoklastäre Resorption direkt zu aktivieren. Durch die Ausbildung osteolytischer Metastasen seitens der Tumorzellen wird das Knochengewebe geschwächt und das Risiko von Knochenfrakturen erhöht. Die zentrale Rolle von RANKL in der tumorinduzierten Knochenmetastasierung verdeutlicht die

Relevanz gezielter Therapien, die diesen Signalweg adressieren. Solche Ansätze können das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen und die Lebensqualität der Betroffenen signifikant verbessern (Silva and Branco, 2011, Chen et al., 2006).

1.1.3.2 Osteoblastische Metastasen

Während die Mechanismen und die Pathogenese der osteolytischen Metastasierung gut untersucht sind, bleiben die molekularen Vorgänge, die zur osteoblastischen Metastasierung führen, weitgehend unerforscht (Esposito et al., 2018). Die seltener vorkommenden osteoblastischen Metastasen treten vornehmlich im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom auf. Selten treten osteoblastische Metastasen in Verbindung mit anderen malignen Neoplasien auf. Jedoch wurde ihr Auftreten unter anderem auch bei Astrozytomen, Nasopharynx- und Zervixkarzinomen und Thymomen in der Literatur beschrieben (Guise et al., 2003). Ebenso bilden etwa 10 % aller in den Knochen metastasierten Urothelkarzinome (UC) osteoblastische Metastasen (Tsuda et al., 2017). Hierbei wird eine überschießende Osteogenese angeregt, wobei Verdichtungen des mineralisierten Knochengewebes entstehen, welche jedoch eine gestörte Struktur aufweisen und daher zu Frakturen neigen (Shupp et al., 2018). Dabei sezernieren die Tumorzellen Faktoren wie BMP, PDGF und FGF, welche die Differenzierung von Osteoblasten anregen und demzufolge die Bildung der Knochenmatrix induzieren. Zusätzlich wird die Bildung des Peptidhormons Endothelin-1 stimuliert und dadurch der Wnt-Signalweg (benannt nach *Wingless* und *Int-1*) aktiviert, welcher wiederum die Aktivität von Osteoblasten stimuliert. Dies geschieht, indem der Wnt-Antagonist DKK-1, welcher einen hemmenden Einfluss auf die Osteoblastogenese und damit die Knochenneubildung ausübt, inhibiert wird (Krzyszinski and Wan, 2015). Ein verbessertes Verständnis der molekularen Prozesse, die zur Bildung von osteoblastischen Metastasen führen, könnte zur Entwicklung gezielterer Therapieansätze beitragen, die zur Prävention und Behandlung der mit diesen Metastasen einhergehenden Komplikationen, wie beispielsweise Knochenbrüchen, beitragen.

1.1.4 Knochenhomöostase

Die molekulare Komplexität des Knochens liegt in der Tatsache begründet, dass er sich in einem ständigen Umbauprozess (*bone remodelling*) befindet und somit ein sehr dynamisches Gewebe darstellt, welches maßgeblich durch die Aktivität der Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten reguliert wird (Boyce et al., 1999). Das *bone remodelling* gewährleistet, dass der Knochen den ständigen metabolischen sowie mechanischen Anforderungen und den daraus resultierenden Mikroschäden der Knochenmatrix standhalten und folglich Stabilität gewährleisten kann (Hofbauer et al., 2021, Owen and

Reilly, 2018). Gerät die Balance und strenge Regulierung zwischen den knochenaufbauenden Osteoblasten und knochenresorbierenden Osteoklasten aus dem Gleichgewicht, resultieren daraus systemische Skeletterkrankungen wie die Osteopenie und Osteoporose (Owen and Reilly, 2018).

1.2 Humane Osteoblasten

1.2.1 Allgemeines

Osteoblasten stammen von multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSC) ab und durchlaufen bis zum Erreichen ihrer reifen Entwicklungsstufe mehrere Zwischenschritte, welche durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet sind. Unter der Kontrolle und dem Einfluss von BMP- und Wnt-Signalwegen wird die adipogene Differenzierung zugunsten der osteogenen Differenzierung gehemmt, sodass sich MSC zu Osteoprogenitorzellen entwickeln (Rucci and Teti, 2018). Osteoprogenitorzellen exprimieren die Transkriptionsfaktoren *Runx-related Transcription Factor 2* (Runx2), *Osterix* (Osx) und *Distal-less homeobox 5* (Dlx5). Die hohe Relevanz von Runx2 und dessen Funktion in der Osteoblastogenese wird dadurch deutlich, dass die Null-Mutation von Runx2 bei Mäusen eine letale Mutation darstellt und in Runx2-defizienten Mäusen keine Osteoblastogenese stattfindet, wodurch sie keinen Knochen besitzen (Del Fattore et al., 2012, Fakhry et al., 2013, Jonason et al., 2009). Die Expression der genannten Transkriptionsfaktoren ist für die weitere Entwicklung von Osteoprogenitorzellen hin zu den Preosteoblasten erforderlich, welche zunehmend Marker wie Typ-1-Kollagen und alkalische Phosphatase (ALP) exprimieren und sich schließlich zu reifen Osteoblasten entwickeln (Sims and Martin, 2020, Del Fattore et al., 2012). Reife Osteoblasten sind kubische Zellen mit großen Mengen an dicht gepacktem rauem endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparaten (Neve et al., 2011). Sie dienen der Regulierung der Osteoklasten und der Mineralisierung der Knochenmatrix. Indem sie Calcium- und Phosphationen in das von ihnen sezernierte Osteoid einbauen, produzieren sie Hydroxylapatit, welches die Grundlage des mineralisierten Knochens bildet (Del Fattore et al., 2012). Die durchschnittliche Lebensdauer eines Osteoblasten beträgt etwa drei Monate (Neve et al., 2011). Anschließend gehen die reifen Osteoblasten entweder in Apoptose, differenzieren zu Knochenbelegzellen oder werden, indem sie in ihrer eigens gebildeten Knochenmatrix eingeschlossen werden, zu enddifferenzierten Osteozyten (Kim et al., 2020). In Abb. 1 wird die Osteoblastogenese und ihre Regulation schematisch dargestellt.

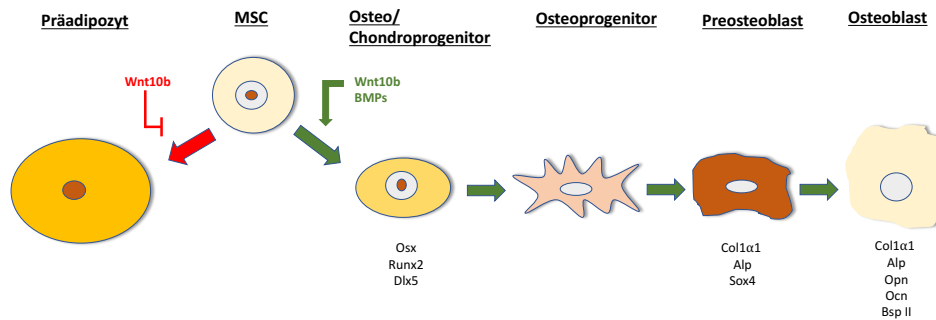


Abb. 1: Schematische Übersicht der Osteoblastogenese. Osteoblasten entstehen aus MSC. Jede Differenzierungsstufe der Osteoblastogenese ist durch die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert. Zunächst entwickeln sich MSC zu Osteo/Chondroprogenitorzellen. Dieser Schritt unterliegt der Kontrolle der Proteine BMP und Wnt10b. Wnt10b und BMPs stimulieren hierbei die Entwicklung der MSC in Richtung der Osteo/Chondroprogenitorzellen. Zeitgleich hemmt Wnt10b ebenfalls die Differenzierung der MSC in Richtung der Präadipozyten, indem adipogene Transkriptionsfaktoren inhibiert werden. Osteo/Chondroprogenitorzellen zeichnen sich durch die Expression von Runx2, Dlx5 und Osx aus. Als nächste Entwicklungsstufen folgen die Osteoprogenitorzellen, die Präosteoblasten und schlussendlich entsteht der reife Osteoblast. Präosteoblasten exprimieren Alp, Kollagen Typ 1α1 (Col1α1) und *SRY-Box Transcription Factor 4* (Sox4). Der reife Osteoblast exprimiert neben Alp, Col1α1 zusätzlich noch Osteopontin (Opn), *Bone sialoprotein* (Bsp) II und Osteocalcin (Ocn). Eigene Darstellung in Anlehnung an (Del Fattore et al., 2012).

1.2.2 OPG/RANK/RANKL-System

Mechanische Beanspruchung, Mikroschäden der Knochenmatrix, hormonelle Einflüsse und Wachstumsfaktoren nehmen Einfluss auf den Knochenumbau, welcher in den Baueinheiten, den sogenannten *Basic Multicellular Units* (BMUs), bestehend aus Osteoblasten und Osteoklasten, stattfindet (Neve et al., 2011). Im Mittelpunkt der ausgeglichenen Knochenbilanz steht das OPG/RANK/RANKL-System, welches entscheidend die Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten reguliert. Osteoblasten exprimieren das Protein RANKL, das aus der Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) stammt (Armas and Recker, 2012). 1α,25-Dihydroxycholecalciferol, Parathormon und IL-11 induzieren die Expression von RANKL auf der Oberfläche der Osteoblasten (Yasuda, 2013). MMP wandeln die membrangebundene Form von RANKL durch proteolytische Spaltung in die lösliche Form um, sodass die Interaktion mit dem Rezeptor RANK auf Osteoklasten-Vorläuferzellen erfolgen kann, welche dadurch aktiviert werden und zu reifen Osteoklasten differenzieren können (Armas and Recker, 2012, Tobeiha et al., 2020). Diese sind nun in der Lage, die kollagene Knochenmatrix abzubauen, indem sie proteolytische Enzyme wie Metalloproteinasen, Cathepsin K und Phosphatasen freisetzen (Shupp et al., 2018). Das Glykoprotein OPG stammt ebenfalls aus der Familie der TNF und wird von Osteoblasten sezerniert. Es inhibiert die RANK/RANKL-Interaktion, indem es als löslicher Decoy-Rezeptor an RANKL bindet und somit nachfolgend die Aktivierung der

Osteoklastendifferenzierung hemmt (Kim et al., 2020). Entscheidend für die Aktivität der Osteoklasten ist somit die Balance zwischen OPG und RANKL (Caetano-Lopes et al., 2007). Eine Dysbalance zugunsten des Proteins RANKL ist ebenfalls im Prozess der Osteoporose sowie bei der Entstehung von Knochenmetastasen involviert. Zunehmende Forschungsergebnisse stützen die Hypothese, dass eine Dysregulation des OPG/RANK/RANKL-Systems eine entscheidende Funktion im Prozess der onkogenen Transformation einnimmt (Renema et al., 2016). RANKL trägt zur Entstehung von Knochenmetastasen bei, indem es sowohl Osteoklasten aktiviert als auch eine chemotaktische Wirkung auf Tumorzellen ausübt, wodurch diese gezielt in das Knochengewebe migrieren. Tumorzellen sind wiederum in der Lage, durch die Expression von Faktoren und Zytokinen die RANKL-Expression in Osteoblasten zu fördern, wodurch die Knochenresorption durch Osteoklasten verstärkt und Wachstumsfaktoren freigesetzt werden, welche das Tumorwachstum begünstigen (Weilbaecher et al., 2011). Daneben sind auch einige Tumorzellen selbst in der Lage, RANKL zu exprimieren. Darunter fallen beispielsweise die Zellen des multiplen Myeloms, des Lungenkarzinoms sowie des Prostata- und Mammakarzinoms (Schubert et al., 2008, Faget et al., 2018, Okamoto, 2021). Die Bedeutung von RANKL im Prozess der Knochenmetastasierung wird zudem durch die Beobachtung untermauert, dass erhöhte RANKL-Serumspiegel mit einem signifikant höheren Risiko für die Entwicklung von Knochenmetastasen im Falle des Mammakarzinoms verbunden sind. Diese Beobachtung legt nahe, dass RANKL als potenzieller Biomarker für die Risikoabschätzung der Knochenmetastasierung des Mammakarzinoms dienen könnte (Rachner et al., 2019). Weitere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass hohe RANKL- und RANK-Spiegel sowie niedrige OPG-Level mit einer schlechteren Prognose für Patientinnen und Patienten mit Lungenkarzinom assoziiert sind (Rao et al., 2017). Lee et al. (2010) demonstrierten zudem in einer retrospektiven Studie, dass eine erhöhte RANKL-Expression beim Osteosarkom mit einer schlechteren Ansprechrate auf präoperative Chemotherapie sowie einer geringeren Überlebensrate korrelierte (Lee et al., 2011). Der monoklonale Antikörper Denosumab, welcher als Decoy-Rezeptor RANKL bindet und somit die Interaktion mit RANK-exprimierenden osteoklastären Vorläuferzellen verhindert, kommt somit nicht bloß in der Therapie der Osteoporose zum Einsatz, sondern zeigt auch eine eindruckliche Wirksamkeit bei der Prävention skelettbezogener Komplikationen (SRE) bei Knochenmetastasen (Okamoto, 2021). Abschließend lässt sich sagen, dass das OPG/RANK/RANKL-System eine zentrale Rolle in der Knochenmetastasierung spielt. Die Fähigkeit von Tumorzellen, RANKL zu exprimieren und so die Migration und Aktivierung von Osteoklasten zu fördern, unterstreicht die Bedeutung dieses Signalwegs für die Metastasierung und das Tumorwachstum im Knochengewebe.

1.2.3 Einfluss humaner Osteoblasten auf die Tumorprogression

Bislang lag der Forschungsfokus der Knochenmetastasierung hauptsächlich auf den Osteoklasten und der durch sie ausgelösten Freisetzung von Wachstumsfaktoren und ihrer Aktivierung des zuvor genannten *vicious cycle*, der erstmals 1997 von Gregory R. Mundy beschrieben wurde (Mundy, 1997). Zunehmende Beobachtungen legen nahe, dass auch Osteoblasten eine potenziell prokanzerogene Wirkung einnehmen, weshalb sie verstärkt in den Fokus weiterer Untersuchungen rücken (Huang et al., 2019). Interessanterweise imitieren bestimmte metastasierte Tumorzellen, wie die des Lungen- oder Mammakarzinoms, sowohl die Funktionen als auch das Erscheinungsbild von Osteoblasten. Auf diese Weise manipulieren sie die Knochenhomöostase zu ihrem Vorteil, um ihr Überleben, ihre Proliferation und letztlich die erfolgreiche Metastasierung zu sichern. Dieser Phänotypwechsel, bei dem Tumorzellen osteoblastäre Eigenschaften übernehmen, wird als Osteomimikry bezeichnet. Dies gelingt Tumorzellen u. a. durch die Expression von Osteoblastenmarkern wie ALP und der Sekretion von Knochenmatrixproteinen (Rucci and Teti, 2018, Rucci and Teti, 2010). Der tumorprogressive Einfluss humaner Osteoblasten wurde bisher insbesondere im Zusammenhang mit der Tumorentität des Prostatakarzinoms erforscht. Bereits mehrere klinische Studien stellten fest, dass Osteoblasten in der Lage sind, die Tumorprogression und Knochenmetastasierung von Zellen des Prostatakarzinoms zu fördern (Karlsson et al., 2018, Millimaggi et al., 2006). Der Einsatz osteotroper Radiopharmaka wie Strontium-89, Rhenium und Samarium, die sich in Bereichen mit erhöhter Osteoblastenaktivität im Knochengewebe anreichern und das Fortschreiten von Knochenmetastasen reduzieren, wird zur palliativen Behandlung von Knochenschmerzen genutzt und kann die Überlebenszeit von Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom verlängern. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Hemmung der Osteoblasten das Fortschreiten des Prostatakarzinoms verlangsamt und möglicherweise eine vielversprechende therapeutische Strategie zur Kontrolle der Tumorausbreitung darstellt (Logothetis and Lin, 2005). Ein weiterer wichtiger Akteur und potenzielles zukünftiges therapeutisches Ziel der Knochenmetastasierung stellt das Peptidhormon Endothelin-1 (ET-1) dar. Dieses wird vermehrt von einigen Tumorentitäten exprimiert, ist aber insbesondere auch an der Stimulierung der Osteoblasten beteiligt (Nelson et al., 1995, Roh and Abdulkadir, 2010). Im Kontext maligner Neoplasien ist die genaue Rolle der Endothelin-Achse noch unklar. Dennoch weisen Tumorzellen, die auch osteoblastische Metastasen bilden, wie die des Prostatakarzinoms, eine erhöhte Expression von ET-1 auf. Dies deutet darauf hin, dass tumorproduziertes ET-1 möglicherweise parakrine Effekte auf Knochenzellen ausübt. Die Interaktion zwischen tumorproduziertem ET-1 und dem ET_A Rezeptor, einem Subtyp des Endothelin-Rezeptors, auf der Oberfläche der Osteoblasten stimuliert die Knochenneubildung. Dadurch reichert sich die lokale Mikroumgebung mit

osteoblastären Wachstumsfaktoren an, die ihrerseits in der Lage sind, das Tumorwachstum weiter zu fördern (Guise et al., 2003, Yin et al., 2005). In klinischen Studien wurde der ET_A-Antagonist Atrasentan, welcher die Proliferation von Osteoblasten hemmt, im Hinblick auf dessen Auswirkungen auf die Tumorprogression des Prostatakarzinoms untersucht. Hierbei führte die Anwendung von Atrasentan in den ersten beiden Studienphasen zu einer Verringerung der Knochenschmerzen, zu einem verlangsamten Tumorwachstum sowie zu einem verlangsamten Fortschreiten der Krankheit im Vergleich zur Placebogruppe. Jedoch konnte in Phase III der klinischen Studie kein positiver Effekt im medianen progressionsfreien Überleben festgestellt werden (Shupp et al., 2018). Dennoch zeigen die erfolgsversprechenden Ergebnisse der ersten beiden Studienphasen die Bedeutung der Osteoblasten im Hinblick auf weiterführende Untersuchungen auf und demonstrieren, dass Interaktionen zwischen humanen Osteoblasten und Tumorzellen ein zukünftiges Therapieziel zur Behandlung maligner Neoplasien diverser Tumorentitäten darstellen könnten. Fortschritte beim Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Osteoblasten und metastasierten Tumorzellen könnten zukünftig die Möglichkeit bieten, den Prozess der Knochenmetastasierung zu modulieren. In den folgenden Abschnitten wird der aktuelle Stand der Forschung bezüglich der potenziell prokanzerogenen und progressionsrelevanten Wirkung von Osteoblasten auf Tumorzellen dargelegt, wobei der Fokus auf den Stadien der metastatischen Kaskade liegt.

1.2.4 Einfluss auf die EMT

Die EMT stellt einen physiologischen Prozess dar, welcher für viele Stadien der Embryonalentwicklung entscheidend ist und einen grundlegenden Prozess der Morphogenese vielzelliger Organismen darstellt (Thiery, 2002, Gonzalez and Medici, 2014). Aber auch im Rahmen der Karzinogenese übernimmt die EMT in nahezu allen Stadien der metastatischen Kaskade, wie der Initiation, dem Tumorwachstum, der Dissemination, der Metastasierung und Kolonisierung, eine bedeutsame Funktion (Brabletz et al., 2018). Die EMT induziert darüber hinaus antiapoptotische Effekte, welche mit der Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika in Verbindung gebracht werden (Cho et al., 2012). Eingeleitet wird die metastatische Kaskade durch den Prozess der EMT und umfasst die Umwandlung der Tumorzellen von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp (Rucci and Teti, 2018, Rucci and Teti, 2010, van der Horst et al., 2012). Hierbei verlieren die Zellen ihre epithelialen Eigenschaften und erlangen hingegen die Fähigkeit zur Migration und Invasion. Auf molekularer Ebene spiegelt sich dieser Phänotypwechsel in einer verminderten Expression epithelialer Marker wie E-Cadherin und Desmoplakin und gleichzeitig vermehrten Expression mesenchymaler Marker wie Vimentin, N-Cadherin, Fibronectin und *α-Smooth Muscle Actin* (*α-SMA*) wider

(Xu et al., 2009a, Gonzalez and Medici, 2014). Wenn die Tumorzellen an ihrem Zielgewebe angelangt sind, können sie mittels der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) wieder einen epithelialen Phänotyp annehmen, wodurch sie in ihrem Zielgewebe wieder adhären werden können. Diese zelluläre Plastizität trägt zu einem dynamischen Anpassungsprozess bei, der die Fähigkeit der Tumorzellen unterstützt, sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen, und trägt somit zu einem erhöhten Tumorprogressionspotenzial bei. EMT-induzierende Faktoren sind beispielsweise Wachstumsfaktoren wie *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), PDGF, TGF- β und BMP. Aber auch ein hypoxisches Milieu trägt zum Phänotypwechsel bei, indem die Expression der Transkriptionsfaktoren *Zinc Finger E-box-binding Homebox* (ZEB), Snail und Twist erhöht wird, welche ihrerseits die Expression von E-Cadherin herunterregulieren (van der Horst et al., 2012, Gonzalez and Medici, 2014). Eine entscheidende Funktion im Prozess der EMT wird dem Zytokin TGF- β zugesprochen, welcher als Hauptinduktor betrachtet wird und auch in großen Mengen von Osteoblasten sezerniert wird. TGF- β fördert die Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen, wodurch deren Motilität und Invasivität gesteigert werden. Diese Prozesse sind entscheidend für die Tumorprogression und Metastasierung, da sie den Tumorzellen ermöglichen, sich durch Gewebe zu bewegen und neue metastatische Nischen zu etablieren (Zhang et al., 2019, Xu et al., 2009a). Tumorzellen, welche die EMT durchlaufen, exprimieren zudem vermehrt den Hyaluronsäurerezeptor (HA-Rezeptor) *Cluster of Differentiation 44* (CD44) und dessen Isoformen auf ihrer Zelloberfläche. Dies ist in verschiedenen Tumorentitäten mit einer verstärkten Tumorprogression assoziiert. So korreliert die Expression der CD44-Isoform v9 (CD44v9) im Falle des Harnblasenkarzinoms mit einer schlechteren Prognose (Kobayashi et al., 2016). Die vermehrte Genexpression von CD44 wird durch IL-6 und IGF-1 induziert. Beide Faktoren werden von reifen Osteoblasten produziert, was darauf hinweist, dass Osteoblasten durch die Sekretion von IL-6 und IGF-1 möglicherweise zur erhöhten CD44-Expression und damit zur Tumorprogression beitragen können (Chen et al., 2018, Neve et al., 2011). Es lässt sich festhalten, dass von Osteoblasten sezernierte Faktoren im Prozess der EMT involviert sind und sie somit in der Lage zu sein scheinen, metastasierungsrelevante Eigenschaften in Tumorzellen zu modulieren und deren Fähigkeit zur Metastasierung sowie zur Anpassung an das Mikromilieu des Tumors zu beeinflussen (Chen et al., 2014).

1.2.5 Einfluss auf Migration und Invasion

Essentielle Schritte der erfolgreichen Metastasierung stellen die Migration und Invasion von Tumorzellen dar (Chambers et al., 2002). Die EMT bildet die Grundlage, damit Tumorzellen migratorische und invasive Fähigkeiten erlangen (Cho et al., 2012). Tumorzellen nutzen Mechanismen, die denen gesunder Zellen zur Gewebemigration ähneln. Dieser Prozess erfolgt in einem repetitiven Muster als Antwort auf externe Signale und beruht auf der Polarisierung und Umstrukturierung des Zytoskeletts. Dabei entsteht ein vorderer Pseudopod, der mit der ECM interagiert, während der Zellkörper kontrahiert und Zugkräfte erzeugt, welche die Rückseite der Zelle in Migrationsrichtung wandern lassen (Bozzuto et al., 2010). Ein vermehrtes Migrations- und Invasionsvermögen steht im Zusammenhang mit einer gesteigerten Expression des Oberflächenmoleküls CD44 (Chen et al., 2018). Karlsson et al. (2018) demonstrierten, dass von Osteoblasten sezernierte Faktoren, insbesondere TGF- β , die Migration von Prostatakarzinomzellen anregte. Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass das von Osteoblasten stammende konditionierte Medium (KM) den Verlust von Zell-Zell-Kontakten in metastatischen Prostatazelllinien induzierte, was zu einem aggressiveren Phänotyp führte (Karlsson et al., 2018). Osteopontin (OPN) stellt einen weiteren von Osteoblasten sezernierten Faktor dar, welcher die migratorischen und invasiven Eigenschaften von Tumorzellen zu fördern scheint. Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass OPN die Expression von Transkriptionsfaktoren erhöht, welche an der EMT beteiligt sind (Kothari et al., 2016). Im Kontext des kolorektalen Karzinoms wurde beobachtet, dass die OPN-vermittelte Aktivierung des Proteins *Twist* das Migrations- und Invasionsvermögen der Tumorzellen verstärkte und gleichzeitig die Zell-Zell-Adhäsionen reduzierte. Somit scheinen Osteoblasten durch die Sekretion von OPN das Tumorverhalten zu beeinflussen und die Fähigkeit der Tumorzellen zur Metastasierung zu fördern (Zhao et al., 2018).

1.2.6 Einfluss auf Extravasation und Kolonisierung

Eine gesteigerte Mobilität und die Fähigkeit, benachbarte Gewebe zu infiltrieren, basieren auf der Umstrukturierung des Zytoskeletts und ermöglichen den Tumorzellen, sich vom Primärort loszulösen (Rucci and Teti, 2010). Den Anschluss an das vaskuläre System erlangen einige Tumorzellen, indem sie proteolytische Enzyme sezernieren, wodurch sie die Wände kleiner Blutgefäße durchdringen und auf diese Weise zu entfernten Zielstrukturen gelangen können, um dort mittels ihrer Oberflächenmoleküle an passenden Rezeptoren adhäreren zu können (Mundy, 2002). Auf molekularer Ebene übernimmt das chemotaktisch wirksame CXCL12/CXCR4-System eine wichtige Funktion bei dem Prozess der Extravasation und Einnistung der Tumorzellen in das Knochenmark, welches viele Adhäsionsproteine exprimiert (Hensel and Thalmann, 2016). Osteoblasten sekretieren

CXCL12, während u. a. Zellen des Mamma- und Prostatakarzinoms sowie fortgeschrittene Urothelkarzinomzellen (UCC) den passenden Rezeptor CXCR4 exprimieren. Diese Interaktion ermöglicht es den Tumorzellen, sich in der endostealen Nische anzusiedeln (Ottewill, 2016, Retz et al., 2005). CXCL12 stellt den bislang am besten erforschten Liganden für den Chemokinrezeptor CXCR4 dar. Die Signalübertragung über CXCR4 führt zur Expression von MMP in Tumorzellen, wodurch sie erhöhte migratorische und proliferative Kapazitäten erlangen, was folglich zu einem verbesserten Überleben der Tumorzellen führt (Hensel and Thalmann, 2016). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des CXCR4-Signalwegs die Inzidenz von Knochenmetastasen beim Prostata- und Mammakarzinom verringern konnte (Sowder and Johnson, 2019). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Osteoblasten durch die Sekretion von CXCL12 den Tumorzellen mittels Aufbau eines chemotaktischen Gradienten zur Migration und Proliferation verhelfen und somit einen tumorprogressiven Einfluss ausüben. Die Fähigkeit zur Kolonisierung und erfolgreichen Metastasierung basiert zusätzlich auf der Interaktion von Tumorzellen mit ihrer neuen Umgebung, die durch die Ausbildung von *filopodium-like protrusions* (FLP) ermöglicht wird. Karlsson et al. (2018) demonstrierten, dass das von Osteoblasten stammende KM eine signifikante Steigerung der von metastatischen Prostatakarzinomzellen gebildeten FLPs bewirkte. Dementsprechend würde die Zunahme der FLP-Bildung durch das von Osteoblasten stammende KM die Metastasierungsfähigkeit der Prostatakarzinomzellen erhöhen, was zu einer Tumorprogression und einer vermehrten Dissemination der Tumorzellen, insbesondere im Knochen, führen könnte. Somit lässt sich schlussfolgern, dass parakrine Faktoren der Osteoblasten an der Metastasierung bestimmter Tumorentitäten beteiligt sind, wodurch die Bedeutung der Osteoblasten im Metastasierungsprozess untermauert wird (Karlsson et al., 2018).

1.2.7 Einfluss der Osteoblasten auf die Therapieresistenz

Bildet ein Primärtumor Knochenmetastasen, so sind diese häufig schlecht therapierbar und weisen nicht selten Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika auf. Die Gründe und die genauen Pathomechanismen dieser Resistenzentwicklung sind bis heute ungeklärt (Mohammad and Guise, 2017). Eine der Hauptursachen für die Entstehung von Therapieresistenzen stellt die Dysregulation von Zellzyklus und Zelltod dar (Pang et al., 2019). Ein Schutzmechanismus vor zytotoxischen Substanzen stellt der Übergang in einen Wachstumsstillstand, die sogenannte *tumor dormancy* dar. Dabei bleiben die Tumorzellen für einen unbestimmten Zeitraum klinisch okkult und können nach der Entwicklung neuer Anpassungsmechanismen an das Tumormikromilieu zu einem Rezidiv und zur Metastasierung führen. Boyerinas et al. (2013) demonstrierten anhand von *in-vitro*- und *in-vivo*-Modellen im Falle der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), dass das von

Osteoblasten sezernierte Protein OPN gemeinsam mit der Knochenmarksnische Einfluss auf die Lymphoblasten und deren Übergang in die *tumor dormancy* hatte. Zirkulierende, unreife lymphatische Blasten binden mit Rezeptoren wie VLA-4 an OPN in der Knochenmarksnische und beginnen ebenfalls mit der Sekretion von OPN, wodurch sie eine autokrine Rückkopplungsschleife zum Selbsterhalt aufbauen. Es wurde demonstriert, dass die Hemmung dieser Interaktion die Wirksamkeit zytotoxischer Substanzen steigern konnte (Boyerinas et al., 2013, Wang and Lin, 2013). Insgesamt weist diese Studie darauf hin, wie Leukämiezellen die Mikroumgebung der Knochenmarksnische nutzen, um sich in einen ruhenden Zustand zu begeben und zytotoxischen Therapien zu entkommen. Dieser Mechanismus trägt zur Therapieresistenz und zum Risiko eines Rezidivs bei. Ein weiterer Parameter, welcher die Chemoresistenz zu fördern scheint, ist die Autophagie. Es wird angenommen, dass eine vermehrte Autophagie in einigen Tumorzellen die Sensitivität gegenüber zytotoxischen Substanzen vermindert. Der Prozess der Autophagie dient physiologisch der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, indem beschädigte Proteine und Organellen lysosomal enzymatisch abgebaut und die daraus freigesetzten Makromoleküle wieder genutzt werden. Jedoch scheint dieser Mechanismus von Tumorzellen als Überlebensstrategie genutzt zu werden. Ein Erklärungsansatz verfolgt die Hypothese, dass die Autophagie als Überlebensmechanismus dient, indem sie unter Stressbedingungen und limitierten extrazellulären Ressourcen einen wichtigen Energielieferanten darstellt, wodurch sich Tumorzellen den kontinuierlichen metabolischen Veränderungen des Tumormikromilieus anpassen können (Pandey et al., 2021, Dunn, 1990). Im Falle des Pankreaskarzinoms wurde demonstriert, dass OPN über den OPN/NFkB- Signalweg die Autophagie der Tumorzellen aktivierte und somit deren Chemoresistenz gegenüber Gemcitabin fördern konnte. Die Funktion von OPN im Zusammenhang mit dem Harnblasenkarzinom bleibt bislang unklar (Zhao et al., 2018, Yang et al., 2015). Untersuchungen von Coppola et al. (2004) lassen jedoch vermuten, dass es eine Korrelation zwischen der Expression von OPN und der Tumorprogression des Harnblasenkarzinoms gibt und OPN daher als ein potenzieller Biomarker für die Tumorprogression des Harnblasenkarzinoms genutzt werden könnte (Coppola et al., 2004).

1.2.8 Einfluss der Osteoblasten auf die Apoptose

Die Apoptose ist der programmierte Zelltod, welcher entweder durch intrinsische oder externe Stimuli aktiviert werden kann. Charakteristische morphologische Merkmale, welche mit der Apoptose einhergehen, stellen die Chromatinkondensation, die Pyknose, die Ausbildung blasenförmiger Ausbuchtungen der Plasmamembran, die Zellschrumpfung und schließlich die Fragmentierung der Zelle in sogenannte Apoptosekörper, welche phagozytiert werden, dar. Schlüsselfunktion in der Regulation und kontrollierten

Durchführung der Apoptose übernehmen die Caspasen, welche ebenfalls durch regulatorisch wirksame Proteine in ihrer Aktivität moduliert werden und deren kaskadenartige Aktivierung schlussendlich zum Zelltod führt. Der extrinsische Signalweg der Apoptose wird über die membrangebundene, todesrezeptorvermittelte Aktivierung einer Initiator-Caspase eingeleitet. Wohingegen der intrinsische Weg über zellinterne Stimuli, wie die Erhöhung des proapoptotisch wirksamen Proteins *Bcl-2 associated X Protein* (Bax) in der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien resultiert. Im Zytosol aktiviert Cytochrom C wiederum den Apoptose-auslösenden Faktor 1 (Apaf-1), wodurch ebenfalls Caspasen aktiviert werden. Beide Wege führen schlussendlich zur Aktivierung von Effektorcaspasen und zur Spaltung von Zielproteinen, wodurch der Zelluntergang herbeigeführt wird (Reed, 2000). Eine wichtige Funktion, welche Tumorzellen im Prozess der malignen Transformation erlangen können, stellt die Entwicklung von Resistenzen gegenüber der Einleitung der Apoptose dar. Dadurch gelingt es den Tumorzellen, einen Überlebensvorteil zu erlangen und folglich den Tumorprogress sowie die Entstehung von Resistenzen gegenüber zytostatischen Therapien zu fördern. Der vermehrten Expression der antiapoptotisch wirksamen Proteine *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) und *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-XL) und dem damit verbundenen Ungleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotisch wirksamen Proteinen wird eine entscheidende Funktion im Prozess der Resistenzerwerbung gegenüber der Apoptose zugesprochen (Fulda, 2009).

1.3 Osteoporose

1.3.1 Allgemeiner Überblick

Osteoporose stellt die häufigste metabolische Skeletterkrankung der Industrieländer dar, welche aufgrund einer gestörten Mikroarchitektur der Knochenmatrix mit einem gesteigerten Frakturrisiko einhergeht (Walsh et al., 2000). Die verminderte Knochendichte führt zu Fragilitätsfrakturen, wobei sich die meisten Brüche im Bereich des proximalen Femurs und Humerus, der Wirbelkörper und am distalen Radius ereignen. Insbesondere Frakturen des proximalen Femurs und der Wirbelkörper führen zu einer erhöhten Mortalität. Betroffen ist vor allem die ältere Bevölkerung, wobei insbesondere postmenopausale Frauen, welche aufgrund des Östrogenmangels an einem beschleunigten Knochenabbau leiden, einen großen Anteil ausmachen. Osteoporose kann in die primäre, worunter die postmenopausale, senile und idiopathische Form gehören, und in die sekundäre Osteoporose, welche insbesondere medikamentös, beispielsweise durch die Einnahme von Glucocorticoiden, verursacht wird, eingeteilt werden (Nuti et al., 2019). Ebenso tragen Knochenmetastasen durch die Dysregulation der Knochenhomöostase zur Entstehung einer sekundären Osteoporose bei (Huo et al., 2024). Aufgrund der hohen Prävalenz einer immer älter werdenden Gesellschaft stellt die Osteoporose ein großes Problem der

öffentlichen Gesundheit dar, welches mit hohen finanziellen Kosten einhergeht (Nutti et al., 2019). Hochrechnungen zufolge leiden 6 Millionen Menschen in Deutschland an Osteoporose und jährlich gibt es 885.000 Neuerkrankungen (Hadjj et al., 2013). Neben der Anamnese, der körperlichen Untersuchung und der Labordiagnostik, wird die Diagnose vor allem durch die Bestimmung der Knochendichte in g/cm^2 , mittels *Dual X-ray Absorptiometry* (DXA) ermittelt. Das Ergebnis wird als *T-Score* bezeichnet und gibt an, wie stark sich das ermittelte Ergebnis von der Knochendichte gesunder, junger Erwachsener unterscheidet. Man spricht von einer Osteoporose ab einem *T-Score* von $\leq -2,5$ (Kanis et al., 2019). Pathophysiologisch steht eine Imbalance zwischen der Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten im Vordergrund, welche durch die Überaktivität der Osteoklasten zu einer vermehrten Abnahme der Knochenmatrix führt (Pietschmann and Peterlik, 1999). Das OPG/RANK/RANKL-System ist der zentrale Regulator des Knochenumbaus und trägt bei Imbalance maßgeblich zur Entstehung von Osteoporose bei. Untersuchungen an Tiermodellen und *in-vitro*-Studien haben gezeigt, dass ein OPG-Mangel einen osteoporotischen Phänotyp mit erhöhter Frakturanfälligkeit verursachte. Zusätzlich wurde festgestellt, dass eine gesteigerte RANKL-Expression in Knochenmarkszellen infolge eines Östrogenmangels den Knochenabbau verstärkte (Neve et al., 2011). Man spricht von *high-turnover*-Osteoporose, wenn die Osteoklastenaktivität bei unveränderter Osteoblastenaktivität zunimmt. Kommt es im Laufe des Lebensalters zu einer Abnahme der Osteoblastenaktivität, spricht man von *low-turnover*-Osteoporose (Boskey et al., 2005). Östrogen stimuliert die Expression von OPG und hemmt somit die Aktivität der Osteoklasten (Jia et al., 2017). Der postmenopausale Östrogenmangel hebt diese Hemmung auf, was zu einer verstärkten Aktivierung der Osteoklasten führt und einen Verlust an Knochenmasse zur Folge hat. Diese Überaktivität der Osteoklasten durch den Östrogenentzug führt zudem zu erhöhten Calciumwerten im Blut, welche folglich zu einer Senkung des Parathormonspiegels führen und schlussendlich zu einer verminderten intestinalen Calciumresorption, wodurch die Knochendichte zusätzlich abnimmt.

Alkohol, Nikotin und Glucocorticoide, welche die sekundäre Osteoporose bedingen, führen zu einer geringeren Knochendichte, indem sie u. a. die Funktion und Anzahl der Osteoblasten hemmen (Armas and Recker, 2012). Nicht nur ein hohes Lebensalter und die genannten Risikofaktoren führen zu einer verringerten Knochendichte. Auch Krebspatientinnen und -patienten, unabhängig von Geschlecht und Tumorentität, weisen ein erhöhtes Osteoporoserisiko auf (Reuss-Borst et al., 2012). Die Entstehung der Osteoporose im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen resultiert aus verschiedenen miteinander verknüpften Einflussfaktoren. Diese umfassen sowohl die direkten Auswirkungen der Tumorzellen auf die Knochenhomöostase als auch die Konsequenzen der antitumoralen Therapie (Drake, 2013). Die von den Tumorzellen induzierte Imbalance

zwischen den Osteoklasten und Osteoblasten führt zu einer vermehrten Freisetzung der in der Knochenmatrix gespeicherten Wachstumsfaktoren und kann auf diese Weise, im Sinne des *vicious cycle*, die organotrope Metastasierung von Tumorzellen fördern (Kingsley et al., 2007). Somit stellt ein Ungleichgewicht zugunsten von knochenabbauenden Osteoklasten und der daraus resultierenden gestörten Knochenhomöostase nicht bloß die Grundlage für die Entstehung der Osteoporose dar, sondern schafft auch ein günstigeres Milieu für die Absiedelung disseminierter Tumorzellen (Fornetti et al., 2018). Bisphosphonate wie Alendronat oder Zoledronat stellen die bevorzugte Behandlung bei Osteoporose dar und wirken, indem sie Osteoklasten hemmen und somit den Knochenabbau verhindern und folglich die Knochendichte verbessern. Trotz ihrer Wirksamkeit zeigen Studien, dass ihre langfristige Anwendung die Knochenbrüchigkeit erhöhen kann. Bei einer Langzeitbehandlung mit Bisphosphonaten steigt zudem das Risiko für Kiefernekrosen und atypische Femurfrakturen, was auf die übermäßige Hemmung des Knochenabbaus zurückzuführen ist (Liang et al., 2022). Ein weiterer möglicher Therapieansatz der Osteoporose umfasst den Einsatz monoklonaler Antikörper, welche die relative Überaktivität der Osteoklasten eindämmen. Der monoklonale Antikörper Denosumab, welcher an RANKL bindet und somit die Interaktion von RANKL mit RANK-exprimierenden osteoklastären Vorläuferzellen verhindert, kann den osteoklastären Knochenabbau reduzieren und somit skelettalen Komplikationen vorbeugen (Okamoto, 2021). Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurden ausschließlich Osteoblasten von Osteoporosepatientinnen und -patienten verwendet, um zu untersuchen, ob diese pathophysiologisch veränderten Zellen das Metastasierungspotenzial der UCC beeinflussen können. Dadurch soll die Frage beantwortet werden, ob und inwiefern die Osteoblasten die Tumorprogression der UCC fördern.

1.3.2 Osteoblasten in Osteoporose

Mehrere klinische Studien konnten bereits demonstrieren, dass Osteoblasten aus osteoporotischem Knochengewebe einen pathologisch veränderten Phänotyp annehmen. Im Vergleich zu Osteoblasten von gesunden Probandinnen und Probanden weisen sie eine geringere Proliferationsrate auf, welche vermutlich auf Fehlfunktionen im IGF-1-Signalweg zurückzuführen ist. Die veränderte IGF-I-Signalübertragung scheint zu einer reduzierten DNA-Synthese in Osteoblasten mit Osteoporose beizutragen, welche wiederum zu einer beeinträchtigten Zellproliferation führt und dementsprechend eine reduzierte Osteogenese zur Folge hat (Neve et al., 2011, Perrini et al., 2008). Weitere Studien konnten belegen, dass Osteoblasten aus osteoporotischem Knochengewebe eine geringere Osteokalzinproduktion sowie eine vermehrte Expression von IL-6 aufweisen (Torricelli et al., 2002). Untersuchungen an Mausmodellen zeigten, dass eine erhöhte Expression von

IL-6 mit einem verminderten trabekulären Knochengewebe sowie einer Stimulierung der Osteoklastogenese korrelierte (De Benedetti et al., 2006). In weiteren Studien wurde zudem nachgewiesen, dass IL-6 die Bildung und Aktivierung von Osteoklasten auf zwei Wegen zu fördern scheint. Einerseits wirkt IL-6 indirekt, indem es die RANKL-Produktion durch Osteoblasten steigert und dadurch die Osteoklastogenese stimuliert. Andererseits scheint IL-6 die Osteoklastogenese unabhängig von RANKL direkt anzuregen, wobei die genauen Mechanismen hierbei noch nicht vollständig identifiziert wurden (Amarasekara et al., 2018). Eine erhöhte IL-6-Produktion wird dementsprechend mit der Pathogenese und Progression der Osteoporose in Verbindung gebracht (Ferrari et al., 2003). Zudem trägt IL-6 zu einer Hemmung der OPG-Expression bei, wodurch zusätzlich die Knochenhomöostase beeinträchtigt wird und die Aktivität der Osteoklasten stimuliert wird (Harmer et al., 2019). Eine übermäßige Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 ist zudem mit diversen Tumorentitäten assoziiert und scheint die Karzinogenese durch Modulierung entscheidender onkogener Merkmale zu fördern. Auch im Falle des Harnblasenkarzinoms konnte anhand von retrospektiven Kohortenstudien und immunhistochemischer Analysen eine positive Korrelation zwischen der IL-6-Expressionsrate und der Tumorprogression beobachtet werden (Chen et al., 2013). Die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor auf Tumorzellen kann mehrere Signalwege wie JAK/STAT3, PI3K/Akt und Ras/MAPK aktivieren, wodurch die Expression von Molekülen gefördert wird, welche für das Zellüberleben, die Proliferation, Invasion, Migration und Angiogenese wichtig sind. Zudem scheint eine erhöhte Konzentration von IL-6 mit der Entstehung von Resistenzen gegenüber zytotoxischen Therapien und der Entwicklung von Apoptoseresistenzen zu korrelieren (Mohamed et al., 2024). Basierend auf den Beobachtungen, dass osteoporotische Osteoblasten signifikant höhere Mengen an IL-6 exprimieren und IL-6 in der Onkogenese diverser Tumorentitäten eine entscheidende Funktion einnimmt, lässt dies vermuten, dass die erhöhte IL-6-Sekretion das Risiko der Tumorprogression fördern könnte.

1.4 Urothelkarzinom

1.4.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Harnblasenkarzinom ist eine Erkrankung mit erheblicher Morbidität und Mortalität und weist eine global stark variierende altersstandardisierte Rate auf (ASR). Es handelt sich hierbei um die weltweit zehnthäufigste Krebserkrankung, mit rund 573.000 neuen Fällen und 213.000 Todesfällen jährlich. Männer sind deutlich häufiger betroffen als Frauen, mit einer weltweit etwa viermal höheren Inzidenz- und Mortalitätsrate (Sung et al., 2021). Die höchste ASR liegt hierbei vor allem bei Männern aus Industrienationen. Die niedrigsten Inzidenz- und Mortalitätsraten konnten in Regionen wie Mittel- und Südamerika,

Südostasien und Subsahara-Afrika dokumentiert werden (Antoni et al., 2017). Aufgrund der genannten Häufigkeit, kombiniert mit einer hohen Anfälligkeit für Rezidive, stellt die Erkrankung eine hohe Belastung für das Gesundheitssystem dar und führt dazu, dass das Harnblasenkarzinom eine der kostenintensivsten zu behandelnden Krebsarten darstellt (van der Horst et al., 2012). Den Großteil der Harnblasenkarzinome bilden UC, mit einem Anteil von 95 % (Kantor et al., 1988). Es gibt mehrere bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung eines UC, worunter vor allem das männliche Geschlecht, Tabakexposition, Infektionen mit Schistosomen und der Kontakt mit Chemikalien wie aromatischen Aminen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen am Arbeitsplatz fallen (Burger et al., 2013). Unter diesen stellt das Rauchen von Tabak den bedeutendsten Risikofaktor dar (Cumberbatch et al., 2016). Es ist daher davon auszugehen, dass die Inzidenz in Entwicklungsländern in den kommenden Jahren aufgrund einer Zunahme des Tabakkonsums voraussichtlich zunehmen wird, während es zu einer Abnahme der Inzidenz in Industrieländern kommen wird. Dieser Umstand lässt sich auf den Rückgang des Tabakkonsums in Industrieländern und auf die Minderung der Exposition gegenüber kanzerogenen Stoffen durch verbesserte Arbeitsschutzmaßnahmen zurückführen (Ploeg et al., 2009). Insgesamt beträgt die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate des Harnblasenkarzinoms etwa 80 %, wobei diese Angabe vom Stadium des Tumors abhängig ist. Sie reicht von 97 % für das *Carcinoma in situ* (CIS) bis hin zu 6 % im Falle des metastasierten Karzinoms (van der Horst et al., 2012). Etwa 10 – 15 % aller Betroffenen haben zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen (Dong et al., 2017). Laut der Literatur treten Knochenmetastasen beim muskelinvasiven Blasenkarzinom (MIBC) mit einer Häufigkeit von etwa 12 % auf (Davey et al., 1985). Sengelov et al. (1996) untersuchten die Inzidenz von Knochenmetastasen bei UC-Patientinnen und -Patienten, welche bereits Metastasen oder ein Rezidiv gebildet hatten. Hierbei fand bei etwa 35 % der Betroffenen eine Knochenmetastasierung statt (Sengeløv et al., 1996). Ohne Behandlung im metastasierten Stadium liegt die mediane Gesamtüberlebensdauer bei etwa 6 Monaten, welche jedoch durch Polychemotherapie mit Cisplatin im Durchschnitt auf 13 Monate verlängert werden kann (Onkologie, 2022).

1.4.2 Tumorstaging

Das UC kann in den nicht muskelinvasiven (NMIBC) und muskelinvasiven Subtyp eingeteilt werden (Knowles, 2006). Zum Zeitpunkt der Diagnose handelt es sich in 80 % der Fälle um ein NMIBC, welches ein begrenztes Metastasierungspotenzial aufweist. Jedoch entwickeln sich etwa 30 % der NMIBC zu einem MIBC (Fong et al., 2020). Der muskelinvasive Subtyp macht etwa 20 % der Harnblasenkarzinome aus, wobei etwa die Hälfte der Betroffenen wiederum Metastasen entwickelt (van der Horst et al., 2012). Die TNM- bzw. die UICC-

Klassifikation der Harnblasenkarzinome bildet die Grundlage der Stadieneinteilung. Die Stadien pTis, pTa und pT1 gehören zur Gruppe der NMIBC (Onkologie, 2022). Zu diesem Subtyp gehören das nicht-muskelinvasive papilläre Karzinom, das CIS und Tumore, welche die Lamina propria der Harnblasenwand erreichen. Wird diese Infiltrationstiefe überschritten und folglich die Tunica muscularis infiltriert, spricht man vom Stadium T2 und somit von einem MIBC. Die Infiltration des perivesikalen Gewebes definiert das Stadium T3. Sobald Nachbarorgane betroffen sind, spricht man vom Stadium T4, wozu ebenfalls das Auftreten von regionalen Lymphknotenmetastasen sowie Fernmetastasen gezählt werden (Magers et al., 2019).

1.4.3 Symptomatik und Diagnostik

Die schmerzlose Mikro- bzw. Makrohämaturie stellt das häufigste Erscheinungsbild des UC dar. Es können auch unspezifische irritative Symptome wie Dysurie und Dranginkontinenz sowie obstruktive Symptome auftreten. Kommt es zu Gewichtsverlust, Anorexie, Nierenversagen oder dem Auftreten einer suprapubischen tastbaren Raumforderung, handelt es sich in den meisten Fällen bereits um eine fortgeschrittene, metastasierte Tumorerkrankung (DeSouza et al., 2014). Besteht beim Vorliegen der entsprechenden klinischen Symptomatik der Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom, sollen eine Urindiagnostik, eine sonographische Untersuchung, eine Weißlicht-Zystoskopie mit Entnahme einer Biopsie sowie eine histologische Sicherung stattfinden. Ist die Muskelschicht der Blasenwand betroffen, soll zur Diagnostik ein Kontrastmittel-CT des Abdomens, des Thorax und des Beckens durchgeführt werden (Onkologie, 2022).

1.4.4 Therapie

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms richtet sich nach dem Stadium des Tumors und wird dahingehend unterschieden, ob eine Muskelinvasion stattgefunden hat oder nicht. Die Therapie der Wahl des NMIBC besteht aus der *en-bloc*-Resektion mittels transurethraler Resektion (TUR-B). Zur diagnostischen Genauigkeit wird in einigen Fällen innerhalb von sechs Wochen nach der primären TUR-B eine Nachresektion durchgeführt. Kann im Resektat eine Muskelinvasion ausgeschlossen werden, so besteht das weitere Prozedere, je nach Risikostratifizierung des Tumors, aus einer adjuvanten intravesikalen Chemotherapie und der Instillation des attenuierten Lebendimpfstoffs Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (Onkologie, 2022). Bei etwa 20 % der neu diagnostizierten Fälle des Harnblasenkarzinoms handelt es sich um ein MIBC (Patel et al., 2020). Ist die Muskelschicht der Blasenwand betroffen, stellt die radikale Zystektomie mit bilateraler pelviner Lymphknotendissektion gemäß S3-Leitlinie der deutschen Krebsgesellschaft die Standardtherapie dar. Zusätzlich wird eine neoadjuvante Chemotherapie mit einer

cisplatinhaltigen Polychemotherapie empfohlen. Eine adjuvante, cisplatinbasierte Kombinationschemotherapie wird bei Patientinnen und Patienten mit einem organüberschreitenden, muskelinvasiven Harnblasenkarzinom empfohlen, da bei ihnen das Rezidivrisiko stark erhöht ist. Hat eine Metastasierung stattgefunden, besteht das Behandlungskonzept aus der palliativen, rein medikamentösen Tumorthherapie. Etabliert hat sich hier das MVAC-Schema, bestehend aus der Kombination von Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin (Onkologie, 2022). Obwohl zunächst 70 % der Betroffenen mit einem fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom gut auf die cisplatinhaltige Chemotherapie ansprechen, erleiden dennoch 90 % von ihnen ein Rezidiv und erliegen schlussendlich der Erkrankung (van der Horst et al., 2012). Zudem ist etwa die Hälfte der Betroffenen mit UC aufgrund von Komorbiditäten und den Nebenwirkungen der Therapie nicht für eine cisplatinbasierte Kombinationstherapie geeignet. Ist die therapeutische Intervention mit cisplatinhaltiger Chemotherapie nicht möglich, sind alternativ carboplatinhaltige Zytostatika einsetzbar (Bellmunt et al., 2014, Koie et al., 2014). In den letzten 40 Jahren stellte die systemische Chemotherapie die einzige medikamentöse Therapieoption zur Behandlung des Harnblasenkarzinoms dar. Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurde zunehmend an dem Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren geforscht, sodass im Jahre 2016 Atezolizumab als erster PD-L1-Inhibitor die Zulassung zur Behandlung des fortgeschrittenen und platinrefraktären Harnblasenkarzinoms erhielt (Stenehjem et al., 2018). Gemäß der S3-Leitlinie ist heute der Einsatz von Atezolizumab und Pembrolizumab für Patientinnen und Patienten mit einem metastasierten UC der Harnblase bei positivem PD-L1-Status zugelassen, welche sich nicht für eine cisplatinhaltige Chemotherapie eignen (Onkologie, 2022). Die Therapielandschaft des Harnblasenkarzinoms ist in stetiger Weiterentwicklung und der Einsatz von zielgerichteten Immuntherapeutika sowie die Erforschung neuer Therapieoptionen sollen in Zukunft die Prognose und das Gesamtüberleben der Betroffenen verbessern (Stenehjem et al., 2018).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Mehrheit der tumorbedingten Todesfälle ist nicht auf den Primärtumor zurückzuführen, sondern auf die Ausbreitung von Metastasen (Mundy, 2002). Haben sich erst einmal Knochenmetastasen gebildet, gehen diese typischerweise mit einer schlechten Prognose einher. Die relative Inzidenz von Knochenmetastasen hängt vom Primarius ab. Vor allem Mamma- und Prostatakarzinom-, aber auch Harnblasenkarzinomzellen disseminieren in das Knochengewebe (Macedo et al., 2017). Die Knochenmatrix bildet einen reichhaltigen Speicher an Wachstumsfaktoren und Zytokinen, welche tumorinduziert freigesetzt werden und im Prozess der Knochenmetastasierung involviert sind (Kingsley et al., 2007). Inwiefern das Mikromilieu des Knochens, die Ansiedlung von UCC, deren Migration, Invasion und Proliferation sowie die Entwicklung von Resistenzen gegenüber einer Cisplatin-basierten Chemotherapie beeinflusst, ist daher von großem wissenschaftlichen Interesse. Zudem gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass eine gestörte Regulation der Knochenhomöostase die Kolonisierung des Knochens durch die Tumorzellen begünstigt. Ziel der Arbeit ist es daher zu evaluieren, inwiefern parakrine Faktoren von Osteoblasten, die von Patientinnen und Patienten mit einer diagnostizierten Osteoporose stammen, diese vorgenannten Parameter in UCC modulieren. Dies ist insbesondere beim MIBC von hoher Bedeutung, da sich seit etwa 30 Jahren die Therapie nicht wesentlich verbessert hat und viele Betroffene unter Rezidiven leiden. Für die Durchführung der Experimente dieser Forschungsarbeit wurden drei muskelinvasive UCC (VMCUB-1, UMUC-3 und BFTC-905) ausgewählt, welche die molekulare Vielfalt des UC repräsentieren sollen. Um die parakrine Wirkung der Osteoblasten auf die UCC zu untersuchen, wurde ein KM erstellt und auf dessen tumorprogressive Eigenschaften hin untersucht. Hierfür wurden Zellviabilitäts-, Invasions- und Migrationsassays durchgeführt und mit Hilfe von Western-Blot-, PCR- und immunzytochemischen Methoden apoptoserelevante Parameter und Effekte des KM auf die EMT analysiert. Die Gesamtheit der Versuche dieser Forschungsarbeit versucht, die folgenden Fragen zu beantworten:

- 1.) Inwiefern beeinflussen Osteoblasten von Osteoporosepatientinnen und -patienten die Tumorprogression von muskelinvasiven UCC?
- 2.) Gibt es einen Einfluss der humanen Osteoblasten auf die Resistenzentwicklung von UCC gegenüber Cisplatin?
- 3.) Unterscheiden sich die Effekte des KM zwischen den untersuchten UCC?

Ein besseres Verständnis darüber, inwiefern die Interaktion von Osteoblasten und Tumorzellen die Tumorprogression steigert und zu Rezidiven beiträgt, könnte Hinweise auf neue Therapieoptionen geben und dazu führen, den Prozess der Knochenmetastasierung genauer zu verstehen und zukünftig zu verhindern.

2 Materialien

2.1 Zellkulturmedien

Tabelle 1: Zellkulturmedien

Medium und Zusätze	Endkonzentration
Osteoblasten- Nährmedium	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (4,5 g/L D-Glucose)	
FBS	10 %
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	10.000 U/ml/10.000 µg/ml
UCC-Nährmedium	
Dulbecco's Modified Eagle Medium mit GlutaMAX™ (4,5 g/L D-Glucose)	
FBS	10 %
DMSO (Dimethylsulfoxid)-Einfriermedium	
DMSO	10 %
ad FBS	

Tabelle 2: Materialien zum enzymatischen Passagieren

Trypsin-PBS-Lösung	
Trypsin /EDTA in PBS	0,05 %/0,02 % (Konzentration 1x)
ad PBS	

Tabelle 3: Materialien zur Gewinnung von humanen Osteoblasten

Material	Hersteller
Kollagenase Typ IV	Invitrogen™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Scharfer Löffel	Hartmann GmbH, Heidenheim, DE
Einmalpinzette	Hartmann GmbH, Heidenheim, DE

2.2 Datenbanken und Software

Tabelle 4: Überblick über die angewandten Datenbanken und Softwares

Datenbanken
https://scholar.google.de
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov
Software
BD® FACS Suite 1.4
EndNote™ X9
ImageLab
ImageJ
Microsoft® Excel für Mac 16.36
Microsoft® Power Point für Mac 16.36
Microsoft® Word für Mac 16.36
NanoDrop Software
Prism® GraphPad (8. Version)
StepOne® Software Applied Biosystems
Victor® X3 Workstation Software
Zen 3.0 Mikroskopsoftware

2.3 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalien/ Reagenzien	Hersteller
Alexa Fluor® 488 Streptavidin	Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Alexa Fluor® 594 Streptavidin	Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
BCA Working Reagent A	Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
BCA Working Reagent B	Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
CellTiter-Blue® Reagent	Promega GmbH, Walldorf, DE

CellWASH	BD® Biosciences, Heidelberg, DE
Cisplatin Accord (1 mg/ml)	Accord Healthcare, München, DE
Collagenase Type CLS (360 U/mg)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Demi-Wasser (Aqua dest.)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DE
DePeX	Serva, Heidelberg, DE
4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dimethylsulfoxid ($\geq 99,5$ %, DMSO)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
DPBS with: Ca^{2+} and Mg^{2+}	Pan Biotech™, Aidenbach, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco®, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Ca^{2+} and Mg^{2+} (PBS)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethanol	VWR® International GmbH, Darmstadt, DE
FBS (Hitzeinaktiviertes Fetales bovines Serum)	Pan Biotech™, Aidenbach, DE
Fluoromount Aqueous Mounting Medium™	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Hydrochloric acid (HCL, Salzsäure)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Immobilon® Forte Western HRP Substrat	Merck Milipore®, Darmstadt, DE
Kristallviolett-Fertiglösung (1 %)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
2-Mercaptoethanol (β -ME)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Matrigel® Matrix phenolrotfrei	Corning®, Kaiserslautern, DE
Methanol	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumchlorid (99,5 %, NaCl)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natrium Deoxycholat ($\geq 98,0$ %)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Neonidet-P40 (NP40)	US Biological, Massachusetts, USA
Normal Goat Serum Blocking Solution	Vector Laboratories, Eching, DE
Opti-MEM® Reduced-Serum Medium without Phenol Red	Gibco®, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Applied Biosystems®, Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Roti®-Histofix 4 %	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

Roti®-Mark WESTERN-Marker	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
RLT Puffer	Qiagen®, Hilden, DE
RPE Puffer	Qiagen®, Hilden, DE
RW1 Puffer	Qiagen®, Hilden, DE
SDS $C_{12}H_{25}NaO_4S$ ($\geq 99,5$ %)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Tris ($\geq 99,3$ %) $C_4H_{11}NO_3$	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Tris-Base	Merck Milipore®, Darmstadt, DE
Tris, Hydrochlorid (Tris-HCL)	Merck Milipore®, Darmstadt, DE
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypan Blue Solution (0,4 %)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypsin 0,5 %/EDTA 0,2 % in PBS, w/o: Ca and Mg	Pan Biotech™, Aidenbach, DE
Ultra pure™ Water for Molecular Biology (RNase-freies Wasser)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Xylol	VWR® International GmbH, Darmstadt, DE

Tabelle 6: Lösungen

Lösungen	Endkonzentration
Trypsin-PBS-Lösung	
Trypsin 0,5 %/EDTA 0,2 % in PBS	0,05/0,02 % (Konzentration 1x)
ad PBS	
Kollagenase-dPBS-Lösung	
BSA	1,5 %
Kollagenase Typ 1 (270 U/mg)	0,2 %
ad DPBS	

2.4 Geräte

Tabelle 7: Überblick über die angewandten Geräte

Geräte	Firma
Absorptionsmessung	
BD FACSVia™	BD® Biosciences, Heidelberg, DE
Nanodrop™ 2000	Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Victor™ X3 Multilabel-Reader	Perkin Elmer® Inc., Massachusetts, USA
Brutschrank	
HERACELL™ 150i (CO ₂ -Inkubator mit Edelstahlkammern)	Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
WTB CB 150	BINDER GmbH, Tuttlingen, DE
Kühlung	
Cryo 1 C Freezing Container	Nalgene®, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Eiswürfelmaschine	Manitowoc® Flockeneisbereiter, Manitowoc Ice, Manitowoc, USA
HAT 5786-AC	Hettich AG, Bäch, CHE
Laboratory Refrigerator SUPER-720-CHROMAT (Kühlgerät)	Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, DE
Locator™ (Stickstofftank)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Mikroskop	
AxioCam MRc	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, DE
Axioskop 40	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, DE
Axiovert. A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, DE
Inverses Fluoreszenz Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, DE
MBQ 52 ac power supply	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, DE
Western Blot	
BioRad ChemiDoc™ MP Imaging System	BioRad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
Dry bath FB15101	Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Gelelektrophoresekammer	BioRad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	BioRad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE

UP 50H Ultraschallprozessor	Hielscher Ultrasonics, Teltow, DE
PowerPac™ Basic Power Supply	BioRad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
Zentrifugen	
Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Typ 5424	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Typ 5810 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Waagen	
Analysenwaage Extend	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, DE
Feinwaage M-prove	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, DE
Pipettierhilfen	
E3 Multipette	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Multichannel Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Singlechannel Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
qPCR	
StepOne™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems®, Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
T100™ ThermalCycler	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, USA
ThermoStat® plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Sonstiges	
DX-90 Autoklav	Systec GmbH, Linden, DE
Euroflow EF5E	Clean Air by Baker, Utrecht, NLD
Integra Biosciences™ VacuSafe™ Comfort Absaugsystem	Integra Biosciences™, Biebertal, DE
MBT-Reagenzschüttler, ROCK`N`ROLLER	neoLab® Migge GmbH, Heidelberg, DE
Neubauer-Zählkammer (0,1 mm; 0,0025 mm²)	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, DE
WNB 45 Wasserbad	Memmert, Büchenbach, DE

Vortex Mixer 7-2020	neoLab® Migge GmbH, Heidelberg, DE
---------------------	------------------------------------

2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Überblick über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Konditioniertes Medium (KM)	
Vakuumfiltrationseinheit Filtropur V25 (250 ml; 0,2 µm Porengröße)	Sarstedt AG & Co KG., Nümbrecht, DE
Invasions-Assay	
Deckgläser für Mikroskopie	Engelbrecht GmbH, Edermünde, DE
Objektträger	Engelbrecht GmbH, Edermünde, DE
Peha® Wattestäbchen	Hartmann GmbH, Heidenheim, DE
ThinCert® Zellkultur Einsatz (24-Well; 8 µm Porengröße, transluzent)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Safeshield Scalpel No. 11	Feather®, pfm medical, Köln, DE
Migrations-Assay	
ibidi® 2-Well-Zellkultureinsätze	ibidi® GmbH, Gräfelfing, DE
Zellkultur	
50 ml Einmalspritze	B. Braun SE, Melsungen, DE
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cell Lifter Polyethylene 3008	Corning®, Kaiserslautern, DE
Cell Scraper M	TPP® Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Cellstar® Cell Culture Dishes, PS, 145/20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cellstar® Zellkulturplatten (6, 12, 96 Well-Format)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Combitips advanced® (2 ml, 5 ml, 10 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Filtropur S (0,2 µm)	Sarstedt AG & Co KG., Nümbrecht, DE
Glas Pasteurpipetten	Brand™, Wertheim, DE
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Nalgene®, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE

Safe-Lock Tubes (0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Stripetten (5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml)	Corning®, Kaiserslautern, DE
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
FACS-Analyse	
5 ml Rundbodenröhrchen	Corning®, Kaiserslautern, DE
Western-Blot-Analysen	
4-15 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels	BioRad Laboratories GmbH
Blotting Filter Paper (2,5 mm; 7,5 × 8,4 mm)	Invitrogen™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Mikrotiterplatte 96-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Western Blotting Membranes	Roche Diagnostics GmbH
Molekularbiologische Analysen	
Collection Tubes (2 ml)	Qiagen®, Hilden, DE
MicroAmp® 48-Well Optical Adhesive Film	Applied Biosystems®, Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate (0,1 mL)	Applied Biosystems®, Thermo Scientific™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
RNeasy® Mini spin column	Qiagen®, Hilden, DE
QIAshredder®	Qiagen®, Hilden, DE

2.6 Kits

Tabelle 9: Überblick über die verwendeten Kits

Kits	Hersteller
Human Serpin E1/PAI-1 Quantikine® ELISA Kit	R&D Systems®, Wiesbaden, DE
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	R&D Systems®, Wiesbaden, DE
QIAshredder®	Qiagen®, Hilden, DE
Quantitect® Reverse Transcription Kit	Qiagen®, Hilden, DE
RNase® free DNase Kit	Qiagen®, Hilden, DE
RNeasy® Mini Kit	Qiagen®, Hilden, DE
Roti®-Mark WESTERN-Set	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

2.7 Pufferrezepturen für Western-Blot-Analysen

Tabelle 10: Überblick über Pufferrezepturen für Western-Blot-Analysen

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

ad Aqua dest.	
Laufpuffer (1x)	
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %
Tris, pH 8,3 – 8,8	25 mM
ad Aqua dest.	

2.8 Antikörper

Tabelle 11: Überblick über eingesetzte Antikörper

Antikörper	Katalog-Nummer	Herkunft
Primärantikörper		
α -Smooth Muscle Actin (α SMA)	ab7817	Abcam®, Cambridge, UK
CD273/PD-L2	557926	BD® Biosciences, Heidelberg, DE
CD274/PD-L1	563741	BD® Biosciences, Heidelberg, DE
CD44	550989	BD® Biosciences, Heidelberg, DE
CXCR-4	PA5-19856	Invitrogen™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
E-Cadherin	ab15148	Abcam®, Cambridge, UK
SMAD4	GTX112980	GeneTex®, Kalifornien, USA
Vimentin	MA5-14564	Invitrogen™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Sekundärantikörper		
Allophycocyanin (APC) Goat Anti-Rabbit IgG	111-136-144	Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA
BD Pharmingen™ APC Mouse Anti-Human CD44	559942	BD® Biosciences, Heidelberg, DE
BD Pharmingen™ FTC Mouse Anti-Human CD274	558065	BD® Biosciences, Heidelberg, DE
BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human CD273	558066	BD® Biosciences, Heidelberg, DE
Goat Anti-Rabbit IgG-Biotin	A16114	Invitrogen™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Roti®-Mark WESTERN-HRP-Konjugat (aus Kaninchen)	2245.2	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

2.9 Lösungen für molekularbiologische und funktionelle Analysen

Tabelle 12: Lösungen für molekularbiologische und funktionelle Analysen

Lösungen	Endkonzentration
Cellwash-Lösung (BD)	
Cellwash	98 %
FBS	3 %
ad PBS	
DAPI-Lösung	
4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	0,1 %
ad Aqua dest.	
PBSTA-Normal-Goat-Lösung	
BSA	2 %
Normales Ziegen Serum (10 %)	2 %
Triton X-100	1 %
ad PBS	
RLT-Puffer	
β -ME	1 %
ad Aqua dest.	
Kristallviolett-Lösung	
Kristallviolett-Fertiglösung	1 %
Matrigel-Gebrauchslösung	
Corning® Matrigel®	2,7 % (216-270 μ g/ml)

2.10 Oligonukleotidprimer

Tabelle 13: Überblick über angewendete Oligonukleotidprimer

Gen/ Transkript	Primer-Sequenz 5'-3'	Elongationszeiten (°C)	Standardreihe für relative Quantifizierung der Expression
Bcl-2	Fw CCTGTGGATGACTGAGTACCTG Rv CAGAGGCCGCATGCTGGG	60	UMUC-3
Bcl-XL	Fw CACAGCAGCAGTTTGGATGC Rv ATATGCTGTCCCTGGGGTGA	55	VMCUB-1
CK14	Fw GCGCACCATGCAGAACCTG Rv CCTCCACGCTGCCAATCATC	60	BFTC-905
E-Cadherin	Fw ACCAGAATAAAGACCAAGTGACCA Rv AGCAAGAGCAGCAGAATCAGAAT	60	BFTC-905
GAPDH (House- Keeping-Gene für Normalisierung)	Fw CCCTTCATTGACCTC Rv ATGACAAGCTTCCCG	60	BFTC-905

2.11 Probenherkunft (humane Osteoblastenkulturen) und ethische Freigabe

Die für die Versuchsansätze verwendeten humanen Osteoblasten stammten aus explantierten Femurköpfen, welche im Rahmen einer totalendoprothetischen Versorgung entnommen und durch die Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Uniklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt worden sind. Mittels Osteodensitometrie durch DXA-Messung wurde die Knochendichte ermittelt, wodurch der Osteoporose-Status abgeleitet wurde. Die Gewebeentnahme und deren weitere Verwendung erfolgten nach unterschriebener Einwilligungserklärung der jeweiligen Patientinnen und Patienten. Ein positives Votum zur Isolierung von humanen Osteoblasten zur Erforschung molekularer Zusammenhänge der Knochenmetastasierung wurde am 13.08.2020 von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität erteilt (Ethikkommission Nr. 5585R). Die für die Herstellung des KM verwendeten Osteoblasten stammten ausschließlich von Patientinnen und Patienten mit einer Knochendichte von $t \leq -2,5$, wodurch diese definitionsgemäß unter einer Osteoporose litten. Insgesamt wurden 10 Personen für die Erstellung des Mediums inkludiert, wovon 4 männlichen und 6 weiblichen Geschlechts waren. Das Durchschnittsalter des Patientenkollektivs betrug 72 Jahre.

2.12 Urothelkarzinom-Zelllinien

Bei den für die Experimente verwendeten kommerziellen UCC handelte es sich um muskelinvasive Tumorzelllinien. Untersucht wurden die in Tabelle 14 genannten UCC, welche in der Literatur als Träger einer p53-Punktmutation beschrieben wurden (Makri et al., 1998, Tzeng et al., 1996, Markl and Jones, 1998).

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten UCC sowie Ursprung und Zelltyp

Name	Ursprung	Phänotyp
BFTC-905	stammt von einer 51-jährigen chinesischen Patientin mit einem papillären Übergangszellkarzinom der Harnblase Grad III im Jahr 1990 (Tzeng et al., 1996)	epithelial (Tzeng et al., 1996)
VMCUB-1	stammt aus dem primären Übergangszellkarzinom der Harnblase eines männlichen Patienten (Williams, 1980)	epithelial (Skowron et al., 2015)
UMUC-3	stammt aus dem primären Übergangszellkarzinom der Harnblase eines männlichen Patienten (Grossman et al., 1986)	mesenchymal (Skowron et al., 2015)

3 Methoden

3.1 Übergreifende Arbeiten in der Zellkultur

3.1.1 Allgemeines

Die Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen und wurden unter Verwendung einer *laminar air flow* Werkbank durchgeführt. Alle hierfür verwendeten Materialien wurden steril erworben, steril filtriert oder vor der Verwendung autoklaviert.

3.1.2 Zellkulturbedingungen

Um ein bestmögliches Wachstum der Zellkulturen zu gewährleisten, wurden die Osteoblasten und UCC in 75 cm² bzw. 175 cm² Zellkulturflaschen unter konstanten und physiologischen Bedingungen im Brutschrank aufbewahrt. Hierbei betrugen die Temperatur 37 °C, der CO₂-Gehalt 5 % und die relative Luftfeuchtigkeit > 95 %. Mittels regelmäßiger lichtmikroskopischer Kontrollen wurden die Vitalität, die Konfluenz, das Wachstum der Osteoblasten und das Vorhandensein möglicher Kontaminationen begutachtet.

3.1.3 Zellkulturmedien

Für die Herstellung des Osteoblastenwachstumsmediums wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM (4,5 g/L D-Glucose) verwendet. Da DMEM keine Lipide, Wachstumsfaktoren und Proteine enthält, wurde diesem 10 % FBS zugefügt. Um eine optimale Kultivierung zu ermöglichen, wurden dem DMEM zusätzlich 10 mL HEPES-Pufferlösung (1 M), Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL/10.000 µg/mL) und Gentamycin (50 mg/mL) beigefügt. Für die Kultivierung der UCC wurde DMEM mit GlutaMAX™ Supplement verwendet, welchem ebenfalls 10 % FBS und Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL/10.000 µg/mL) beigefügt wurden. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 72 h bis

96 h, wodurch nicht-adhärenente Zellen entfernt wurden. Die Medien sowie ihre Zusätze, wurden bei 4 °C gelagert und vor der Nutzung auf 37 °C erwärmt.

3.1.4 Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer)

Die Bestimmung der vitalen Zellen erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer und der Verwendung des Farbstoffs Trypanblau. Es wird sich hierbei zunutze gemacht, dass Trypanblau nicht in der Lage ist, die Membran vitaler Zellen zu durchdringen. Bei letalen Zellen hingegen diffundiert der Farbstoff durch die Membran, wodurch die Zellen blau gefärbt werden. Das Deckgläschen wurde durch Anhauchen leicht befeuchtet und auf die Zählkammer geschoben. 5 µl der Zellsuspension sowie 5 µl des Farbstoffs wurden gemischt und dann luftblasenfrei auf die Zählkammer aufgetragen, indem die Pipettenspitze am Rand des Deckgläschens angesetzt und langsam entleert wurde. Anschließend wurde die Zellzahl innerhalb der vier Quadrate ausgezählt. Die Berechnung erfolgte mittels folgender Formel:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Zellzahl in allen 4 Quadraten}}{4} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)}$$

Die Zellzahl wurde sowohl vor der Aussaat als auch vor dem Kryokonservieren auf diese Weise ermittelt.

3.1.5 Passagieren der Osteoblasten und der UCC

Um die Proliferation adhärenter und konfluenter Osteoblasten zu ermöglichen, müssen diese nach erreichter Maximaldichte (80 %) schonend mittels enzymatischer Passagierung aus dem Monolayer gelöst werden. Hierbei wurden zunächst alle benötigten Reagenzien, welche zuvor bei 4 °C gelagert waren, im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Das verbrauchte Medium wurde abgenommen und die Osteoblasten mittels PBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) 1:10 mit PBS verdünnt auf die Osteoblasten gegeben. Da die optimale Enzymtemperatur des Trypsins bei 37 °C liegt, wurden die Osteoblasten für 3 min im Brutschrank bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % gelagert. Anschließend wurden die Zellen durch Abklopfen gelöst und die Enzymreaktion durch die Zugabe von Nährmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde überführt und bei 300 g (relative Zentrifugalkraft) für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit Medium resuspendiert und die gewünschte Zellmenge wurde in eine neue Zellkulturflasche, welche zuvor mit frischem Nährmedium befüllt worden war, überführt.

3.1.6 Kryokonservierung und Rekultivierung

Nachdem Trypsinieren, Zentrifugieren und Auszählen wurde das Zellpellet in einer Konzentration von max. 2×10^6 in 1.000 μ l DMSO-Einfriermedium (10 %) in ein 1,5 ml Kryoröhrchen aufgenommen. Um ein langsames und kontrolliertes Herunterkühlen der Zellen zu gewährleisten, wurden die Osteoblasten in einer Isopropanolbox aufbewahrt und diese bei -80°C gelagert. So wurden die Osteoblasten schonend 1°C/h heruntergekühlt. Zur Rekultivierung wurde die Zellsuspension, nachdem sie fast vollständig aufgetaut war, zügig in ein mit Medium befülltes 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und anschließend für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Nährmedium resuspendiert. Abschließend wurde die Zellsuspension in eine mit frischem Nährmedium befüllte Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2 Kultivierung humaner Osteoblasten

3.2.1 Isolierung von humanen Osteoblasten aus Knochengewebe

Die Isolierung der humanen Osteoblasten erfolgte durch die Entnahme der Spongiosa aus operativ gewonnenen Hüftköpfen. Hierfür wurde die im Rahmen der Isolierung benötigte Kollagenase-IV-Lösung zunächst zubereitet, indem 100 mg auf 40 ml Wachstumsmedium (DMEM + 10 % FBS + Penicillin-Streptomycin ($10.000\text{ U/mL}/10.000\text{ }\mu\text{g/mL}$) + 10 mM Hepes) gelöst und im Anschluss sterilfiltriert wurde (Porengröße $0,2\text{ }\mu\text{m}$). Die Spongiosa wurde mittels scharfen Löffels und einer Einmalpinzette in einer Petrischale von der Kompakta und dem Bindegewebe gelöst und in 1 mm^3 großen Knochenfragmenten weiterverarbeitet. Die isolierten Knochenfragmente wurden in einem 50 ml Falconröhrchen mit der sterilen Kollagenase-IV-Lösung versetzt und für 2,5 h bei 37°C auf dem Rollenmischer inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Kollagenase-IV-Lösung in ein frisches 50 ml Falcon pipettiert und zentrifugiert (300 g, 5 min). Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wurde das Zellpellet in DMEM resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Aussaat der Osteoblasten erfolgte in Osteoblastenwachstumsmedium und in T75-Zellkulturflaschen. Nach etwa vier Tagen erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.2 Herstellung des konditionierten Mediums (KM)

Um die parakrinen Faktoren der Osteoblasten für die weiterführenden Experimente zu nutzen, wurde das verwendete Medium der kultivierten Osteoblasten in regelmäßigen Zeitabständen abgenommen und kryokonserviert (-80°C). Hierfür wurden die verwendeten Osteoblasten aufgetaut und in einer Konzentration von ca. 8×10^5 in eine T175-Zellkulturflasche gegeben, welche mit 45 ml Nährmedium befüllt wurde. Um eine maximale Konzentration löslicher Faktoren im Medium zu gewährleisten, wurde das

Medium erst entnommen, wenn die Osteoblasten eine Konfluenz von etwa 75–90 % erreicht hatten. Die Überstände wurden nach 72 h bzw. 96 h Inkubation abgenommen und bei –80 °C gelagert. Das für die weiterführenden Versuche verwendete KM stammte von 4 verschiedenen biologischen Spendern, wobei die Passagen 2–5 in gleichen Anteilen hinzugefügt worden sind. Bei der Sterilfiltration handelt es sich um ein physikalisches Verfahren zur Entfernung unerwünschter Mikroorganismen, welches insbesondere für hitzeempfindliche Lösungen angewandt wird, die nicht autoklaviert werden können. Die kryokonservierten nativen Medien wurden am Tag der Sterilfiltration nach dem Auftauen mittels einer Vakuumfiltrationseinheit (Porengröße der Membran 0,2 µm) steril filtriert. Abschließend wurde der hierbei hergestellte sterilfiltrierte Gesamtpool an Medien in unterschiedlichen Mengen aliquotiert und bei –80 °C gelagert. Insgesamt wurden auf diese Weise 11 verschiedene Pools erstellt, deren Einfluss auf die UCC analysiert wurde. Im Nachfolgenden wird die Anzahl der im Rahmen der Versuche analysierten Gesamtpools mit „n = “ angegeben.

3.3 Funktionelle Versuche

3.3.1 Durchführung des Migrationsassays

Um die migratorischen Eigenschaften der Osteoblasten auf die UCC zu erfassen, wurden sterile Ibidi®-Einsätze, welche aus zwei Kammern bestanden und durch einen 500 µm breiten Mittelsteg voneinander getrennt wurden, verwendet. Diese wurden auf dem Boden einer 12-Well-Platte positioniert und anschließend deren beiden Kammern mit den UCC belegt, sodass zwei dichte konfluente Zellrasen entstehen konnten. Die Aussaat der UCC erfolgte nach dem Schema in Tabelle 15. Am darauffolgenden Tag wurden die Ibidi®-Einsätze gezogen und die Wells mit 1,5 ml Medium geflutet. Hierbei wurde der Einfluss von DMEM mit dem KM verglichen. Anschließend folgte die Fotodokumentation der zellfreien Gasse mittels inversen Mikroskops bei einer 10-fachen Vergrößerung. Hierbei wurde der Steg nach 4 h, 8 h, 10 h und im Falle der BFTC-905 auch nach 12 h fotografiert. Die abschließende Auswertung des Migrationsareals erfolgte mittels des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ Version 1.53 und wurde in µm² angegeben. Hierbei wurde mit Hilfe des *Freehand Selection Tools* die Fläche des Migrationsareals ermittelt, indem die migrierten UCC manuell markiert wurden. Jeder Einsatz wurde an zwei Stellen fotodokumentiert, sodass bei der abschließenden Auswertung ein Mittelwert der Ergebnisse gebildet wurde, welcher von der Gesamtfläche subtrahiert wurde. Es wurde der Einfluss von 8 verschiedenen KM auf das Migrationsverhalten der UCC untersucht (n = 8).

Tabelle 15: Aussaat der UCC im Migrationsassay

	Zellzahl/Kammer	Aussaatvolumen in μl
BFTC-905	55.000	75
UMUC-3	50.000	75
VMCUB-1	45.000	75

3.3.2 Durchführung des Invasionsassays

Das Vermögen von Zellen, die extrazelluläre Matrix zu durchdringen und Gewebe zu infiltrieren, lässt sich mittels Transwell-Invasionsassays und der abschließenden Messung der invadierten Zellen eruieren. Es handelt sich hierbei um eine Weiterentwicklung des *Boyden-chamber-assays* und es ist einer der am häufigsten angewandten Chemotaxis-Assays. Das Grundprinzip ist, dass die Zellen durch eine Filtermembran mit definierter Porengröße einem chemotaktischen Gradienten folgen und dabei die extrazelluläre Matrix infiltrieren. Dieser Assay wurde angewandt, um den Einfluss der parakrinen Signalmediatoren der Osteoblasten auf das Invasionsverhalten der UCC zu analysieren. Die verwendeten Kunststoffeinsätze, deren Boden aus einer permeablen Membran bestand, waren an die Einsenkung von 24-Well-Platten angepasst und besaßen eine Porengröße von 0,8 μ m. Um die Eigenschaften der extrazellulären Matrix zu simulieren, wurde eine Matrigel-Gebrauchslösung (2,7 %) verwendet, welche über Nacht bei 4 °C aufgetaut wurde. Im ersten Schritt wurde unter sterilen Bedingungen 20 μ l der eiskalten Matrigel-Gebrauchslösung auf die Oberfläche der Membran pipettiert und durch Klopfen gleichmäßig innerhalb des Einsatzes verteilt. Es folgte eine Inkubation (20 min) bei 37 °C/5 % CO₂ im Brutschrank. Der Beschichtungsschritt wurde erneut mit 20 μ l der Matrigel-Gebrauchslösung wiederholt und es folgte eine weitere Inkubation von 60 min im Brutschrank. Diese Zeit wurde genutzt, um die UCC zu trypsinieren, zu zählen und in der gewünschten Konzentration gemäß dem Aussaatschema (Tabelle 16) in Opti-Mem® Reduced-Serum Medium auszusäen. Der Boden der Wells wurde mit 500 μ l des Lockmediums befüllt (DMEM bzw. KM). Das Opti-Mem® Reduced-Serum Medium, welches für die Aussaat der UCC verwendet wurde, wies einen reduzierten Nährstoffgehalt auf, sodass ein chemotaktischer Gradient zwischen dem Innenraum der Einsätze und den mit Medium befüllten Einsenkungen der Wells entstand. Durch die permeablen Membraneinsätze konnten zwei Kompartimente innerhalb eines Wells erschaffen werden, die miteinander in Kontakt treten konnten, sodass ein wechselseitiger Austausch stattfand. Die Inkubationszeit betrug im Falle der UMUC-3- und VMCUB-1-Zellen 20 h und für die BFTC-905-Zellen 24 h.

Tabelle 16: Aussaat der UCC im Invasionsassay

	Zellzahl/Kammer	Aussaatvolumen in μl
BFTC-905	50.000	100
UMUC-3	30.000	100
VMCUB-1	30.000	100

Besaßen die UCC ein invasives Potential, konnten sie die Matrigelschicht vertikal durchdringen und auf die Unterseite der Membran gelangen, wo sie am darauffolgenden Tag im Zuge der Auswertung fixiert, mittels Kristallviolett färbung visualisiert und gezählt werden konnten. Hierfür wurden die Transwell-Einsätze zunächst mit einem Wattestäbchen von innen gereinigt, mit 4 °C kaltem PBS gespült und anschließend für 10 min in eiskaltem Methanol fixiert. Die Reinigung mit dem Wattestäbchen erfolgte nach jedem Färbeschritt. Danach erfolgte die Färbung der UCC mit Kristallviolett (1 %). Hierfür wurden die Transwelleinsätze für 25 min im Farbstoff eingelegt und bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Ungebundenes Kristallviolett wurde im Anschluss durch schonendes Waschen der Einsätze in Leitungswasser entfernt. Die Einsätze wurden danach für 25 min bei Raumtemperatur getrocknet. Mittels Einmalskalpell wurde die Membran der Einsätze entfernt, kurz in Xylol getaucht und auf dem Objektträger positioniert. Zum Einbetten und dauerhaften Abdecken der Membranen wurde DePeX-Mounting-Medium und ein Deckglas verwendet. Die invadierten UCC wurden mittels inversen Mikroskops bei einer 10-fachen Vergrößerung fotografiert. Jede Membran wurde an drei repräsentativen Stellen fotografiert, wobei die Werte im Zuge der Auswertung gemittelt worden sind. Die abschließende Zählung der invadierten UCC erfolgte mittels des Programms ImageJ Version 1.53.

3.4 Analyse der Zellviabilität

3.4.1 CellTiter Blue®-Assay

Der CellTiter Blue® Assay ermöglicht über die Ermittlung der metabolischen Kapazität einen Rückschluss auf die Zellzahl. Der Assay basiert auf der Fähigkeit der vitalen Zellen, den blauen Redoxfarbstoff Resazurin in den violetten Fluoreszenzfarbstoff Resorufin zu reduzieren. Das Fluoreszenzmaximum des Resorufins liegt bei $\lambda = 590$ nm. Diese Verstoffwechselung des Farbstoffes wird mittels Spektralphotometer Victor X erfasst und ist proportional zur Anzahl der vitalen Zellen.

3.4.2 Proliferationsanalyse

Mit dem CellTiter-Blue®-Assay wurde der Einfluss des KM auf das Proliferationsverhalten der UCC untersucht. Hierfür wurden die UCC nach dem Trypsinieren und Zentrifugieren gemäß dem Aussaatschema in Tabelle 17 auf eine 96-Well-Platte in 200 µl Medium ausgesät und anschließend für 72 h inkubiert. Es wurden die UCC, die in DMEM und solche, die in KM ausgesät wurden, verglichen. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Zellviabilität mittels CellTiter-Blue®-Assay analysiert. Hierfür wurde das Medium aus den Wells abgenommen und 200 µl des CellTiter-Blue®-Reagenz, welches zuvor 1:10 mit DMEM verdünnt wurde, in jedes Well pipettiert. Danach wurden die UCC für 2 h unter konstanten Bedingungen in Dunkelheit inkubiert. Abschließend wurde aus jedem Well 100 µl auf eine Mikrotiterplatte überführt und die Emission bei einer Wellenlänge von $\lambda = 573 \text{ nm}$ analysiert.

Tabelle 17: Aussaat der UCC im 96-Well-Format

	Zellzahl/Well	Aussaatvolumen in µl
BFTC-905	3.000	200
UMUC-3	2.500	200
VMCUB-1	2.500	300

3.4.3 Evaluation der Resistenzvermittlung durch KM

Um zu untersuchen, ob die parakrinen Botenstoffe der Osteoblasten eine resistenzfördernde Wirkung gegenüber Cisplatin vermitteln könnten, wurde ebenfalls eine Zellviabilitätsanalyse durchgeführt. Hierfür wurden die UCC wie in Tabelle 17 beschrieben ausgesät und für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Dabei wurde wieder zwischen zwei Gruppen unterschieden (DMEM und KM). Am Folgetag wurde das Medium abgenommen und Cisplatin in aufsteigenden Konzentrationen (0,4 µM – 16 µM) hinzugegeben. Die Inkubation der UCC wurde für 72 h fortgesetzt. Abschließend wurde mittels CellTiter®-Blue-Assay die Viabilität der UCC analysiert. Als Kontrolle dienten für beide Gruppen UCC, welche kein Cisplatin erhielten. Zusätzlich wurde in jeder der beiden Gruppen ein Blank mitgeführt, welches im Zuge der Auswertung von allen Ergebnissen subtrahiert wurde.

3.5 Behandlungsschema der Vorkonditionierung

Für die anschließenden Versuche wurden UCC verwendet, die 6 Tage im entsprechenden Medium (DMEM/KM) ausgesät und inkubiert worden waren. Diese UCC werden in den folgenden Abschnitten als „vorkonditionierte UCC“ bezeichnet. Dafür wurden die UCC wie in Tabelle 18 angegeben ausgesät. Nach 72 h erfolgte ein Mediumwechsel. Im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse, Western Blotting und PCR wurden ebenfalls UCC verwendet, welche mit 3 μ M Cisplatin vorbehandelt wurden. Hierfür wurden die UCC innerhalb der ersten 72 h zunächst in Medium ohne Cisplatinzusatz ausgesät. Nach 72 h erfolgte auch hier ein Mediumwechsel, allerdings war dem frischen Nährmedium 3 μ M Cisplatin beigefügt worden. Nach erneuten 72 h wurden die UCC für die weiteren Versuche genutzt.

Tabelle 18: Aussaatschema für Vorkonditionierung

	Zellzahl/Well	Aussaatvolumen in ml	Plattengröße
BFTC-905	100.000	2,5	6-Well
VMCUB-1	24.000	2,5	6-Well
UMUC-3	24.000	2,5	6-Well

3.6 Durchflusszytometrische Analysen

Im Rahmen dieses Dissertationsprojektes wurde der Einfluss des KM auf die Proteinexpression von PD-L1, PD-L2 und CD44 mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Hierfür wurden vorkonditionierte UCC verwendet. Nach 6 Tagen wurden die UCC mit PBS gewaschen, in frischem Medium resuspendiert und auf FACS-Röhrchen verteilt. Die UCC wurden dann für 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Es folgte die Aufnahme des Zellpellets in 3 ml Cellwash + 3 % FBS und eine erneute Zentrifugation, woraufhin der Überstand erneut ab- und die UCC in 50 μ l FBS aufgenommen wurden. Anschließend folgte eine Inkubation (5 min) im Eisbad. Nach der Inkubation wurden die in Tabelle 19 angegebenen Antikörper sanft dem Pellet zugemischt und die Inkubation wurde für 30 min im Eisbad im Dunkeln fortgesetzt. Die UCC wurden mit 4 ml Cellwash + 3 % FBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde in einem letzten Schritt der Überstand abgenommen und das Pellet in 200 μ l Cellwash + 3 % FBS aufgenommen. Alle genannten Schritte erfolgten auf Eiswasser.

Tabelle 19: Verwendete Antikörper sowie applizierte Menge und eingesetztes Fluorochrom

Antikörper	Menge	konjugiertes Fluorochrom
PD-L1	3 µl	FITC= Fluorescein-Isothiocyanat
PD-L2	15 µl	R-PE= R-Phycoerythrin
CD-44	3 µl	APC= Allophycocyanin

3.7 Immunzytochemische Färbung von Vimentin und E-Cadherin

Die Immunzytochemie ist eine Färbemethode, welche dem Nachweis von Antigenen in Gewebestrukturen mittels Antigen-Antikörper-Reaktion dient. Sie wird unter anderem zur Klassifizierung und Identifizierung von Tumoren angewandt und ist damit ein wesentlicher Bestandteil der Tumordiagnostik. Im Rahmen dieses Dissertationsprojektes wurde die Immunzytochemie angewandt, um den Einfluss des KM auf die Expression von Vimentin und E-Cadherin der UCC zu eruieren. Bei den untersuchten Antikörpern handelt es sich um Marker der EMT. E-Cadherin und Vimentin wurden mit PBSTA-Normal-Goat verdünnt. Die Verdünnungen entsprachen den genannten Herstellerangaben. Die zur Markierung der Zielproteine eingesetzten Antikörper, ihre Verdünnungen und die verwendeten Fluorochrome sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Verwendete Antikörper

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

3.7.1 Fixierung mit Roti®-Histofix (4 %)

Um eine immunzytochemische Färbung durchzuführen, wurden vorkonditionierte UCC verwendet. Nach 72 h Vorinkubation wurden die UCC in entsprechenden Zellzahlen (Tabelle 21) in 24-Well-Platten überführt, da die anschließende immunzytochemische Färbung direkt innerhalb der Wells durchgeführt wurde. Nach erneuten 72 h wurden die vorkonditionierten UCC innerhalb der Wells fixiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 500 µl Roti®-Histofix (4 %) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden zwei weitere Waschschrte mit PBS durchgeführt. Um ein Austrocknen der UCC bis zur Antikörperfärbung zu vermeiden, wurden diese in 1 ml/Well PBS bei 4 °C aufbewahrt. Für jede Färbung wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

Tabelle 21: Aussaatschema nach 72 h für immunzytochemische Färbung (24-Well-Platte)

	Zellzahl/Well	Aussaatvolumen in mL
BFTC-905	18.000	1
VMCUB-1	9.500	1
UMUC-3	9.500	1

3.7.2 Antikörperfärbung

Zunächst wurde das PBS abgenommen. Die UCC wurden mit 200 µl der Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Hierfür wurden die Antikörper E-Cadherin und Vimentin in PBSTA-Normal-Goat wie zuvor beschrieben verdünnt. Am darauffolgenden Tag wurden die UCC zweifach mit PBS gespült und anschließend für 45 min mit der Anti-Rabbit-IgG-Biotin-PBSTA-Lösung, welche den Sekundärantikörper enthielt, bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt diente der Bindung an den Primärantikörper. Danach wurden die UCC erneut zweifach mit PBS gewaschen. Um die Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper nachzuweisen, wurde das Fluorochrom Streptavidin, welches eine starke nicht-kovalente Bindung mit Biotin eingeht, 1:100 in PBS verdünnt. Streptavidin-Alexa 488 wurde zum Nachweis von Vimentin und Streptavidin-Alexa 594 zum Nachweis von E-Cadherin verwendet. 200 µl der Streptavidin-PBS-Lösung (1 %) wurden in jedes Well pipettiert und die Inkubation wurde für 45 min fortgesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die UCC zweifach mit PBS gewaschen und daraufhin eine Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt. DAPI wurde hierfür 1:1.000 in Aqua dest. verdünnt und 200 µl der Lösung wurden für 10 min zu den UCC gegeben. Es folgten zwei weitere Waschschrte, bevor die Tumorzellen abschließend mit dem Eindeckmedium FluoroMount bedeckt worden sind. Bis zur Aufnahme der fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden die UCC bei 4 °C gelagert. Die Bilder wurden mittels inversen Fluoreszenzmikroskops bei einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen. Sowohl die Antikörper- als auch die Kernfärbungen wurden mikroskopisch analysiert und übereinander gelagert (Merge).

3.8 Western-Blot-Analysen der UCC

3.8.1 Präparation von Proteinlysaten

Um den Einfluss des KM auf die Expression der in Tabelle 23 genannten Proteine zu eruieren, wurden vorkonditionierte UCC mit und ohne 3 μM Cisplatinzusatz analysiert. Nach der sechstägigen Vorbehandlung wurden die UCC trypsinisiert, das Zellpellet in einer der Pelletgröße entsprechenden Menge RIPA-Puffer (40 – 70 μl) aufgenommen und in ein Eppli überführt, welches bis zur Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde.

3.8.2 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

Für den kolorimetrischen Nachweis und die Quantifizierung des Gesamtproteins des Lysats wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit verwendet, welches auf der Bradford-Methode basiert. Die Peptidbindungen der Proteine reduzieren das im BCA-Working-Reagent enthaltene Cu^{2+} im alkalischen Medium zu Cu^{1+} . Der Assay basiert auf der Fähigkeit der Bicinchoninsäure (BCA) gemeinsam mit den einwertigen Kupferionen einen purpurfarbenen Chelatkomplex zu bilden, welcher photometrisch bei $\lambda = 562\text{ nm}$ quantifiziert werden kann.

Um die Proteinquantifizierung durchführen zu können, wurden die UCC zunächst mittels Sonifikation (10 Impulse, 80 % Amplitude, Cycle 0,5 s) lysiert. Die kolorimetrische Messung der Proteinmenge wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung auf einen Proteinstandard mit bekannter Konzentration kalibriert. Hierfür wurden die Proben zunächst 1:6 mit PBS verdünnt. 10 μl der zu analysierenden Proben und der aufsteigenden Verdünnungsstufen des Standards (Tabelle 22) wurden in Duplets in eine 96-Well-Platte gegeben. Jedem Well wurden 200 μl des BCA Working Reagents (Biocinonsäure + 4 % Kupfersulfat im Verhältnis 50:1) zugefügt. Die Platte wurde für 30 s auf dem Schüttler platziert, bevor sie mit einer Folie verschlossen und für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wärmeschrank inkubiert wurde. Mittels Multiplatten-Spektralphotometer wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562\text{ nm}$ gemessen. Mit den gemessenen Werten der BSA-Standardreihe wurde eine Regressionsgerade erstellt, die zur abschließenden Bestimmung der Proteinmenge der entsprechenden Proben diene.

Tabelle 22: Pipettierschema des BSA-Standards

Konzentration (µg/µl)	Probe	BSA-Standard (µl)	PBS oder RIPA (µl)
2,0	A	300	0
1,5	B	375	125
1,0	C	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	H	100 von G	400
0 = BLANK	I	0	400

3.8.3 Probenvorbereitung und SDS-PAGE

Mit Hilfe der errechneten Proteinkonzentration wurde die für die WB-Analyse benötigte Menge an Protein und die einzusetzende Menge Aqua dest. bestimmt. Diese wurden in Eppis vorgelegt und mit 4 µl Laemmli-Puffer (inklusive β -Mercaptoethanol (β -ME)) versetzt. Die Proben wurden für 2 min bei 13.800 g zentrifugiert, dann für 5 min bei 95 °C hitzedenaturiert und im Anschluss sofort auf Eis inkubiert. Durch die Hitzedenaturierung werden Wasserstoffbrücken aufgebrochen, sodass Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstört werden. Dies gewährleistet, dass die Proteine abhängig von ihrer Molekülgröße elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Das β -ME fungiert als Reduktionsmittel und spaltet die Schwefelbrücken. Zusätzlich dient das im Laemmli-Puffer enthaltene anionische Detergens Natriumlaurylsulfat (SDS) dazu, die Eigenladung der Proteine zu überlagern, wodurch gleichmäßig negativ geladene Komplexe entstehen, deren Laufgeschwindigkeit durch das Polyacrylamidgel dann von der Molekülgröße bestimmt wird. Im nächsten Schritt wurden die Proteingemische gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurden bereits vorgefertigte Polyacrylamidgele (Mini-Protean TGX Stain-Free Gels 4–15 %) der Firma Bio-Rad verwendet. Diese wurden in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt, welche danach bis zu den Markierungen mit Laufpuffer befüllt wurde. 14 µl der Proben wurden in die Taschen der Gele pipettiert. Um im Zuge der abschließenden Auswertung das Molekulargewicht exakt ermitteln zu können, wurde 6 µl eines Proteinmarkers aus dem ROTI®Mark WESTERN-Set der Firma Carl Roth in die erste Tasche aufgetragen. Die Gelkammern wurden verschlossen und durch das Anlegen von zunächst 60 V Spannung

konnten die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Sobald die Proteine durch das Sammelgel gewandert waren, wurde die Spannung auf 110–150 V erhöht. Hierbei wandern kleine Proteine schneller durch die engmaschige Matrix der Polyacrylamidgele. Nach dem Auslaufen des Laufpuffers wurde der Durchlauf gestoppt. Um bei der späteren Auswertung die Proben auf das Totalprotein normalisieren zu können, wurde das Stain-Free-Gel nach dem Gellauf mit dem Gel-Dokumentationssystem ChemiDoc MP aufgenommen.

3.8.4 Blotting

Für den anschließenden Transfer wurde ein sogenanntes Sandwich aus 1 × 2,5 mm Blotting-Papier, Gel, Nitrocellulose-Membran und abschließend wieder 1 × 2,5 mm Blotting-Papier in die Blotkammer, zwischen Kathode und Anode, für 10 min bei 2,5 A platziert. Hierbei wurden die Proteine auf die Membran übertragen. Das verwendete Blotting-Papier sowie die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurden vor dem Transfer mit Blotting-Puffer befeuchtet.

3.8.5 Blocken der Membran und Immunmarkierung

Nach dem Transfer wurden die Blots mit PBS gewaschen und anschließend die Immunmarkierung durchgeführt. Hierfür wurden die Blots zunächst mit der Blockierlösung (TBS/0,1 % Tween 20 (TBS/T) + 5 % Milchkpulver) überschichtet und für 1 h auf dem Rollentaumler bei Raumtemperatur positioniert. Das Blocken dient dazu, die freien Bindungsstellen zu sättigen, um unspezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen zu verhindern. In einem nächsten Schritt wurden die Membranen, nachdem die Blockierlösung dekantiert wurde, über Nacht lichtgeschützt bei 4 °C auf einem Rollentaumler mit dem Primärantikörper inkubiert. Dieser wurde gemäß der Herstellerangaben in 3 ml TBS/T + BSA verdünnt (Tabelle 23). Am Folgetag wurden die Blots dreimal mit dem Waschpuffer (TBS-T) gewaschen und daraufhin mit dem verdünnten Sekundärantikörper (Tabelle 23) für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln auf einem Rollentaumler inkubiert. Drei weitere Waschschrte mit TBS-T wurden durchgeführt.

3.8.6 Detektion der Banden und Auswertung

Bevor die Detektion der Banden mittels ChemiDoc MP durchgeführt wurde, wurden die Blots in einem letzten Schritt mit der Entwicklerlösung (Chemilumineszenz-Substrat Immobilon®-Forte) inkubiert. Die Auswertung der relativen Expression der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der Software ImageLab (Version 6.1.0).

Tabelle 23: Verwendete Antikörper im Rahmen des Western Blot Semi-Dry Blotting

Primärantikörper	Verdünnung (in TBS/T + BSA)
SMAD4	1:2.000
CXCR4	1:1.000
E-Cadherin	1:1.000
Vimentin	1:1.000
α -SMA	1:4.000
Sekundärantikörper	Verdünnung (in TBS/T)
Richtet sich gegen die Spezies des Primärantikörpers	1:5.000

3.9 PAI-1 ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ermöglicht mittels spezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen den Nachweis bestimmter Proteine. Mittels Human Serpin E1/PAI-1-Quantikine-ELISA-Kit der Firma R&D Systems wurde die Expression des Proteins PAI-1 in den Überständen der vorkonditionierten UCC analysiert. Die UCC wurden hierfür zunächst wie im Schema der Vorkonditionierung beschrieben ausgesät. Nach 72 h wurden die Überstände abgenommen, in 500 μ l aliquotiert und bei -80°C gelagert. Alle verwendeten Materialien und Lösungen sowie die Schritte der Versuchsdurchführung erfolgten entsprechend der Herstellerangaben. Die Messung der optischen Dichte wurde mittels Multiplatten-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450\text{ nm}$ durchgeführt. Insgesamt wurde der Einfluss von 3 KM-Gesamtpools ($n = 3$) auf die PAI-1-Proteinexpression der UCC analysiert.

3.10 PCR-Analyse der Proteine Bcl-2, Bcl-XL, CK14 und E-Cadherin

3.10.1 Vorbehandlung der UCC

Die UCC wurden gemäß dem Schema der Vorkonditionierung ausgesät. Es wurden sowohl UCC ohne als auch mit 3 μM Cisplatin-Zusatz molekularbiologisch analysiert. Nach der 6-tägigen Vorbehandlung wurde das Zellpellet in 700 μ l RLT-Puffer mit β -ME (1 %) aufgenommen und bis zur Durchführung der RNA-Isolierung bei -80°C gelagert.

Ziel der PCR-Analyse war es, den Einfluss des KM auf die mRNA-Expression von Bcl-2, Bcl-XL, CK14 und E-Cadherin zu untersuchen.

3.10.2 RNA-Isolierung mit RNeasy-MINI-KIT (Qiagen) und DNase-Verdau

Die RNA-Isolierung wurde mithilfe des RNA-Isolationskits (RNeasy Mini Kit von Qiagen) gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Um eine Verunreinigung der RNA durch DNA zu verhindern, wurde zusätzlich ein Desoxyribonuklease (DNase)-Verdau mittels RNase-free-DNase-Set von Qiagen durchgeführt.

3.10.3 RNA-Messung im Spektralphotometer

Nach Durchführung der Isolierung erfolgte die RNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mittels Mikrovolumen-Spektralphotometer Nano-Drop 2000. Hierbei wurden 1–1,5 µl je Probe auf den Sockel pipettiert. Die Bestimmung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$. Als Indikator der Proteinverunreinigung wurde das Absorptionsverhältnis 260/280 herangezogen, wobei der Quotient bei 1,8–2,2 liegen sollte (Desjardins and Conklin, 2010). Als Blank wurde RNase-freies Wasser verwendet.

3.10.4 Transkription der RNA in cDNA

Um die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchführen zu können, musste zunächst die reverse Transkription der Total-RNA in komplementäre DNA (cDNA) stattfinden. Hierfür wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet. Die Transkription wurde entsprechend der Anleitung des Protokolls durchgeführt. Nachdem zu der RNA die reverse Transkriptase (RT), der RT-Puffer und die RT-Primer hinzugefügt wurden, wurde die Reverse Transkription für 30 min gestartet. Im Anschluss wurden die cDNA-Proben bis zur Durchführung der qPCR bei -20°C eingefroren und gelagert.

3.10.4.1 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Die PCR ermöglicht die enzymatische Vervielfachung bestimmter Nukleotidsequenzen, indem die Ausgangs-DNA in mehreren zyklischen Durchläufen exponentiell repliziert wird. Zur Durchführung der qRT-PCR wurde das StepOne Real-Time PCR System (48-Well) unter Verwendung des PowerUp™ SYBR®-Green Master Mix eingesetzt. Bei SYBR-Green handelt es sich um einen Cyanin-Farbstoff, welcher in die DNA interkaliert und gemeinsam mit der doppelsträngigen DNA einen Fluoreszenzfarbstoff-Komplex bildet, welcher sich im Rahmen der PCR-Zyklen anreichert. Für die Durchführung der RT-qPCR wird 1 µl der cDNA in einer gekühlten 48-well Mikrotiterplatte vorgelegt. Zu der cDNA wurden 12,5 µl des PowerUp™ SYBR-Green Master-Mix hinzugegeben, welcher unter anderem die für die PCR notwendige DNA-Polymerase, die Desoxynukleosidtriphosphate

(dNTPs) und Puffer beinhaltet. Durch Zugabe von jeweils 1 µl der entsprechenden Vorwärts- (*Primer forward*) (10 pmol/µl) und Rückwärts-Oligonukleotidprimer (*Primer reverse*) (10 pmol/µl) und 10,5 µl RNase-freien Wassers, erhält man einen Reaktionsansatz von 26 µl. Als Negativkontrolle wurde bei der PCR ein Reaktionsansatz mit den entsprechenden Primern ohne Zugabe der cDNA mitgeführt. Die verwendeten Temperaturzyklen, deren Dauer sowie die jeweiligen Aufgaben der einzelnen Phasen sind in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Phasen des Fast-Cycling-Mode Dargestellt sind für jede Phase des Amplifikationsmodus die entsprechenden Temperaturbedingungen, Zeitdauern, Zykluszahlen sowie deren funktionelle Bedeutung im Rahmen der qRT-PCR-Analyse.

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklus	Aufgabe
UDG-Aktivierung	50 °C	2 min	Hold	UDG ist ein Enzym, das im Reaktionsgemisch entstehende Varianten abbaut.
Dual-Lock™ DNA-Polymerase Aktivierung	95 °C	2 min	Hold	Die DNA-Polymerase synthetisiert an Primer-DNA-Hybriden einen Tochterstrang, der dem Matrizenstrang komplementär ist.
Denaturierung Anlagerung	95 °C 60 °C AT	15 s 1 min	40	In 40 Zyklen erfolgt die Amplifikation des Genprodukts und die fortlaufende Messung der Intensität des Fluoreszenzsignals.
Schmelzkurve	95 °C 60 °C 95 °C 95 °C	15 s 1 min 15 s	Hold Hold Cont	Die Schmelzkurve wird zur Erkennung verschiedener Amplifikate im Reaktionsgemisch verwendet.

¹UDG = Uracil-DNA-Glykosylase, ²Hold = Konstante Haltung einer Temperaturstufe, ³AT = Annealing-Temperatur, ⁴Cont = die Temperatur erhöht sich kontinuierlich zwischen zwei Temperaturniveaus mit einem Anstieg von 20 %.

3.11 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der durchgeführten Zellexperimente wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 8.3.1 auf statistische Signifikanz, welche bei einem p-Wert $< 0,05$ (*) angenommen wurde, überprüft. Im Folgenden werden sehr signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert von $< 0,01$ mit (**) und höchstsignifikante Ergebnisse mit einem p-Wert von $< 0,001$ mit (***) angegeben. Nicht signifikante Ergebnisse sind ohne Markierung versehen. Mittels Zweistichproben t-test wurden die Mittelwerte zweier Gruppen miteinander verglichen (DMEM vs. KM). Die mehrfaktorielle Varianzanalyse wurde verwendet, um mehrere Gruppen miteinander zu vergleichen (KM + Cisplatin-Zusatz im Vergleich zu DMEM + Cisplatin-Zusatz).

4 Ergebnisse

4.1 Grundlagen

Um der Frage nachzugehen, inwiefern humane Osteoblasten aus osteoporotischem Knochengewebe die Tumorprogression der UCC beeinflussen, wurde ein KM erstellt, welches im Rahmen der Versuchsansätze zur Behandlung der muskelinvasiven UCC BFTC-905, VMCUB-1 und UMUC-3 eingesetzt wurde. Das KM wurde genutzt, um den Einfluss von sezernierten Proteinen der osteoporotischen Osteoblasten auf tumorrelevante Faktoren der UCC analysieren zu können. Die Herstellung des KM wird in Abschnitt 3.2.2 genauer beschrieben. Insgesamt wurden 11 Spenderpools, bestehend aus den Passagen P2–P5 erstellt, welche in den folgenden Abschnitten als „KM“ bezeichnet werden. Je ein Spenderpool wird als ein „n“ angegeben. In einigen Versuchsansätzen wurden die UCC über einen verlängerten Zeitraum mit dem KM behandelt, um den Einfluss des KM über einen größeren Inkubationszeitraum beurteilen zu können. Das Schema dieser Vorkonditionierung wurde in Abschnitt 3.5 genauer erläutert. Im Fokus der Untersuchungen dieser Forschungsarbeit lagen insbesondere die Evaluation der Migration, Invasion und EMT. Zusätzlich wurde analysiert, ob parakrine Faktoren der Osteoblasten den UCC dazu verhelfen, Resistenzen gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin zu entwickeln, und ob diese Faktoren in der Lage sind, apoptoserelevante Parameter in den UCC zu modulieren. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sie zur Immunevasion beitragen. In den nachfolgenden Abbildungen werden der Mittelwert und die Standardabweichung (SD), welche jeweils auf die entsprechende DMEM-Kontrolle normiert wurde, dargestellt.

4.2 Einfluss von KM auf die Proliferation

Um die Auswirkungen der löslichen Faktoren des KM auf die Proliferation der UCC zu eruieren, wurden die UCC entweder in DMEM (DMEM-Kontrolle) oder in KM inkubiert und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Anhand von Abb. 2 ist erkennbar, dass die relative Zellzahl der BFTC-905-Zellen durch den Einfluss des KM um das 6-Fache im Vergleich zur DMEM-Kontrolle signifikant gefördert wurde.

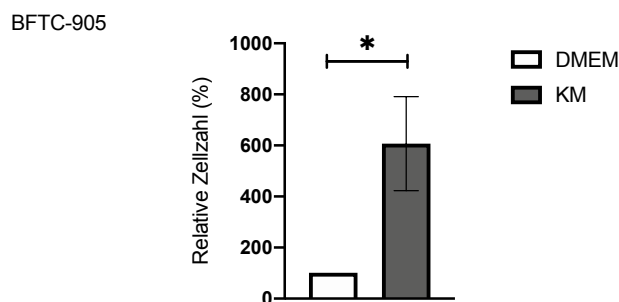


Abb. 2: Auswirkung des KM auf die Proliferation der BFTC-905-Zellen. Die Inkubation der BFTC-905-Zellen mit KM hatte einen signifikanten proliferationsfördernden Effekt. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 8, 8 technische Replikate).

Abb. 3 präsentiert das Proliferationsverhalten der UMUC-3-Zellen. Hierbei hatte das KM keinen proliferationsfördernden Effekt auf die UMUC-3-Zellen.

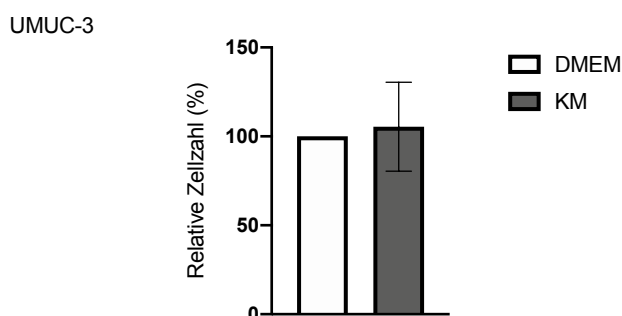


Abb. 3: Auswirkung des KM auf die Proliferation der UMUC-3-Zellen. Die Inkubation der UMUC-3-Zellen mit KM hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 8, 8 technische Replikate).

Im Falle der VMCUB-1-Zellen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied der relativen Zellzahl durch den Einfluss des Osteoblasten-KM ermittelt werden (Abb. 4).

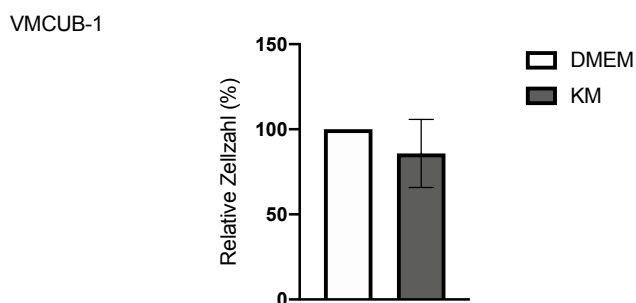


Abb. 4: Auswirkung des KM auf die Proliferation der VMCUB-1-Zellen. Die Inkubation der VMCUB-1-Zellen mit KM hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 8, 8 technische Replikate).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich die untersuchten UCC unterschiedlich in Bezug auf ihr Proliferationsvermögen durch den Einfluss des Osteoblasten-KM verhalten. Wobei für die BFTC-905-Zellen ein signifikanter Anstieg der Zellzahl durch das KM demonstriert werden konnte.

4.3 Frage nach eventuellem Nährstoffmangel

Nachfolgend sollte die Frage beantwortet werden, ob und inwiefern notwendige Nährstoffe in dem KM bereits durch die vorhergehende Inkubation mit den Osteoblasten verbraucht wurden. Deswegen wurde dem KM 3 % FBS zugesetzt und die Proliferation der UCC reevaluiert.

In Abb. 5 sind die Ergebnisse der Nährstoffmangel-Untersuchung der BFTC-905-Zellen dargestellt. Hierbei war ein signifikanter Anstieg der Zellzahl durch den Zusatz von 3 % FBS festzustellen.

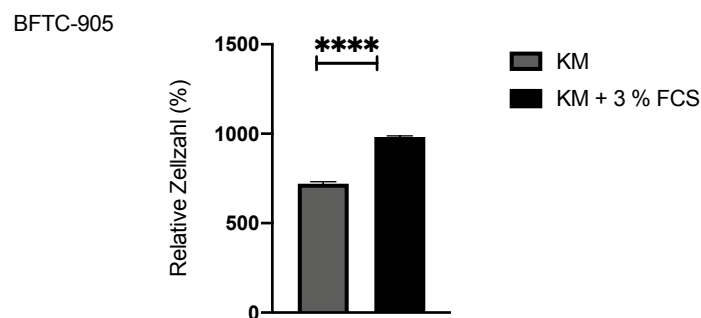


Abb. 5: Untersuchung eines eventuellen Nährstoffmangels der BFTC-905-Zellen. Der Zusatz von 3 % FBS zum KM führte im Falle der BFTC-905-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der relativen Zellzahl. Aufgetragen sind der jeweilige Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 2, 4 technische Replikate).

Der Zusatz von 3 % FBS hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl der UMUC-3-Zellen (Abb. 6).

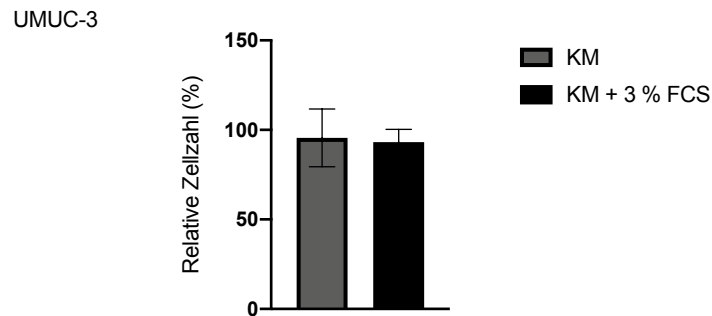


Abb. 6: Untersuchung eines eventuellen Nährstoffmangels der UMUC-3-Zellen. Der Zusatz von 3 % FBS zum KM führte im Falle der UMUC-3-Zellen zu keiner signifikanten Änderung der relativen Zellzahl. Aufgetragen sind der jeweilige Mittelwert + SD, welche auf die entsprechende DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 2, 4 technische Replikate).

Ähnlich wie bei den BFTC-905-Zellen konnte im Falle der VMCUB-1-Zellen ebenfalls eine signifikante Steigerung der Proliferation durch den Zusatz von 3 % FBS beobachtet werden (Abb. 7).

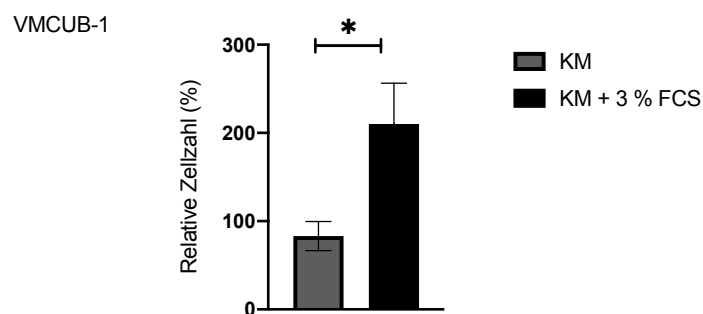


Abb. 7: Untersuchung eines eventuellen Nährstoffmangels der VMCUB-1-Zellen. Der Zusatz von 3 % FBS zum KM führte im Falle der VMCUB-1-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der relativen Zellzahl. Aufgetragen sind der jeweilige Mittelwert + SD, welche auf eine DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 2, 4 technische Replikate).

4.4 Einfluss des KM auf die Migration der UCC

Ob und inwiefern humane Osteoblasten die Migration der UCC beeinflussen, wurde über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 10 h bzw. im Falle der BFTC-905-Zellen bis zu 12 h eruiert. Hierfür wurden repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der migrierten Zellen angefertigt (A), welche graphisch über den entsprechenden Beobachtungszeitraum durch die Bestimmung des zunehmend konfluenten Zellrasens dargestellt werden (B). Gezeigt werden die Mittelwerte + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle nach 10 h normiert wurden. Bei den BFTC-905-Zellen ist sowohl lichtmikroskopisch als auch graphisch erkennbar, dass das KM eine migrationsfördernde Wirkung auf die Tumorzelllinie ausübte (Abb. 8). So zeigte sich ab 8 h zu jedem weiteren untersuchten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied von etwa 20 %.

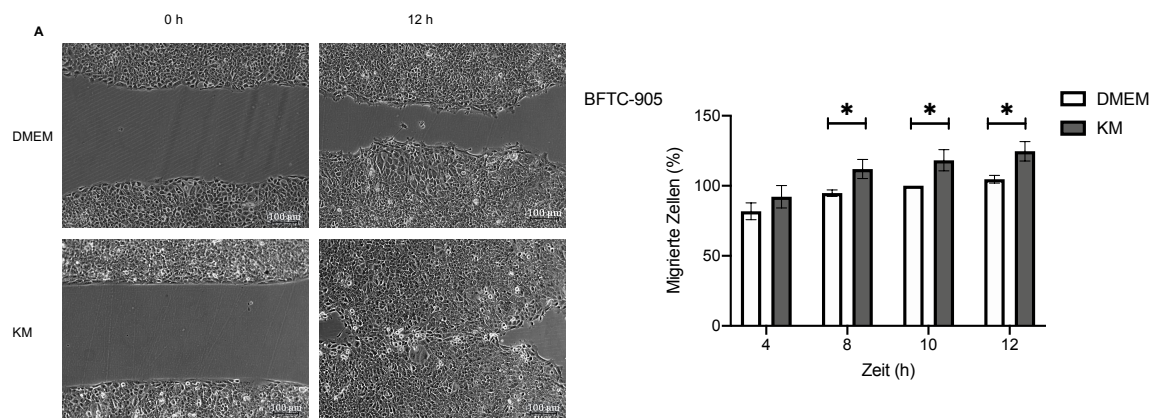


Abb. 8: Migrationsanalyse der BFTC-905-Zellen. (A) Es sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen zu Beginn der Migrationsanalyse (0 h) und nach 12 h dargestellt. (B) Graphisch ist die Anzahl an migrierten Zellen in % zu den jeweiligen Messzeitpunkten abgebildet. Lichtmikroskopisch lässt sich erkennen, dass die Migration der BFTC-905-Zellen durch den Einfluss des KM gefördert wurde. Das KM übte nach 8 h, 10 h und 12 h einen signifikanten migrationsfördernden Effekt auf die BFTC-905-Zellen aus. Gezeigt werden die Mittelwerte + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle nach 10 h normiert wurden. 10 × Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm (n = 7).

Eine migrationsfördernde Wirkung des Osteoblasten-KM konnte bei den UMUC-3-Zellen nicht nachgewiesen werden. Ihre migratorische Kapazität blieb unverändert (Abb. 9).

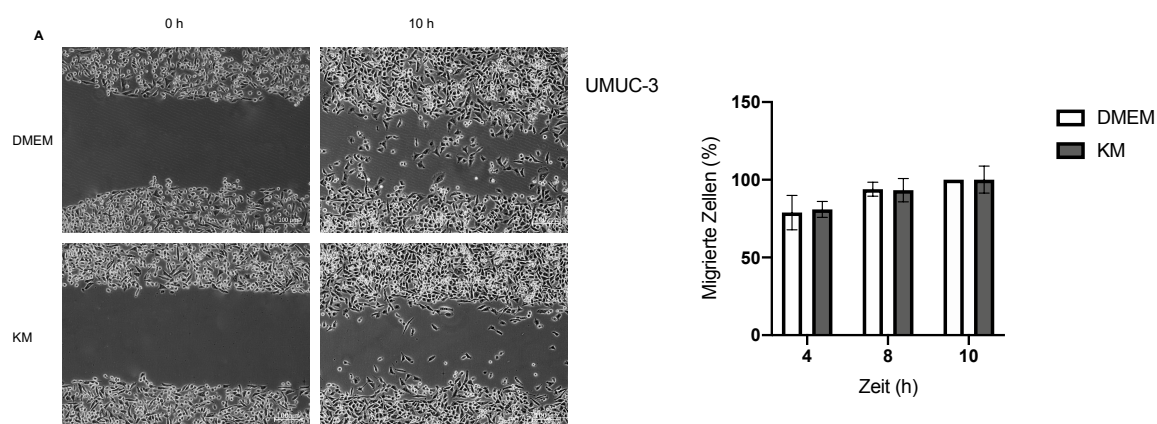


Abb. 9: Migrationsanalyse der UMUC-3-Zellen. (A) Es sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen zu Beginn der Migrationsanalyse (0 h) und nach 10 h dargestellt. (B) Graphisch ist die Anzahl an migrierten Zellen in % zu den jeweiligen Messzeitpunkten abgebildet. Im Falle der UMUC-3-Zellen konnte kein migrationsfördernder Effekt des KM im Vergleich zur DMEM-Kontrolle vermerkt werden. Gezeigt werden die Mittelwerte + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle nach 10 h normiert wurden. 10 × Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm (n = 8).

Für die VMCUB-1-Zellen zeigte sich, dass die Inkubation mit dem Osteoblasten-KM zu allen untersuchten Zeitpunkten einen signifikant migrationsfördernden Effekt im Vergleich zur DMEM-Kontrolle aufwies (Abb. 10 B). Am Ende des Beobachtungszeitraumes betrug dieser Unterschied 24 % ($p < 0,001$) und ließ sich lichtmikroskopisch anhand eines nahezu konfluenten Zellrasens erkennen (Abb. 10 A).

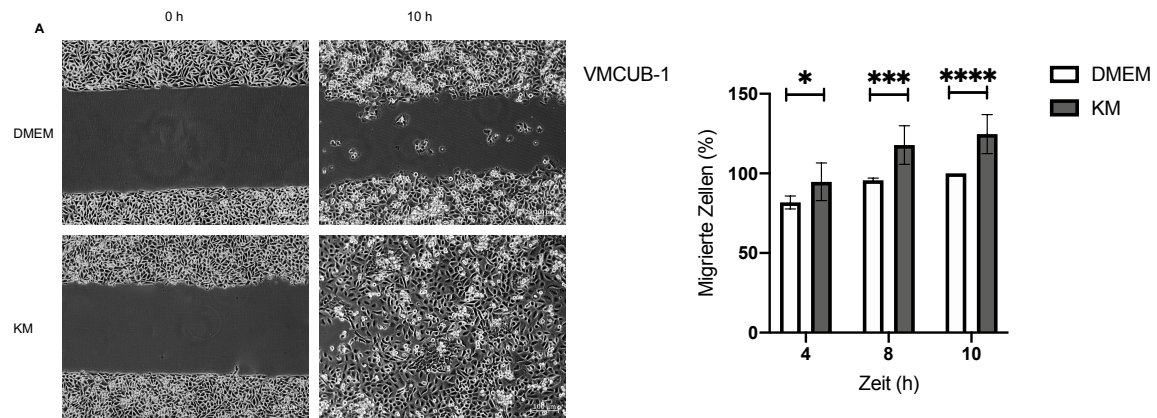


Abb. 10: Migrationsanalyse der VMCUB-1-Zellen. (A) Es sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen zu Beginn der Migrationsanalyse (0 h) und nach 10 h dargestellt. (B) Graphisch ist die Anzahl an migrierten Zellen in % zu den jeweiligen Messzeitpunkten abgebildet. Lichtmikroskopisch lässt sich erkennen, dass nach 10 h im KM nahezu keine zellfreie Fläche mehr vorhanden ist. Das KM übte einen signifikanten migrationsfördernden Effekt auf die VMCUB-1-Zellen aus. Gezeigt werden die Mittelwerte + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle nach 10 h normiert wurden. 10 × Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 100 µm (n = 8).

4.5 Einfluss von KM auf die Invasivität

Der Einfluss des KM auf die Invasivität der UCC wurde in zwei Experimenten untersucht. Zum einen wurde mittels Chemotaxisanalyse der direkte Einfluss parakriner Signalmediatoren der Osteoblasten auf die invasive Kapazität der UCC untersucht und fotodokumentiert. Zusätzlich wurde die Expression des membranständigen Hyaluronsäure-Rezeptors CD44, welcher eine zentrale Funktion bei der Zellmigration, Invasion und Metastasierung übernimmt, durchflusszytometrisch analysiert.

4.5.1 Funktionelle Invasionsanalyse

Für alle drei untersuchten UCC konnte durch den Einfluss des KM ein signifikanter Anstieg der invadierten Zellen festgestellt werden. Im Folgenden werden exemplarisch lichtmikroskopische Bildaufnahmen der invadierten Membranen (A) sowie die dazugehörige Grafik (B) dargestellt. Die Inkubation der BFTC-905-Zellen mit dem Osteoblasten-KM führte zu einer signifikanten 4,9-fachen Erhöhung der invadierten Zellen im KM gegenüber der DMEM-Kontrolle (Abb. 11 B) ($p < 0,001$).

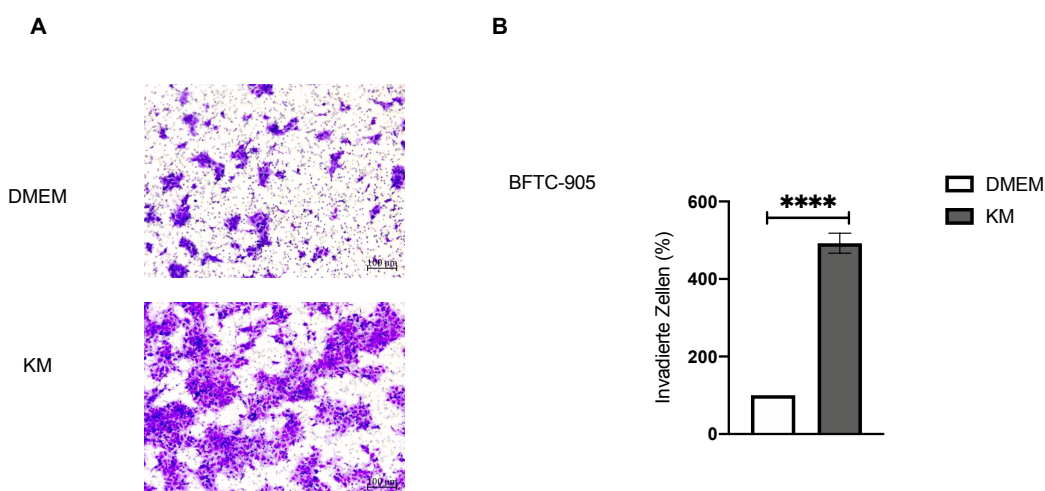


Abb. 11: Einfluss des KM auf die Invasion der BFTC-905-Zellen. (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen der Membranen. Hier sind die invadierten BFTC-905-Zellen entsprechend der Behandlung mit KM oder DMEM visualisiert. Hierbei ist ein invasionsfördernder Effekt des KM auf die BFTC-905-Zellen deutlich sichtbar. (B) Dargestellt ist der Einfluss des KM auf das Invasionsverhalten der BFTC-905-Zellen (Mittelwert + SD), normiert auf die DMEM-Kontrolle. Der Einfluss des KM bewirkte einen signifikanten Anstieg der invadierten Zellen (B). Inkubationszeit: 24 h, Kristallviolett-Färbung, Maßstabsbalken 100 µm, die invadierten Zellen wurden mittels inversen Mikroskops bei einer 10 × Vergrößerung fotografiert (n = 7, 4 technische Replikate).

Ein solch invasionsfördernder Effekt war auch im Falle der UMUC-3-Zellen zu beobachten (Abb. 12). Dieser Effekt ist lichtmikroskopisch durch die Zunahme der invadierten Zellen auf der Membran zu erkennen (A) sowie graphisch in einer signifikanten 2,1-fachen Zunahme der invadierten Zellen im KM gegenüber der DMEM-Kontrolle festzuhalten (B) ($p < 0,001$).

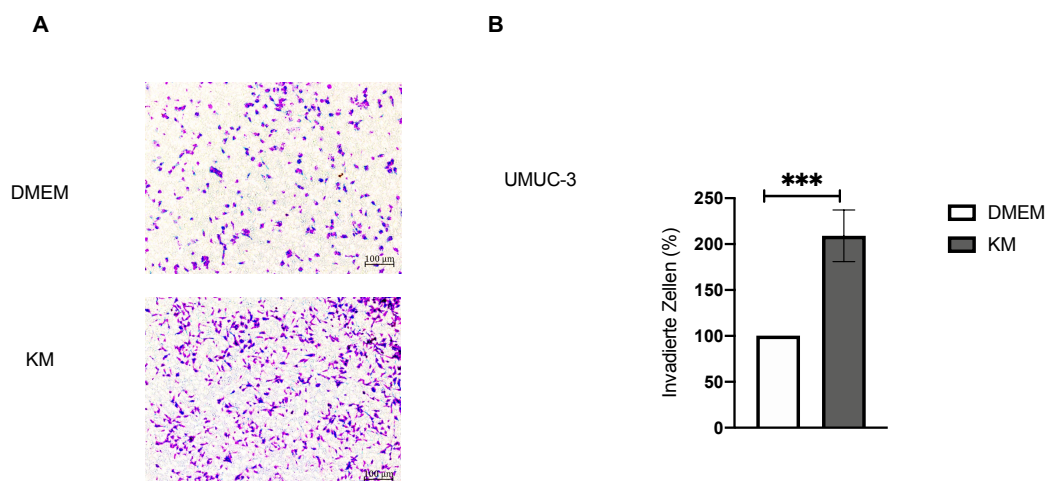


Abb. 12: Einfluss des KM auf das Invasionsverhalten der UMUC-3-Zellen. (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen der Membranen. Hier sind die invadierten UMUC-3-Zellen entsprechend der Behandlung mit KM oder DMEM visualisiert. Hierbei ist ein invasionsfördernder Effekt des KM auf die UMUC-3-Zellen deutlich sichtbar. (B) Dargestellt ist der Einfluss des KM auf das Invasionsverhalten der UMUC-3-Zellen (Mittelwert + SD), normiert auf die DMEM-Kontrolle. Der Einfluss des KM bewirkte einen signifikanten Anstieg der invadierten Zellen. Inkubationszeit: 20 h, Maßstabsbalken 100 µm, die invadierten Zellen wurden mittels inversen Mikroskops bei einer 10 × Vergrößerung fotografiert (n = 4, 4 technische Replikate).

Auch das Invasionspotential der VMCUB-1-Zellen wurde durch den Einfluss des KM signifikant gesteigert (Abb. 13). Hierbei waren im Osteoblasten-KM ebenfalls mehr invadierte VMCUB-1-Zellen auf der Membran zu erkennen als in der DMEM-Kontrolle (A). Die Invasivität der VMCUB-1-Zellen war durch den Einfluss des KM 2,1-fach höher (B, $p < 0,001$).

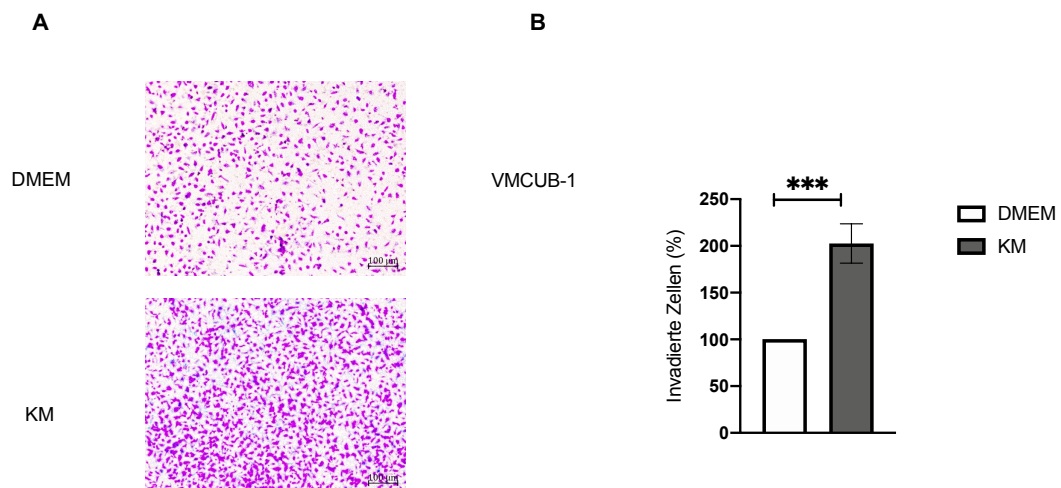


Abb. 13: Einfluss des KM auf das Invasionsverhalten der VMCUB-1-Zellen. (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen der Membranen. Hier sind die invadierten VMCUB-1-Zellen entsprechend der Behandlung mit KM oder DMEM visualisiert. Hierbei ist ein invasionsfördernder Effekt des KM auf die VMCUB-1-Zellen deutlich sichtbar. (B) Dargestellt ist der Einfluss des KM auf das Invasionsverhalten der VMCUB-1-Zellen (Mittelwert + SD), normiert auf die DMEM-Kontrolle. Der Einfluss des KM bewirkte einen signifikanten Anstieg der invadierten Zellen. Inkubationszeit: 20 h, Kristallviolett-Färbung, Maßstabbalken 100 µm, die invadierten Zellen wurden mittels inversen Mikroskops bei einer 10 × Vergrößerung fotografiert (n = 6, 4 technische Replikate).

4.5.2 Einfluss von KM auf die CD44-Expression

Inwiefern das KM der osteoporotischen Osteoblasten die CD44-Expression der UCC beeinflusst, wurde im Rahmen durchflusszytometrischer Analysen eruiert. Hierfür wurden die Tumorzellen nach dem Schema in Tabelle 18 vorkonditioniert.

Die Inkubation im Osteoblasten-KM übte auf die BFTC-905-Zellen zwar tendenziell einen Anstieg im CD44-Expressionsniveau aus, jedoch stellte sich dieser im Zuge der statistischen Auswertung als nicht signifikant heraus (Abb. 14).

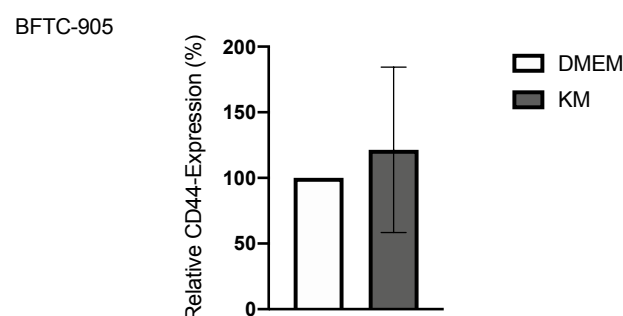


Abb. 14: Relative CD44-Expression der vorkonditionierten BFTC-905-Zellen. Es konnte kein signifikanter Einfluss des Osteoblasten-KM auf das CD44-Expressionsniveau der BFTC-905-Zellen detektiert werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 4).

Auch bei den UMUC-3-Zellen konnte durch den Einfluss des Osteoblasten-KM kein Unterschied im CD44-Expressionsniveau festgestellt werden (Abb. 15).

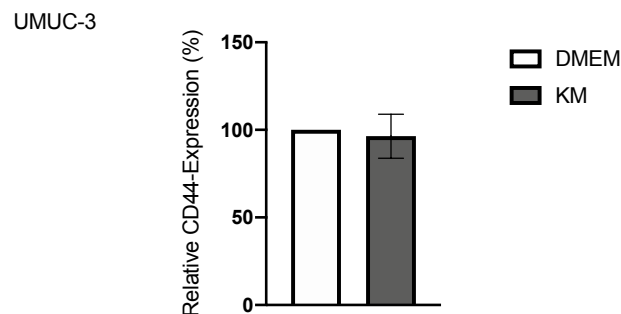


Abb. 15: Relative CD44-Expression der vorkonditionierten UMUC-3-Zellen. Es konnte kein signifikanter Einfluss des Osteoblasten-KM auf das CD44-Expressionsniveau der UMUC-3-Zellen detektiert werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 7).

Im Falle der VMCUB-1-Zellen führte die Vorkonditionierung mit KM zu einer signifikanten 1,6-fachen Steigerung der CD44-Expression im Vergleich zur DMEM-Kontrolle (Abb. 16).

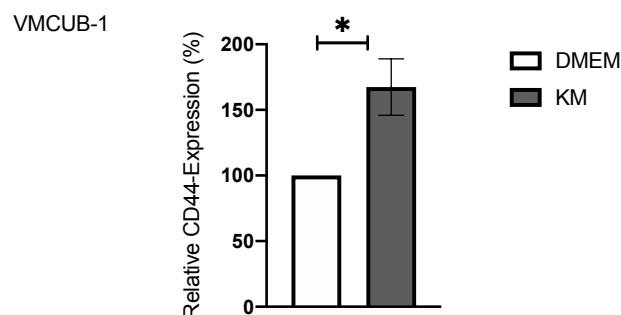


Abb. 16: Relative CD44-Expression der vorkonditionierten VMCUB-1-Zellen. Das Osteoblasten-KM steigerte signifikant die CD44-Expression der VMCUB-1-Zellen. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 4).

4.6 Einfluss des KM auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Um den Einfluss des Osteoblasten-KM auf die EMT der UCC zu untersuchen, wurde die Proteinexpression epithelialer und mesenchymaler Marker analysiert. Zusätzlich wurden die Marker E-Cadherin und Vimentin auch auf immunzytochemischer Ebene untersucht und visualisiert. Im Rahmen der genannten Versuchsexperimente wurden die UCC vorkonditioniert. Bei den Genexpressionsanalysen und der Proteinbestimmung wurde ergänzend der Zusatz von 3 μ M Cisplatin untersucht.

4.6.1 Auswirkungen des KM auf den TGF- β -Signalweg

Um die Auswirkungen des KM auf den TGF- β -Signalweg zu beurteilen, wurden die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors SMAD4 sowie die relative Konzentration von PAI-1 analysiert. Die erhöhte Expression dieser Proteine deutet auf eine verstärkte Aktivierung des TGF- β -Signalwegs hin.

4.6.1.1 Einfluss des KM auf die PAI-Konzentration

Um den Effekt des Osteoblasten-KM auf die PAI-1-Konzentration zu analysieren, wurde zunächst die PAI-1-Konzentration in den Ausgangsbedingungen (KM und DMEM) ermittelt (Abb. 17). Dabei zeigte sich, dass die PAI-1-Konzentration im KM signifikant höher war als in der DMEM-Kontrolle (63-fach, $p < 0,0001$). Diese ermittelte PAI-1-Konzentration in den Ausgangsbedingungen wurde von den nach der Zellinkubation der UCC gemessenen Werten subtrahiert, um sicherzustellen, dass die Auswertung des Osteoblasten-KM auf die PAI-1-Expression in den UCC nicht durch die bereits im KM vorhandene hohe Grundkonzentration verfälscht wurde. Da die PAI-1-Konzentration im Osteoblasten-KM bereits 63-fach höher war als in der DMEM-Kontrolle, war dieser Schritt notwendig, um ausschließlich die durch die Interaktion von Osteoblasten-KM und UCC bedingten Effekte zu analysieren.

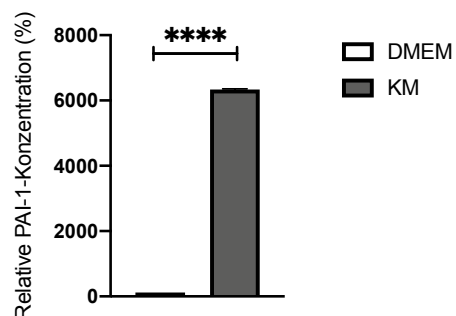


Abb. 17: Dargestellt ist die relative PAI-1-Konzentration, welche für die Inkubation der UCC verwendeten Medien detektiert werden konnte. Im Osteoblasten-KM konnte eine signifikant höhere relative PAI-1-Konzentration ermittelt werden als in der DMEM-Kontrolle. Abgebildet sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrollgruppe normiert wurden ($n = 4$).

Nach Abzug der PAI-1-Konzentrationen, die in den verwendeten Medien gemessen wurden, zeigt Abb. 18, dass der Einfluss des Osteoblasten-KM im Falle der BFTC-905-Zellen keinen signifikanten Effekt auf die ermittelte PAI-1-Konzentration hatte.

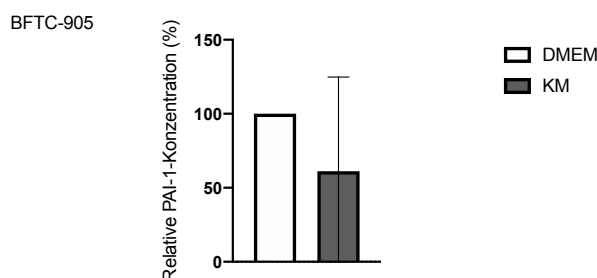


Abb. 18: Dargestellt ist die relative PAI-1-Konzentration, welche im Medium der BFTC-905-Zellen nach 72 h der Inkubation mit dem DMEM und KM ermittelt werden konnte. Hierbei zeigte sich ein tendenzieller Abfall der relativen PAI-1-Konzentration durch die Inkubation mit KM verglichen zur DMEM-Kontrolle. Dargestellt sind der Mittelwert + SD der PAI-1-Konzentration, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 4, technische Duplikate).

Wohingegen sich die ermittelte PAI-1-Konzentration der UMUC-3-Zellen innerhalb der KM-Überstände als signifikant geringer erwies als in der Kontrollgruppe (Abb. 19).

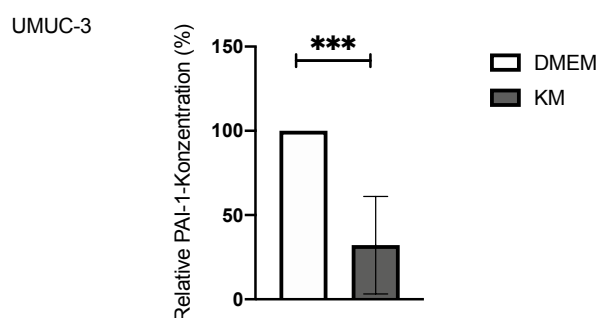


Abb. 19: Dargestellt ist die relative PAI-1-Konzentration, welche im Medium der UMUC-3-Zellen nach 72 h der Inkubation ermittelt werden konnte. Hierbei exprimierten die UMUC-3-Zellen signifikant weniger PAI-1 im Osteoblasten-KM als in der DMEM-Kontrolle. Dargestellt sind der Mittelwert + SD der PAI-1-Konzentration, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 4, technische Duplikate).

Bei den VMCUB-1-Zellen konnte ebenfalls eine tendenziell verringerte PAI-1-Konzentration durch die Inkubation des Osteoblasten-KM beobachtet werden (Abb. 20).

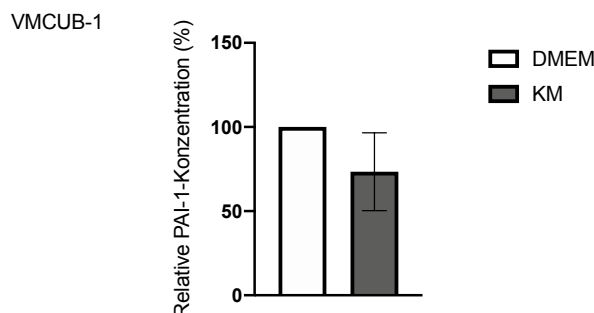


Abb. 20: Dargestellt ist die relative PAI-1-Konzentration, welche im Medium der VMCUB-1-Zellen nach 72 h der Inkubation ermittelt werden konnte. Hierbei zeigte sich ein tendenzieller Abfall der relativen PAI-1-Konzentration durch die Inkubation mit KM verglichen zur DMEM-Kontrolle. Dargestellt sind der Mittelwert + SD der PAI-1-Konzentration, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 4, technische Duplikate).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der SMAD-4-Proteinexpression vorkonditionierter UCC dargestellt. Zusätzlich wurde in einem Versuchsansatz (n = 2) der Einfluss von 3 μ M Cisplatin auf das Expressionsniveau zwischen DMEM und KM verglichen.

Das SMAD4-Expressionsniveau der BFTC-905-Zellen wurde durch die KM-Inkubation nicht moduliert (Abb. 21, A). Der Cisplatinzusatz übte ebenfalls keinen modulierenden Einfluss auf die Expression von SMAD4 aus (B).

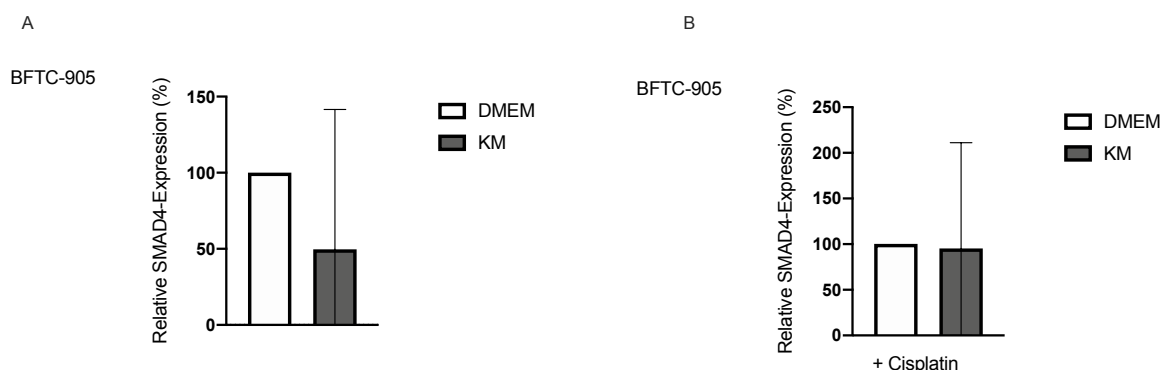


Abb. 21: Proteinexpression von SMAD4 der BFTC-905-Zellen. Die Vorkonditionierung der BFTC-905-Zellen mit KM zeigte keine signifikante Auswirkung auf die relative Proteinexpression von SMAD4 (A). Auf der rechten Seite (B) ist das relative SMAD4-Expressionsniveau zusätzlich unter dem Einfluss von 3 μ M Cisplatin dargestellt. Hierbei zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied innerhalb der beiden untersuchten Gruppen. Abgebildet sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (A, n = 7) (B, n = 2).

Für die UMUC-3-Zellen konnte ebenfalls kein signifikanter Einfluss des KM auf das SMAD4-Expressionsniveau eruiert werden (A, Abb. 22). Allerdings konnte durch die additive Inkubation mit Cisplatin ein signifikanter Abfall des SMAD4-Expressionsniveaus durch den Einfluss des Osteoblasten-KM beobachtet werden.

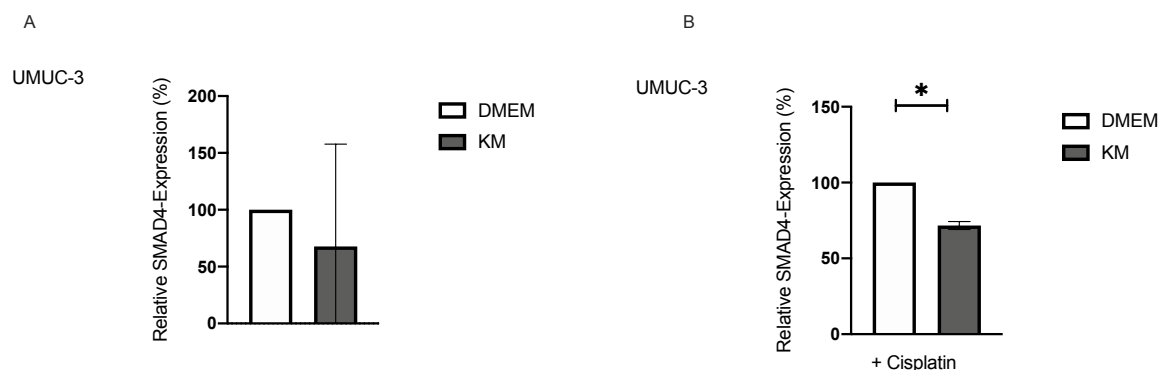


Abb. 22: Proteinexpression von SMAD4 der UMUC-3-Zellen. Die Vorkonditionierung der UMUC-3-Zellen mit KM zeigte keine signifikante Auswirkung auf die relative Proteinexpression von SMAD4 (A). Auf der rechten Seite (B) ist das relative SMAD4-Expressionsniveau zusätzlich unter dem Einfluss von 3 μ M Cisplatin dargestellt. Hierbei zeigten die UMUC-3-Zellen ein signifikant verringertes Expressionsniveau innerhalb des KM. Abgebildet sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (A, n = 7) (B, n = 2).

Die Inkubation mit KM übte im Falle der VMCUB-1-Zellen ebenfalls keinen Effekt auf das SMAD4-Expressionsniveau aus (A, Abb. 23). Der Zusatz von Cisplatin bewirkte eine tendenzielle Abnahme der SMAD4-Expression.

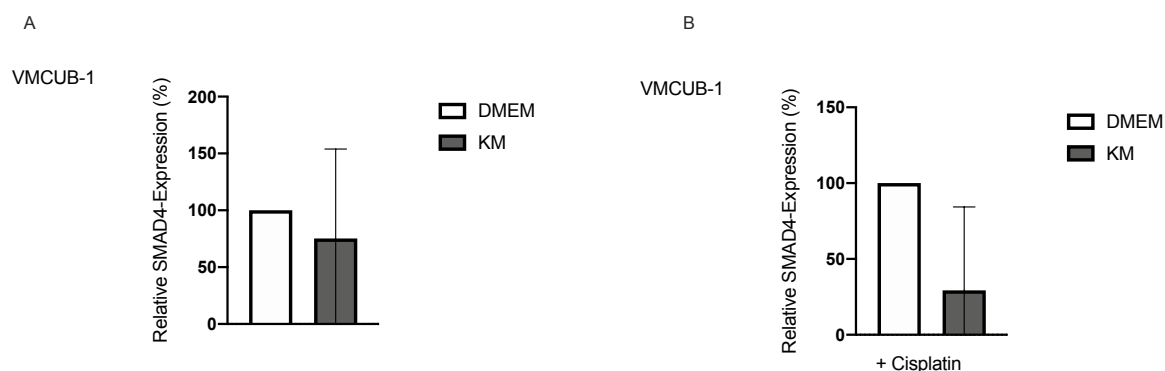


Abb. 23: Proteinexpression von SMAD4 der VMCUB-1-Zellen. Die Vorkonditionierung der VMCUB-1-Zellen mit KM zeigte keine signifikante Auswirkung auf die relative Proteinexpression von SMAD4. Auf der rechten Seite (B) ist das relative SMAD4-Expressionsniveau zusätzlich unter dem Einfluss von 3 μ M Cisplatin dargestellt, hierbei zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Abgebildet sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (A, n = 7) (B, n = 2).

4.6.2 Einfluss auf die Proteinexpression von Vimentin und E-Cadherin

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin nach der Inkubation mit DMEM und dem Osteoblasten-KM dargestellt. Zusätzlich wurde der Einfluss der Cisplatin-Therapie (3 μ M) auf das Proteinexpressionsniveau von E-Cadherin und Vimentin untersucht.

Abb. 24 zeigt, dass das KM im Falle der BFTC-905-Zellen einen tendenziellen Anstieg der relativen Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin bewirkte.

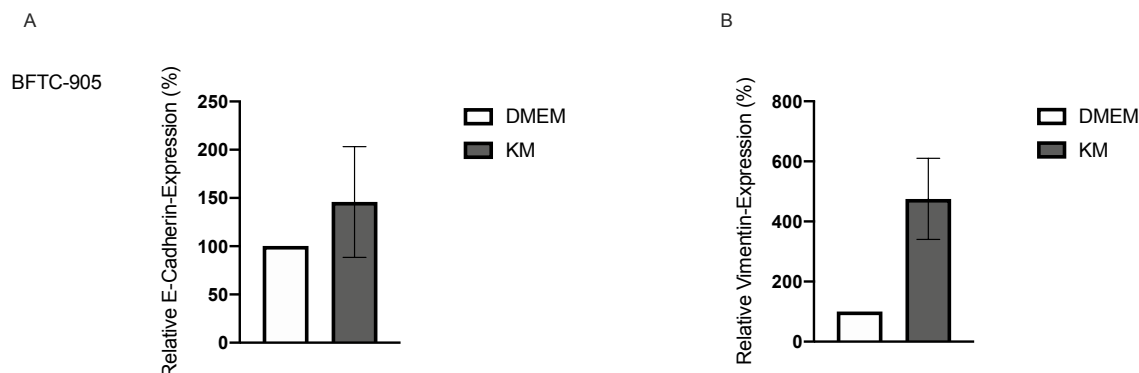


Abb. 24: Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin der BFTC-905-Zellen. Die Vorkonditionierung der BFTC-905-Zellen mit KM übte keinen signifikanten Effekt auf die Proteinexpression von E-Cadherin (A) und Vimentin (B) aus. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 7).

Ebenso konnte durch den Zusatz von 3 μ M Cisplatin für die BFTC-905-Zellen keine signifikante Veränderung der E-Cadherin- und Vimentin-Expression festgestellt werden (Abb. 25).

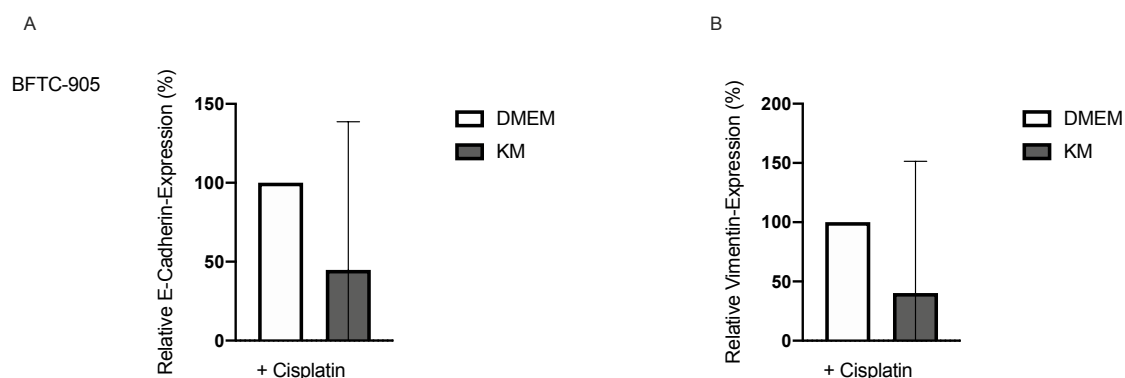


Abb. 25: Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin der BFTC-905-Zellen mit Cisplatin. Es konnte kein signifikanter Unterschied der relativen Proteinexpression von E-Cadherin (A) und Vimentin (B) ermittelt werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 2).

Im Falle der UMUC-3-Zellen übte das KM ebenfalls keinen modulierenden Einfluss auf das Expressionsniveau von E-Cadherin und Vimentin aus (Abb. 26).

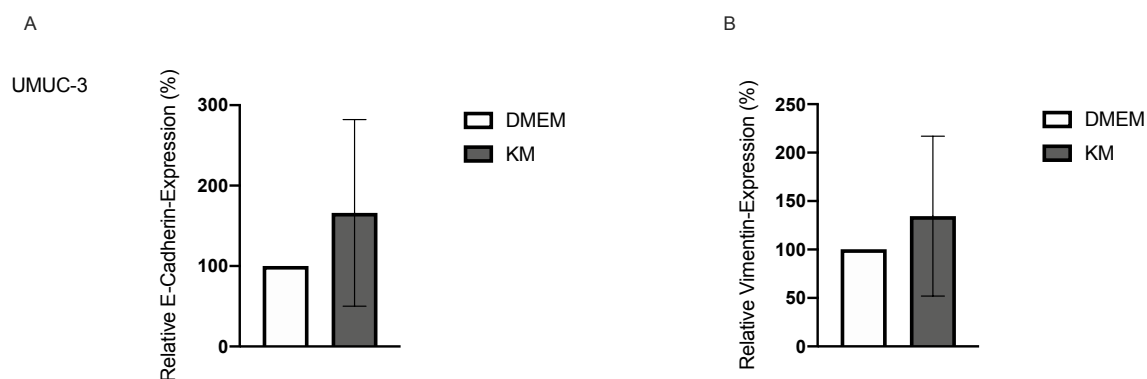


Abb. 26: Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin der UMUC-3-Zellen. Die Vorkonditionierung der UMUC-3-Zellen im KM übte keinen signifikanten Effekt auf die relative Proteinexpression von E-Cadherin (A) und Vimentin (B) aus. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 7).

Abb. 27 verdeutlicht, dass auch der Cisplatinzusatz zum Osteoblasten-KM keine signifikanten Veränderungen im Expressionsniveau von E-Cadherin und Vimentin der UMUC-3-Zellen bewirkte.

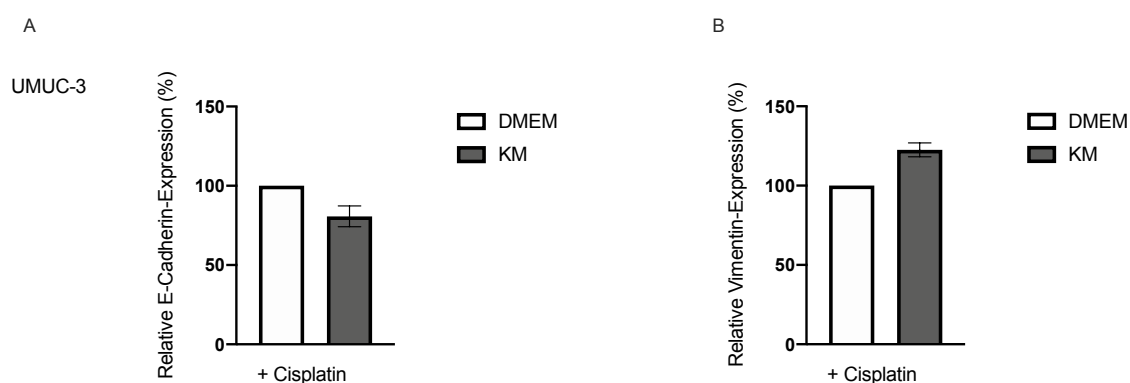


Abb. 27: Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin der UMUC-3-Zellen mit Cisplatin. Es konnte kein signifikanter Unterschied der relativen Proteinexpression von E-Cadherin (A) und Vimentin (B) ermittelt werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 2).

Abb. 28 zeigt, dass das KM auch im Falle der VMCUB-1-Zellen keinen relevanten Einfluss auf das Expressionsniveau von E-Cadherin und Vimentin ausgeübt hat.

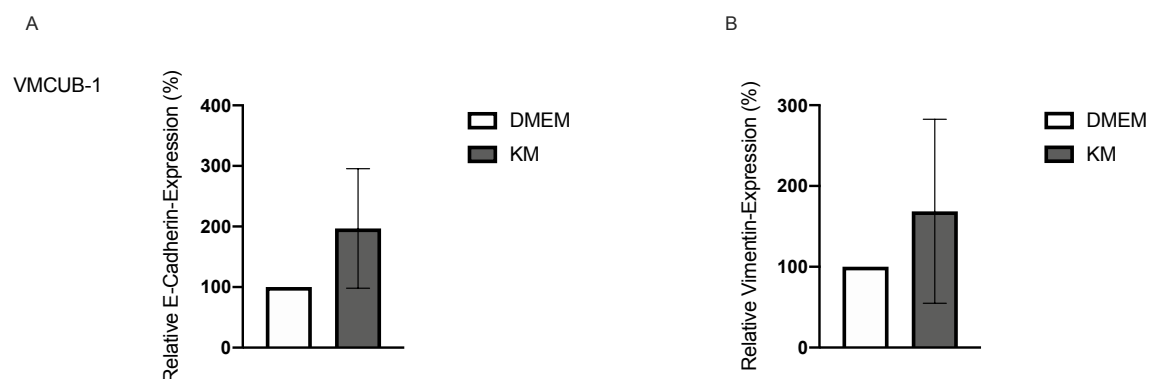


Abb. 28: Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin der VMCUB-1-Zellen. Die Vorkonditionierung der VMCUB-1-Zellen im KM übte keinen signifikanten Effekt auf die relative Proteinexpression von E-Cadherin (A) und Vimentin (B) aus. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 7).

Die Behandlung der VMCUB-1-Zellen mit Osteoblasten-KM und additiv mit Cisplatin führte zu einer signifikanten Reduktion der E-Cadherin-Expression. Die Vimentin-Expression wurde im Gegensatz dazu nicht moduliert (Abb. 29).

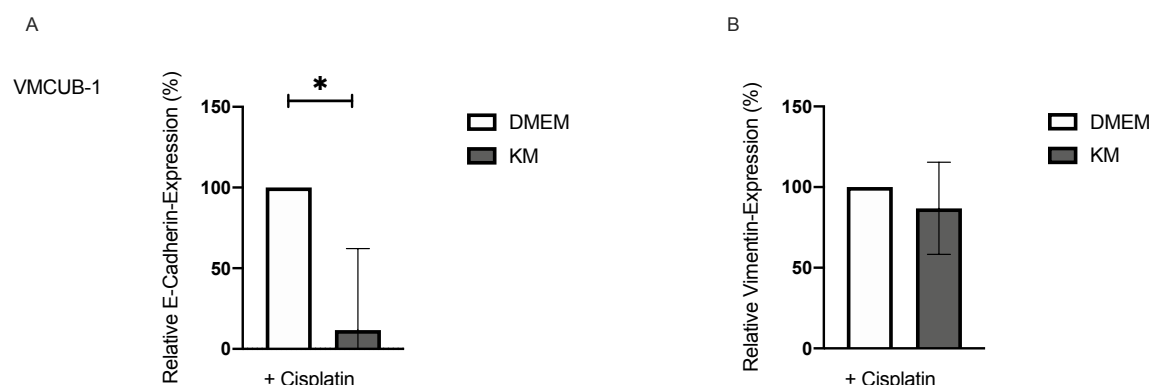


Abb. 29: Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin der VMCUB-1-Zellen mit Cisplatin. (A) Die in KM inkubierten VMCUB-1-Zellen exprimierten signifikant weniger E-Cadherin unter dem Zusatz von Cisplatin als in der Kontrollgruppe. (B) Es konnte kein signifikanter Unterschied im Vimentin-Expressionsniveau ermittelt werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 2).

4.6.3 Einfluss auf die Genexpression von E-Cadherin

Neben der Analyse der Proteinexpression von E-Cadherin wurde zusätzlich eine Genexpressionsanalyse unter dem Einfluss von KM durchgeführt. Ergänzend wurde der Einfluss von 3 μ M Cisplatin untersucht.

Abb. 30 (A) zeigt, dass die BFTC-905-Zellen unter dem Einfluss des Osteoblasten-KM tendenziell mehr E-Cadherin exprimieren als in der DMEM-Kontrolle. Unter dem Zusatz von 3 μ M Cisplatin konnte in allen drei untersuchten UCC-Zelllinien keine nennenswerte Modifikation des relativen E-Cadherin-Expressionsniveaus (%) beobachtet werden (Abb. 30 (B), Abb. 31 (B), Abb. 32 (B)).

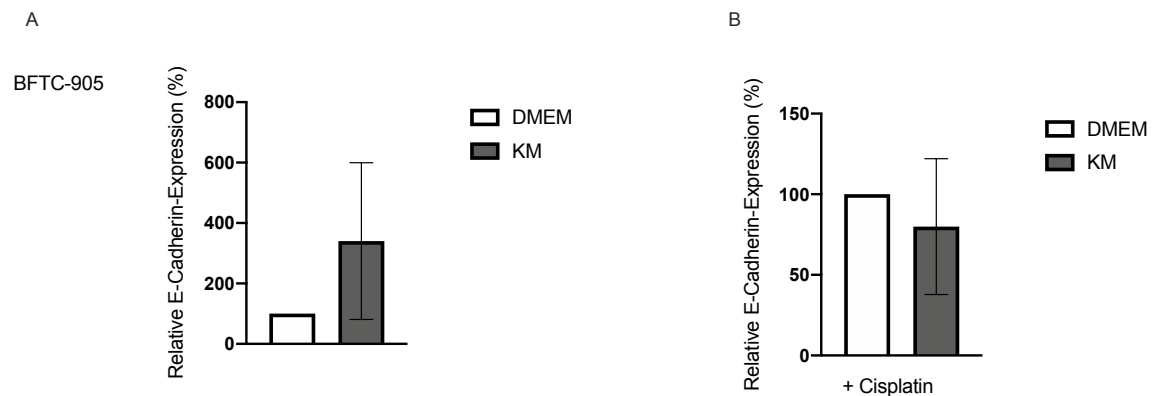


Abb. 30: Einfluss von KM und Cisplatin auf die Genexpression von E-Cadherin der BFTC-905-Zellen. Abgebildet ist das relative E-Cadherin-Expressionsniveau der BFTC-905-Zellen unter dem Einfluss von KM (A) und zusätzlich unter dem Einfluss von 3 μ M Cisplatin (B). Es ist zu erkennen, dass der Einfluss der Osteoblasten zu einem tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Anstieg des E-Cadherin-Expressionsniveaus führte. Unter dem Zusatz von Cisplatin konnte kein Unterschied beobachtet werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle der entsprechenden Gruppe normiert wurden (n = 3).

Es konnte kein signifikanter Einfluss des Osteoblasten-KM auf die E-Cadherin-Expression der UMUC-3-Zellen eruiert werden (Abb. 31).

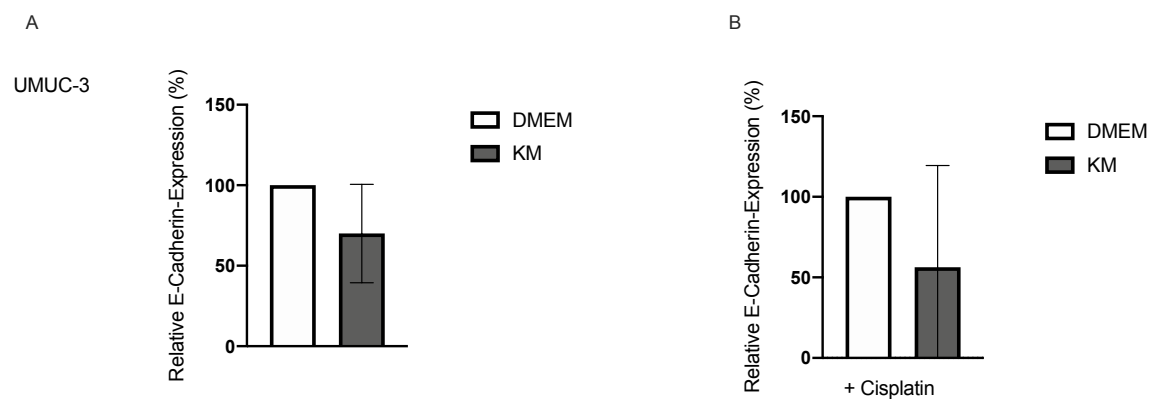


Abb. 31: Einfluss von KM und Cisplatin auf die Genexpression von E-Cadherin der UMUC-3-Zellen. Abgebildet ist das relative E-Cadherin-Expressionsniveau der UMUC-3-Zellen unter dem Einfluss von KM (A) und zusätzlich unter dem Einfluss von 3 μ M Cisplatin (B). Es konnte kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen beobachtet werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle der entsprechenden Gruppe normiert wurden (n = 3).

Die VMCUB-1-Zellen zeigten einen tendenziellen Anstieg ihrer relativen E-Cadherin-Expression unter dem Einfluss des KM (Abb. 32, A).

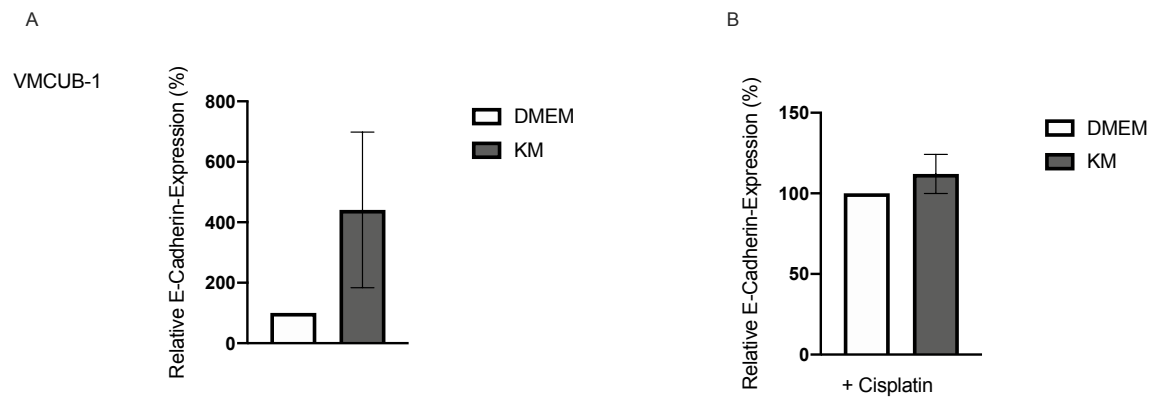


Abb. 32: Einfluss von KM und Cisplatin auf die Genexpression von E-Cadherin der VMCUB-1-Zellen. Abgebildet ist das relative E-Cadherin-Expressionsniveau der VMCUB-1-Zellen unter dem Einfluss von KM (A) und zusätzlich unter dem Einfluss von 3 µM Cisplatin (B). Es ist zu erkennen, dass der Einfluss der Osteoblasten zu einem tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Anstieg des E-Cadherin-Expressionsniveaus führte. Unter dem Zusatz von Cisplatin konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle der entsprechenden Gruppe normiert wurden (n = 3).

4.6.4 Einfluss des Osteoblasten-KM auf die Immunfluoreszenzfärbung von Vimentin und E-Cadherin

Im Falle der BFTC-905-Zellen wird E-Cadherin durch die Inkubation mit Osteoblasten-KM verstärkt exprimiert (A, Abb. 33). Die Vimentin-Färbung zeigt keinen deutlichen Unterschied in der Intensität in den beiden miteinander verglichenen Medien (B).

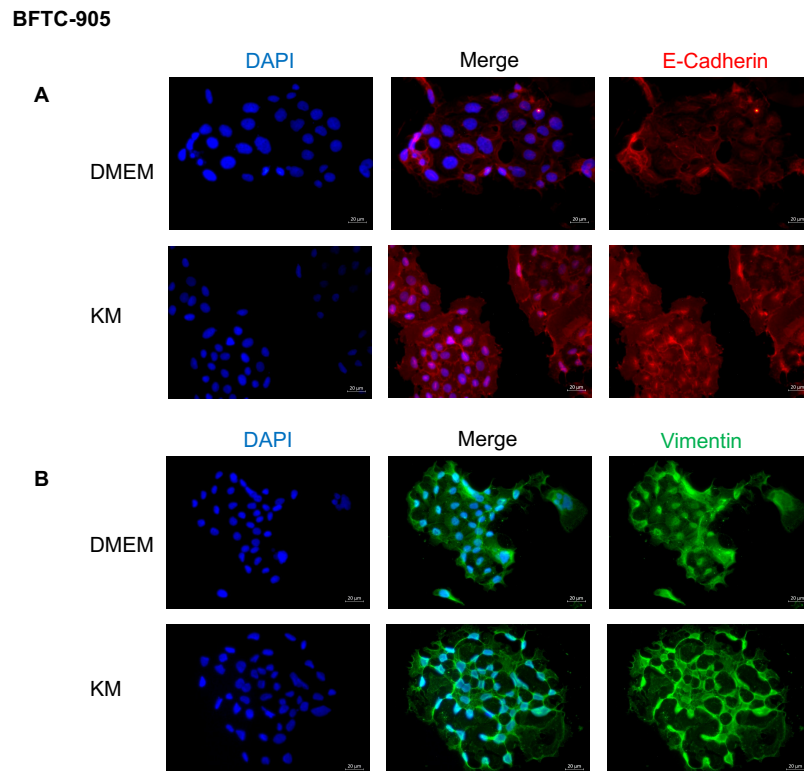


Abb. 33: Immunfluoreszenzfärbung von DAPI, Vimentin und E-Cadherin der BFTC-905-Zellen. Dargestellt sind exemplarisch vorkonditionierte BFTC-905-Zellen in KM bzw. DMEM, deren Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau) visualisiert wurden. Die EMT-Marker E-Cadherin (A) und Vimentin (B) sind in rot bzw. grün dargestellt. Zusätzlich ist das übereinandergelegte Bild (Merge) von DAPI und E-Cadherin bzw. Vimentin abgebildet. Die E-Cadherin-Färbung ist deutlicher im KM zu erkennen, während die Vimentin-Färbung in beiden Medien ähnlich intensiv erscheint. 40 × Vergrößerung, Maßstabsbalken = 20 µm.

Für die UMUC-3-Zellen ist erkennbar, dass die E-Cadherin-Färbung in der DMEM-Kontrolle intensiver ist als im KM. Die Vimentin-Expression unterscheidet sich nicht (Abb. 34).

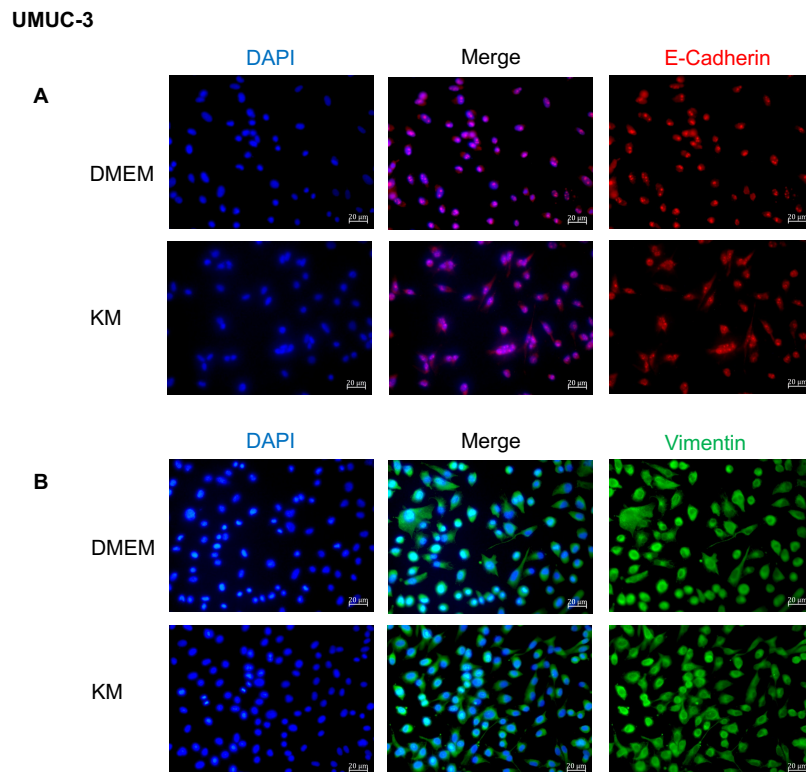


Abb. 34: Immunfluoreszenzfärbung von DAPI, Vimentin und E-Cadherin der UMUC-3-Zellen. Dargestellt sind UMUC-3-Zellen in KM bzw. DMEM, deren Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau) visualisiert werden. Die EMT-Marker E-Cadherin (A) und Vimentin (B) sind in rot bzw. grün dargestellt. Zusätzlich ist das übereinandergelegte Bild (Merge) von DAPI und E-Cadherin bzw. Vimentin abgebildet. Es ist eine Abnahme der E-Cadherin-Färbung im KM erkennbar, während die Farbintensität der Vimentin-Färbung in beiden Medien ähnlich erscheint. 40 × Vergrößerung, Maßstabsbalken = 20 µm.

Die E-Cadherin-Färbung der VMCUB-1-Zellen zeigt keinen sichtbaren Unterschied in der Intensität der beiden miteinander verglichenen Medien (A, Abb. 35). Jedoch ist im Osteoblasten-KM eine stärkere Vimentin-Färbung zu erkennen als in der DMEM-Kontrolle (B).

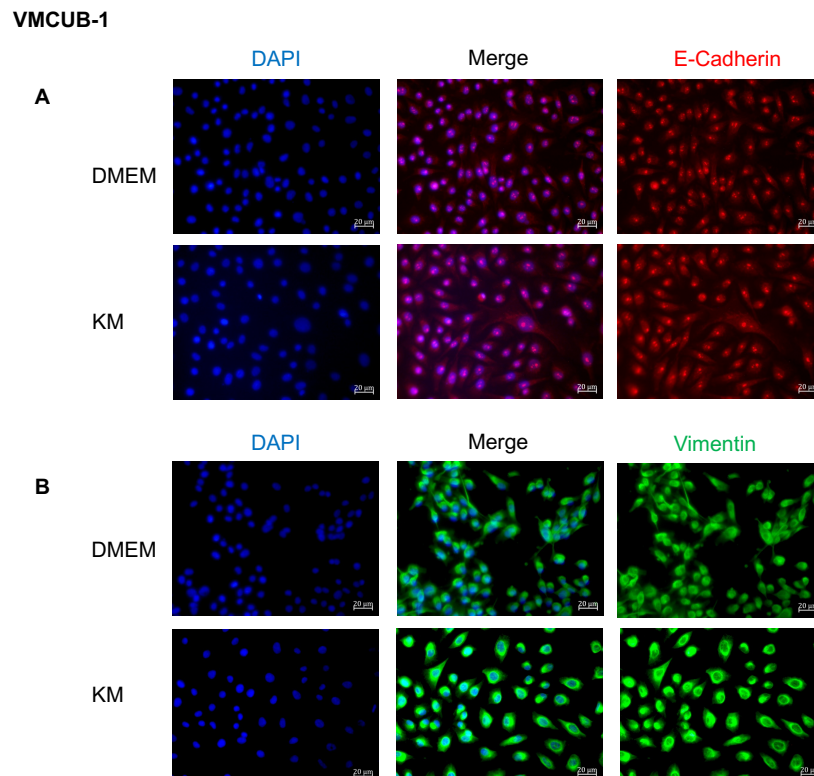


Abb. 35: Immunfluoreszenzfärbung von DAPI, Vimentin und E-Cadherin der VMCUB-1-Zellen. Dargestellt sind exemplarisch vorkonditionierte VMCUB-1-Zellen in KM bzw. DMEM, deren Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau) visualisiert werden. Die EMT-Marker E-Cadherin (A) und Vimentin (B) sind in rot bzw. grün dargestellt. Zusätzlich ist das übereinandergelegte Bild (Merge) von DAPI und E-Cadherin bzw. Vimentin abgebildet. Es zeigt sich kein Unterschied in der E-Cadherin-Färbung. Jedoch ist eine Intensitätszunahme der Vimentin-Färbung durch die Behandlung mit KM zu erkennen. 40 × Vergrößerung, Maßstabsbalken = 20 µm.

4.6.5 Einfluss des KM auf die Proteinexpression von α -SMA

Im Folgenden werden die Ergebnisse der α -SMA-Expression der UCC dargestellt. Analog zu den vorherigen Analysen wurde auch hier der Einfluss des KM mit und ohne 3 µM Cisplatinzusatz eruiert.

Aus Abb. 36 lässt sich entnehmen, dass die BFTC-905-Zellen durch die Inkubation im KM tendenziell mehr α -SMA exprimierten als in der DMEM-Kontrollgruppe.

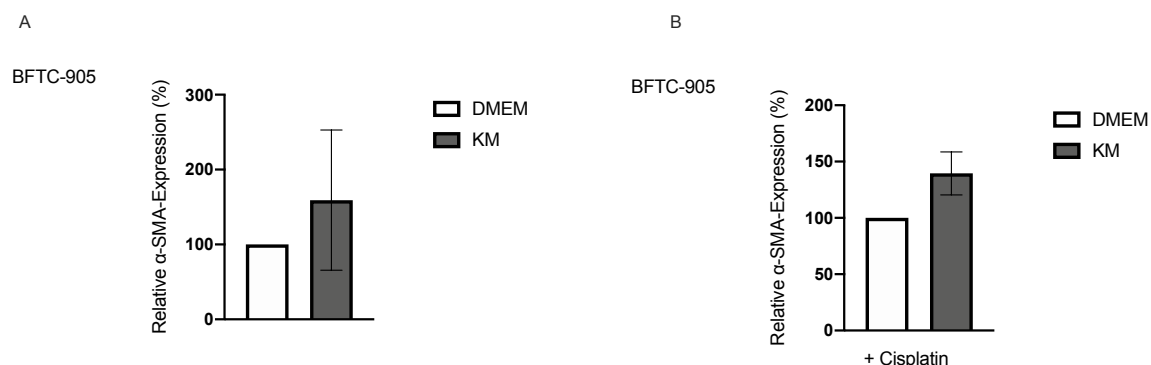


Abb. 36: Einfluss des KM auf die relative α -SMA-Expression (%) der BFTC-905-Zellen mit und ohne Cisplatin. (A) Für die BFTC-905-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied im α -SMA-Expressionsniveau festgestellt werden. (B) Unter dem Einfluss von 3 μ M Cisplatin, ließ sich ebenfalls keine signifikante Modulation der α -SMA-Expression durch den Einfluss des Osteoblasten-KM festhalten. Abgebildet sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (A, n = 7) (B, n = 2).

Im Falle der UMUC-3-Zellen konnte nur ein tendenzieller Anstieg des α -SMA-Expressionsniveaus unter dem Einfluss des Osteoblasten-KM ohne Cisplatin detektiert werden (Abb. 37, A).

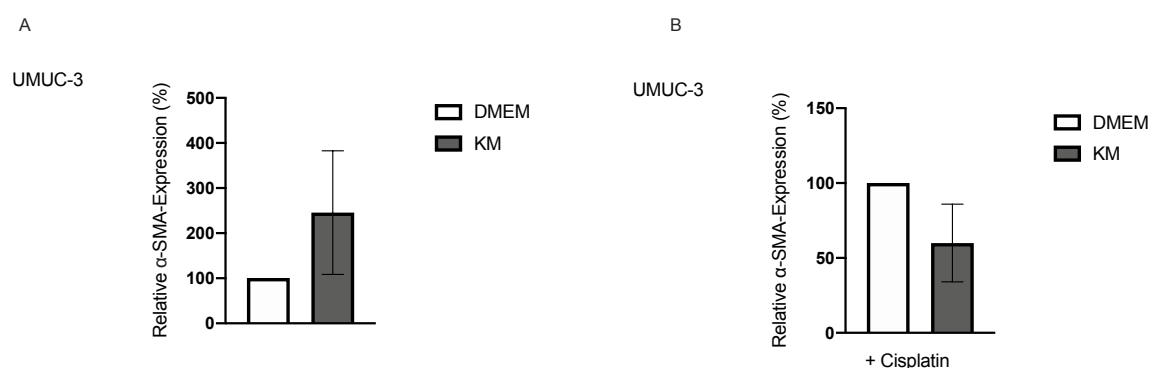


Abb. 37: Einfluss des KM auf die relative α -SMA-Expression (%) der UMUC-3-Zellen mit und ohne Cisplatin. (A) Für die UMUC-3-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied im α -SMA-Expressionsniveau festgestellt werden. (B) Unter dem Einfluss von 3 μ M Cisplatin, ließ sich ebenfalls keine signifikante Modulation der α -SMA-Expression durch den Einfluss des Osteoblasten-KM beobachten. Abgebildet sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (A, n = 7) (B, n = 2).

Aus Abb. 38 lässt sich entnehmen, dass die Inkubation der VMCUB-1-Zellen mit KM zu einer verringerten Expression von α -SMA führte, welche sich jedoch nicht als signifikant erwies.

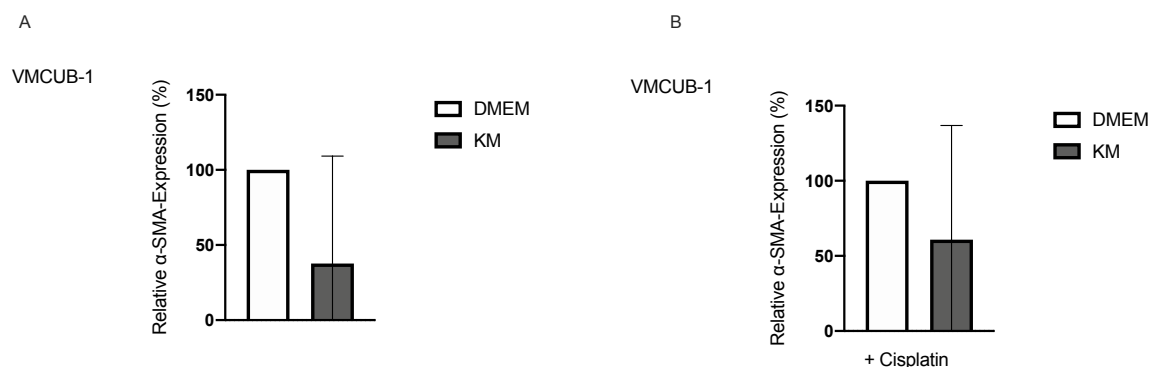


Abb. 38: Einfluss des KM auf die relative α -SMA-Expression (%) der VMCUB-1-Zellen mit und ohne Cisplatin. (A) Für die VMCUB-1-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied im α -SMA-Expressionsniveau festgestellt werden. (B) Unter dem Einfluss von 3 μ M Cisplatin, ließ sich ebenfalls keine signifikante Modulation der α -SMA-Expression durch den Einfluss des Osteoblasten-KM feststellen. Abgebildet sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (A, n = 7) (B, n = 2).

4.7 Einfluss des KM auf den zellulären Immunphänotyp

Um der Frage nachzugehen, ob lösliche Faktoren humaner Osteoblasten womöglich die Immunevasion der UCC unterstützen, wurde die relative CD273- und CD274-Expression vorkonditionierter UCC durchflusszytometrisch analysiert.

Für die BFTC-905-Zellen konnte kein Unterschied im Expressionsniveau der beiden untersuchten Oberflächenproteine ermittelt werden (Abb. 39).

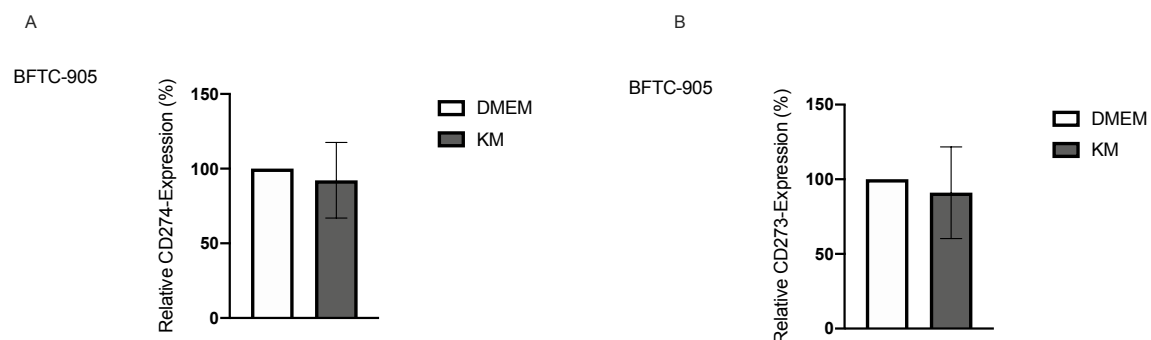


Abb. 39: Relative CD274- (PD-L1) und CD273- (PD-L2) Expression der BFTC-905-Zellen. Es konnte keine Veränderung im Expressionsniveau von CD274 und CD273 ermittelt werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 6).

Während das CD274-Expressionsniveau der UMUC-3-Zellen innerhalb der beiden Zellkulturmedien nahezu unverändert gleich blieb, exprimierten die mit Osteoblasten-KM vorkonditionierten UMUC-3-Zellen etwa doppelt so viel CD273 verglichen zur DMEM-Kontrolle (Abb. 40).



Abb. 40: Relative CD274- (PD-L1) und CD273- (PD-L2) Expression der UMUC-3-Zellen. Es konnte kein Unterschied im CD274-Expressionsniveau detektiert werden, während die Inkubation im Osteoblasten-KM zu einer signifikanten Steigerung von CD273 beigetragen hat. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 7).

Die Inkubation der VMCUB-1-Zellen mit KM führte zu einer signifikanten Zunahme der CD274- und CD273-Expression (Abb. 41). Im Falle von CD274 führte die Inkubation mit KM zu einer 2,3-fachen Steigerung des Expressionsniveaus (A), während eine 1,4-fache Steigerung für CD273 demonstriert werden konnte (B).

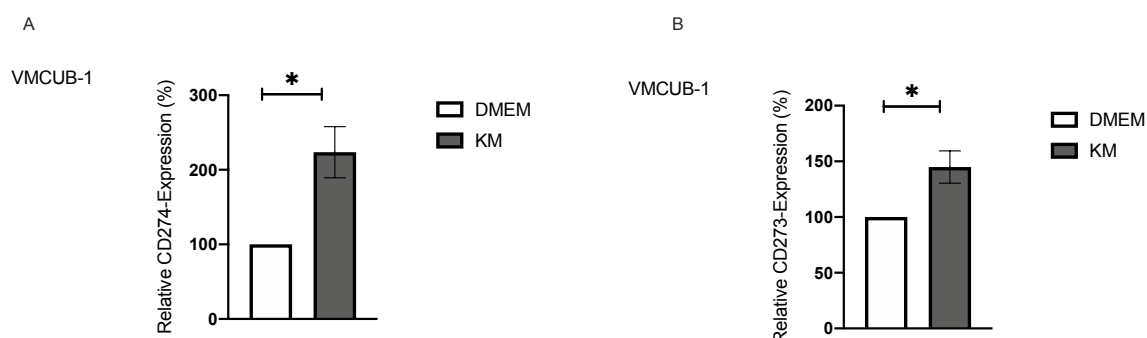


Abb. 41: Relative CD274- (PD-L1) und CD273- (PD-L2) Expression der VMCUB-1-Zellen. Die Inkubation mit KM führte zu einer signifikanten Steigerung des CD273 und CD274-Expressionsniveaus. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 4).

4.8 Einfluss des KM auf die CXCR4-Proteinexpression von

Nachfolgend sollte die Frage beantwortet werden, ob das KM von Osteoblasten parakrine Faktoren enthält, welche die CXCR4-Expression der UCC moduliert. Zusätzlich wurde in einem weiteren Versuchsansatz der Einfluss des KM mit Cisplatin analysiert. Allerdings konnte in den BFTC-905-Zellen kein Einfluss auf die Expression von CXCR4 beobachtet werden (Abb. 42).

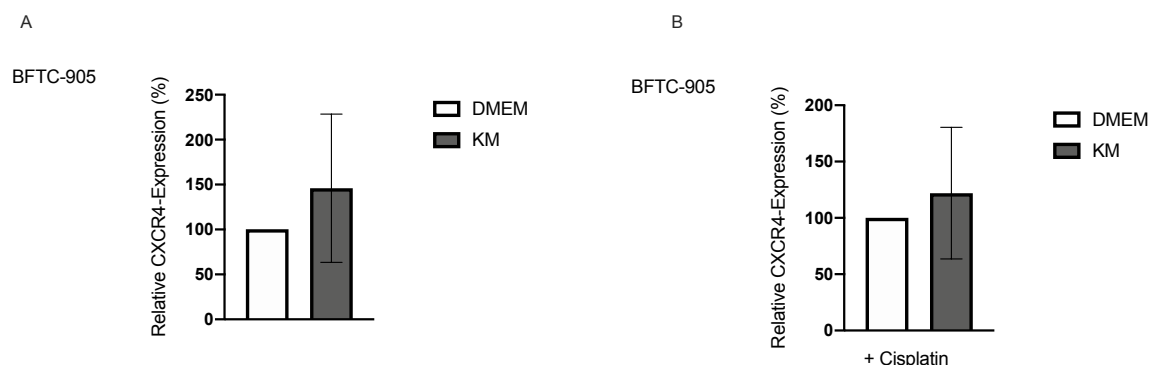


Abb. 42: Einfluss des KM auf die relative CXCR4-Expression (%) der BFTC-905-Zellen mit und ohne Cisplatin (3 μ M). In beiden Versuchsansätzen konnte keine Veränderung im CXCR4-Expressionsniveau detektiert werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (A, n = 7) (B, n = 2).

Ohne die additive Behandlung mit Cisplatin exprimierten die im KM inkubierten UMUC-3-Zellen signifikant weniger CXCR4. Wohingegen sie unter dem Zusatz von Cisplatin tendenziell mehr CXCR4 exprimierten (Abb. 43).

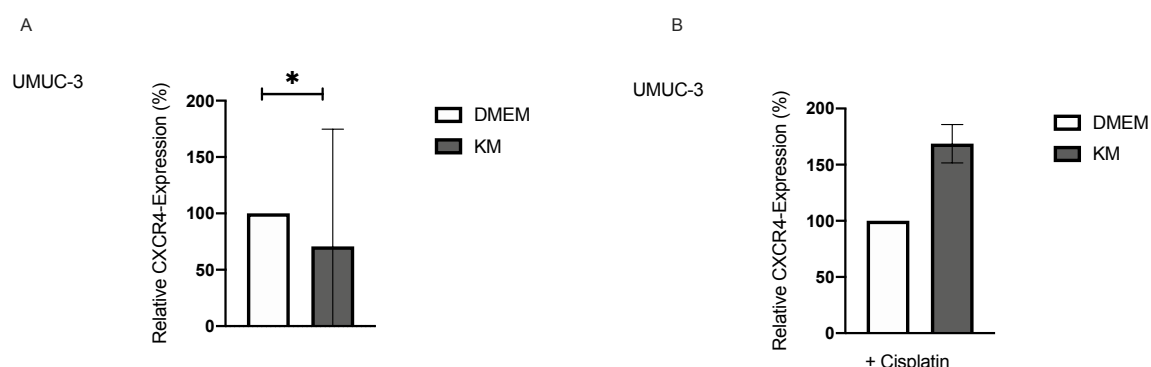


Abb. 43: Einfluss des KM auf die relative CXCR4-Expression (%) der UMUC-3-Zellen mit und ohne Cisplatin (3 μ M). Die in KM vorkonditionierten UMUC-3-Zellen exprimierten weniger CXCR4 als in der DMEM-Kontrolle. Unter dem Zusatz von Cisplatin konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (A, n = 7) (B, n = 2).

Durch die Inkubation mit dem Osteoblasten-KM wurde die Expression von CXCR4 der VMCUB-1-Zellen nicht moduliert. Es sei denn, es wurde zusätzlich Cisplatin hinzugefügt, dann kam es zu einer signifikanten Reduktion der CXCR4-Expression (Abb. 44).

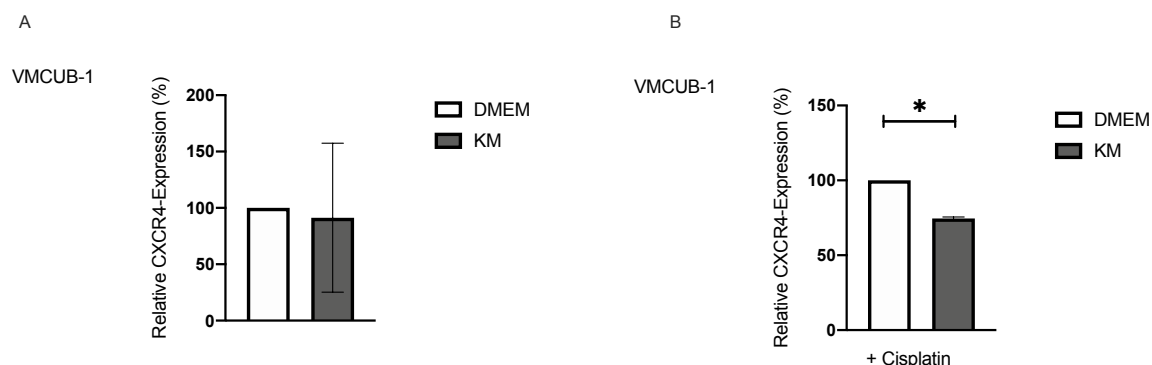


Abb. 44: Einfluss des KM auf die relative CXCR4-Expression (%) der VMCUB-1-Zellen mit und ohne Cisplatin (3 μ M). Die in KM vorkonditionierten VMCUB-1-Zellen zeigten ein vergleichbares Expressionsniveau des Chemokinrezeptors CXCR4 wie die Kontrollgruppe, die in DMEM kultiviert wurde. Unter dem Zusatz von Cisplatin exprimierten die in KM vorkonditionierten VMCUB-1-Zellen signifikant weniger CXCR4. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (A, n = 7) (B, n = 2).

4.9 Einfluss des KM auf die CK14-mRNA-Expression

Um die Einflüsse des Osteoblasten-KM auf die Stammzellmerkmale der UCC zu bewerten, wurde die CK14-mRNA-Expression untersucht. Ohne den Einfluss von Cisplatin zeigten die in KM vorkonditionierten BFTC-905-Zellen eine tendenziell höhere Expression des Zytokeratins CK14, während unter der Behandlung mit Cisplatin weniger CK14 im Vergleich zur DMEM-Kontrolle nachgewiesen wurde (Abb. 45).

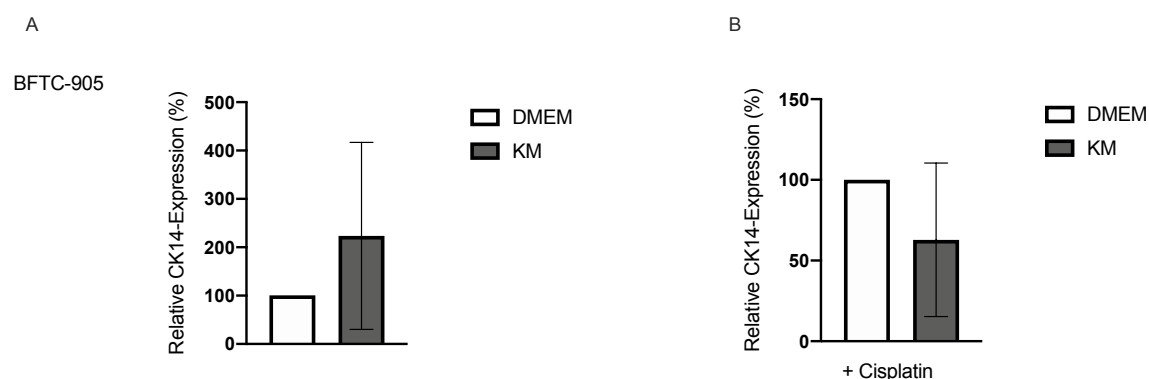


Abb. 45: Einfluss des KM auf die relative CK14-mRNA-Expression (%) der BFTC-905-Zellen mit und ohne Cisplatin (3 μ M). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen detektiert werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD der in KM vorkonditionierten Zellen, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 3).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die VMCUB-1-Zellen beobachtet (Abb. 46). Die Inkubation mit KM übte einen tendenziellen Anstieg des CK14-Expressionsniveaus aus. Unter dem Zusatz von Cisplatin produzierten die VMCUB-1-Zellen vergleichsweise weniger CK14 als in der DMEM-Kontrolle (B).

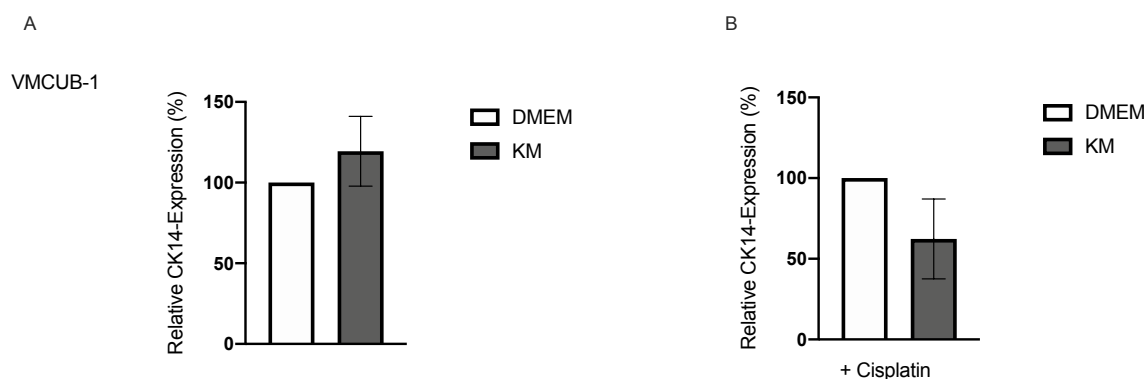


Abb. 46: Einfluss des KM auf die relative CK14-mRNA-Expression (%) der VMCUB-1-Zellen mit und ohne Cisplatin (3 μ M). In beiden durchgeführten Versuchsansätzen konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen detektiert werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 3).

Die Inkubation mit Osteoblasten-KM hatte in den UMUC-3-Zellen keinen modulierenden Effekt auf die CK14-Expression (A, Abb. 47). Durch den Zusatz von Cisplatin konnte ebenfalls kein Unterschied im Expressionsniveau beobachtet werden (B).

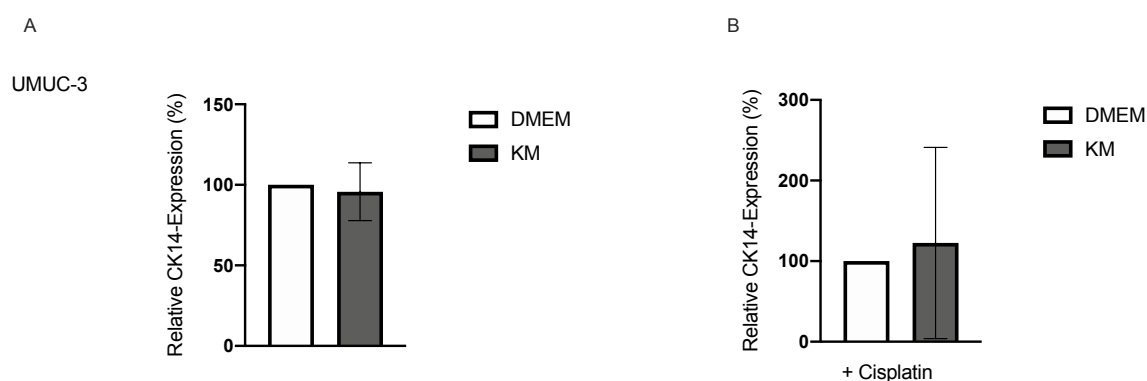


Abb. 47: Einfluss des KM auf die relative CK14-mRNA-Expression (%) der UMUC-3-Zellen mit und ohne Cisplatin (3 μ M). In beiden durchgeführten Versuchsansätzen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen detektiert werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 3).

4.10 Einfluss des KM auf das Apoptoseverhalten der UCC

Um der Frage nachzugehen, ob das KM die Apoptoseresistenz der UCC fördert, wurde die mRNA-Expression der Bcl-2 und Bcl-XL analysiert. Hierbei wurde zusätzlich der Einfluss von Cisplatin evaluiert. Ziel war es zu eruieren, inwiefern Osteoblasten die Apoptose-Eigenschaften der UCC modulieren und zur Entwicklung einer Therapieresistenz beitragen können. Als antiapoptotischer und folglich tumorprogressiver Einfluss wurden erhöhte Level von Bcl-XL und Bcl-2 gewertet.

Die Ergebnisse der Apoptose-Analyse im Falle der BFTC-905-Zellen werden in Abb. 48 veranschaulicht. Hierbei konnte keine relevante Modifikation des antiapoptotisch

wirksamen Proteins Bcl-2 durch das KM festgestellt werden. Durch die Zugabe von Cisplatin kam es zu einer tendenziellen Erhöhung.

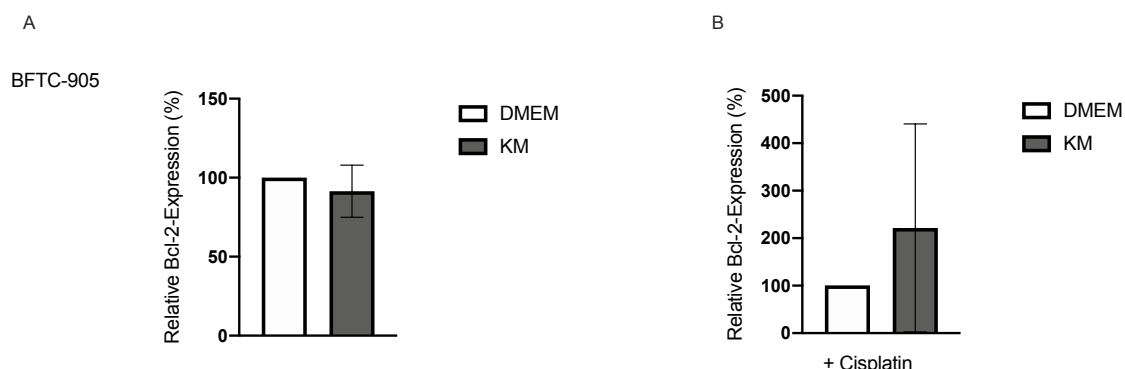


Abb. 48: Einfluss von KM und Cisplatin auf die Expression von Bcl-2 der BFTC-905-Zellen. (A) Es konnte keine Veränderung des Expressionsniveaus von Bcl-2 durch den Einfluss des Osteoblasten-KM festgestellt werden. (B) Ebenso bewirkte der Zusatz von 3 μ M Cisplatin keine signifikante Veränderung der Bcl-XL-Expression. Dargestellt sind der Mittelwert + SD der relativen Bcl-2-Expression (%) mit und ohne Cisplatin, welche auf die jeweilige DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 3, technische Duplikate).

Ebenso konnte kein Einfluss des KM auf die Bcl-XL-Expression der BFTC-905-Zellen ermittelt werden, was in Abb. 49 dargestellt wird. Die Wirkung des Cisplatin blieb ebenfalls unbeeinflusst durch das KM.

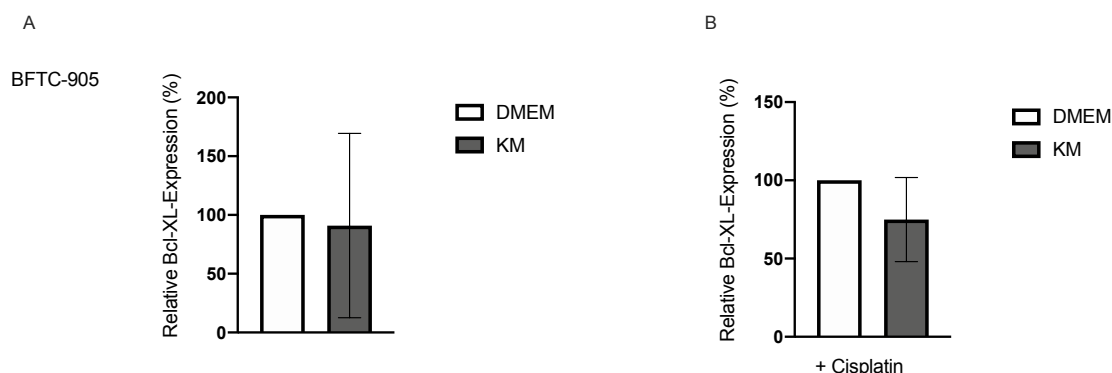


Abb. 49: Einfluss von KM und Cisplatin auf die Bcl-XL-Expression der BFTC-905-Zellen. (A) Es konnte keine Veränderung von Bcl-XL durch den Einfluss des KM im Falle der BFTC-905-Zellen eruiert werden. (B) Ebenso bewirkte der Zusatz von 3 μ M Cisplatin keine signifikante Veränderung der Bcl-XL-Expression. Dargestellt sind der Mittelwert + SD der relativen Bcl-XL-Expression (%) mit und ohne Cisplatin, welche auf die jeweilige DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 3, technische Duplikate).

Die Inkubation der UMUC-3-Zellen mit KM hatte ebenso keinen Effekt auf die Expression von Bcl-2 im Vergleich zur DMEM-Kontrolle (Abb. 50). Auch der Zusatz von Cisplatin bewirkte keinen signifikanten Einfluss auf die relative Bcl-2-Expression.

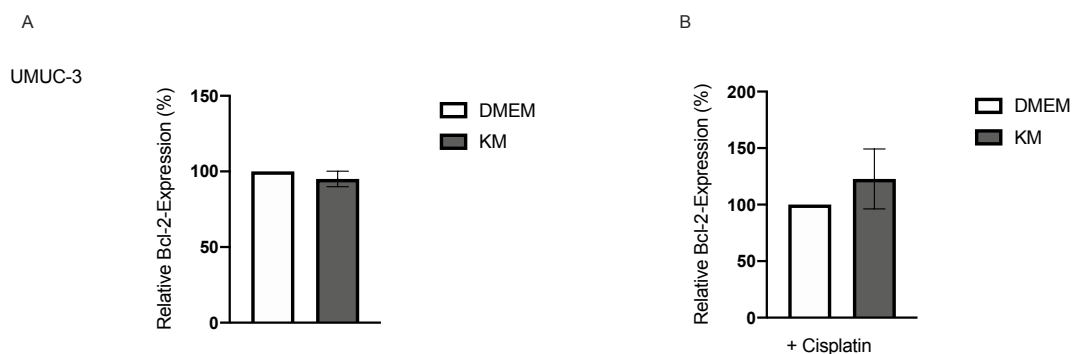


Abb. 50: Einfluss von KM und Cisplatin auf die Bcl-2-Expression der UMUC-3-Zellen. (A) Es konnte keine Veränderung des Expressionsniveaus von Bcl-2 durch den Einfluss des KM eruiert werden. (B) Ebenso bewirkte der Zusatz von 3 μ M Cisplatin keine signifikante Veränderung der Bcl-2-Expression. Dargestellt sind der Mittelwert + SD der relativen Bcl-2-Expression (%) mit und ohne Cisplatin, welche auf die jeweilige DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 3, technische Duplikate).

In Abb. 51 ist zu erkennen, dass das Osteoblasten-KM keinen signifikanten Einfluss auf das Bcl-XL-Expressionsniveau der UMUC-3-Zellen hatte.

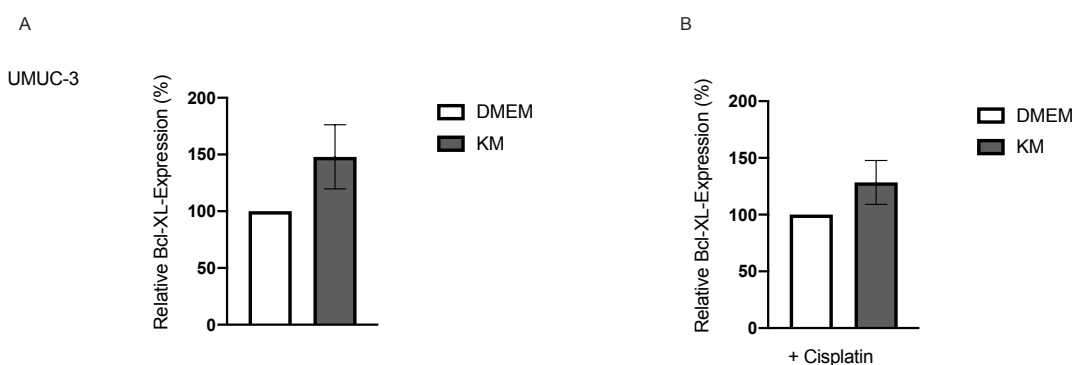


Abb. 51: Einfluss von KM und Cisplatin auf die Bcl-XL-Expression der UMUC-3-Zellen. (A) Es konnte keine signifikante Veränderung des Expressionsniveaus von Bcl-XL durch den Einfluss des KM beobachtet werden. (B) Ebenso übte der Zusatz von 3 μ M Cisplatin keine signifikante Veränderung der Bcl-XL-Expression aus. Dargestellt sind der Mittelwert + SD der relativen Bcl-XL-Expression (%) mit und ohne Cisplatin, welche auf die jeweilige DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 3, technische Duplikate).

Die Inkubation der VMCUB-1-Zellen mit KM hatte keinen Effekt auf das Expressionsniveau von Bcl-2 und Bcl-XL (Abb. 52 und Abb. 53). Ebenso konnte in beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied durch die additive Zugabe von Cisplatin detektiert werden.

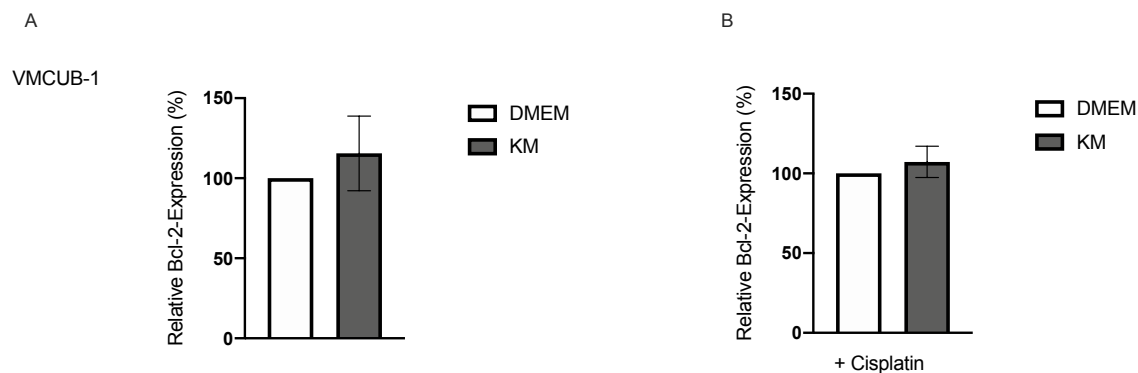


Abb. 52: Einfluss von KM und Cisplatin auf die Bcl-2-Expression der VMCUB-1-Zellen. (A) Es konnte keine Veränderung des Expressionsniveaus von Bcl-2 durch den Einfluss des KM beobachtet werden. (B) Ebenso übte der Zusatz von 3 μ M Cisplatin keine Veränderung der Bcl-2-Expression aus. Dargestellt sind der Mittelwert + SD der relativen Bcl-2-Expression (%) mit und ohne Cisplatin, welche auf die jeweilige DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 3, technische Duplikate).

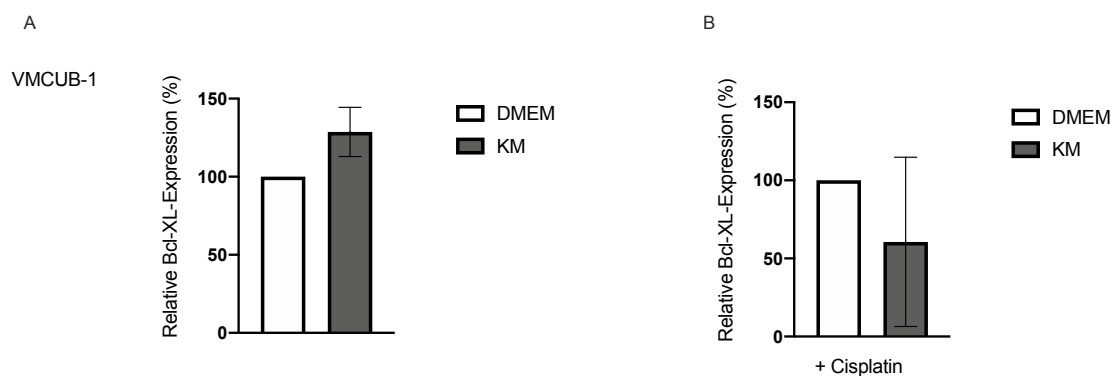


Abb. 53: Einfluss von KM und Cisplatin auf die Bcl-XL-Expression der VMCUB-1-Zellen. (A) Es konnte kein signifikanter Einfluss auf das Expressionsniveau von Bcl-XL durch den Einfluss des KM im Falle der VMCUB-1-Zellen eruiert werden. (B) Ebenso hatte 3 μ M Cisplatin keinen Effekt auf die Bcl-XL-Expression. Dargestellt sind der Mittelwert + SD der relativen Bcl-XL-Expression (%) mit und ohne Cisplatin, welche auf die jeweilige DMEM-Kontrolle normiert wurden (n = 3, technische Duplikate).

Anhand der gesammelten Ergebnisse lässt sich festhalten, dass der Einfluss des Osteoblasten-KM nur tendenziell einen Anstieg des Expressionsniveaus der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-XL bewirkt.

4.11 Einfluss des KM auf die Cisplatin-Sensitivität

Ziel der Resistenzanalyse war es zu eruieren, ob das Osteoblasten-KM parakrine Faktoren enthält, welche den UCC das Überleben gegenüber Cisplatin ermöglichen.

Im Falle der BFTC-905-Zellen konnte kein resistenzfördernder Effekt durch das KM identifiziert werden (Abb. 54).

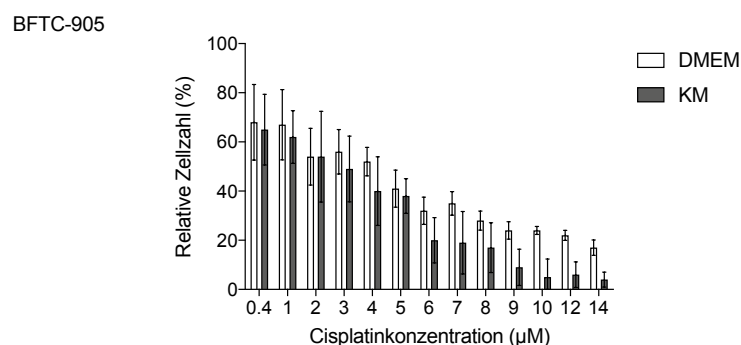


Abb. 54: Einfluss von KM auf die Cisplatin-Sensitivität von BFTC-905-Zellen. Im Falle der BFTC-905-Zellen konnte kein resistenzfördernder Effekt des KM festgestellt werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die Kontrolle des jeweiligen Mediums ohne Cisplatin (nicht abgebildet) normiert wurden (n = 8, 3 technische Replikate).

Der Einfluss des Osteoblasten-KM auf die Resistenzeigenschaften der UMUC-3-Zellen war interessant. Bei einer additiven Anwendung von 2 µM Cisplatin zu dem Osteoblasten-KM überlebten signifikant mehr Zellen als in der DMEM-Kontrolle. Wohingegen bei 4 µM, 6 µM, 10 µM und 12 µM die mit DMEM inkubierten UMUC-3-Zellen eine höhere Zellzahl aufwiesen (Abb. 55).

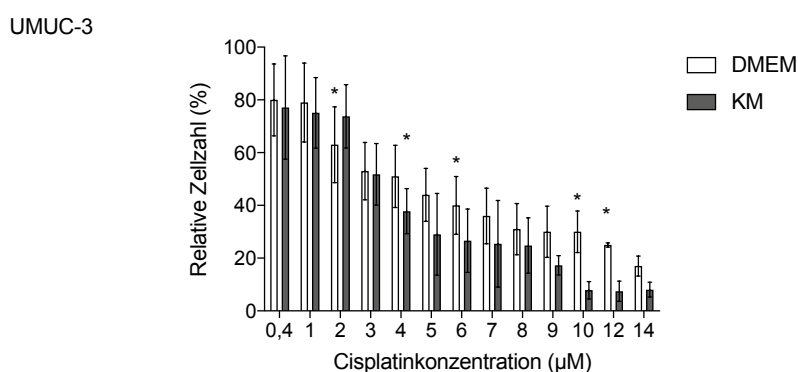


Abb. 55: Einfluss von KM auf die Cisplatin-Sensitivität von UMUC-3-Zellen. Die Inkubation der UMUC-3-Zellen mit KM führte bei einem Zusatz von 2 µM Cisplatin zu einer höheren Zellzahl. Bei höheren Cisplatin-Konzentrationen (ab 4 µM) führte hingegen die Inkubation mit DMEM zu einer signifikant erhöhten Zellzahl. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die Kontrolle des jeweiligen Mediums ohne Cisplatin (nicht abgebildet) normiert wurden (n = 7, 3 technische Replikate).

Ähnlich wie bei den BFTC-905-Zellen konnte im Falle der VMCUB-1-Zellen ebenfalls bei keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied der relativen Zellzahl durch die Behandlung mit KM oder DMEM festgestellt werden (Abb. 56).

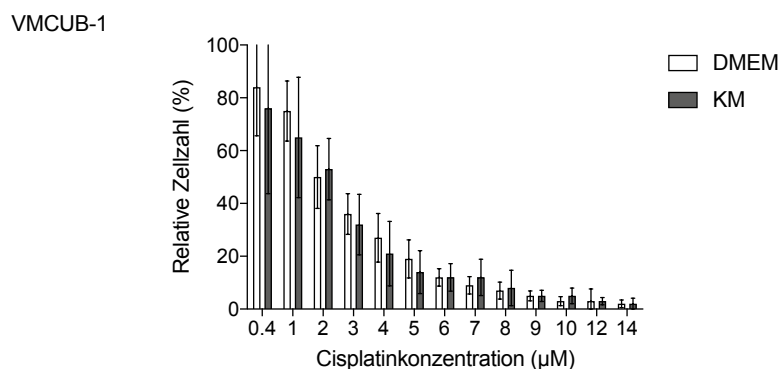


Abb. 56: Einfluss von KM auf die Cisplatin-Sensitivität von VMCUB-1-Zellen. Im Falle der VMCUB-1-Zellen konnte kein resistenzfördernder Effekt des KM festgestellt werden. Dargestellt sind der Mittelwert + SD, welche auf die Kontrolle des jeweiligen Mediums ohne Cisplatin (nicht abgebildet) normiert wurden (n = 9, 3 technische Replikate).

5 Diskussion

5.1 Evaluation eines etwaigen Nährstoffmangels durch die Inkubation mit KM

Ziel dieses Promotionsvorhabens war es, den Einfluss humaner, aus osteoporotischem Knochengewebe stammender Osteoblasten auf diverse tumorprogressive Parameter drei unterschiedlicher muskelinvasiver UCC zu untersuchen. Hierbei wurde durch die Herstellung eines KM der parakrine Einfluss der Osteoblasten im Rahmen der Versuchsansätze *in vitro* simuliert. Als Quelle für die Herstellung des KM diente das im Rahmen der Kultivierung der Osteoblasten verwendete Zellkulturmedium. Über den Inkubationszeitraum von 72 h bzw. 96 h sezernierten die Osteoblasten Wachstumsfaktoren und eine Vielzahl zellulärer Metaboliten in das Zellkulturmedium. Es stellte sich daher die Frage, ob der Nährstoffgehalt des Mediums durch die Kultivierung mit den Osteoblasten bereits in einem solchen Maße reduziert war, dass den UCC, welche nachfolgend mit diesem Medium kultiviert wurden, womöglich wichtige Nährstoffe und folglich ein optimales Nährmedium fehlten. Ein Nährstoffmangel des Tumormikromilieus stellt einen Stressfaktor dar, welcher über diverse Mechanismen den Metabolismus der Tumorzellen und deren Metastasierungspotenzial modulieren kann. Proliferierende Tumorzellen benötigen Nährstoffe für ihr Wachstum und folglich für die Metastasierung, wobei die Tumorangiogenese die Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet (Sato et al., 2007). Aus diesem Grund hat sich für gewisse Tumorentitäten die Therapieform der transarteriellen Chemoembolisation (TACE) als prognoseverbessernd erwiesen, da durch die gezielte Embolisation des arteriellen Versorgungsgebiets des Tumors die Blutversorgung und somit die Zufuhr von u. a. Sauerstoff und Nährstoffen unterbunden wird (Llovet and Bruix, 2003). Jedoch gibt es zunehmend Beweise dafür, dass einige Tumorzellen zelluläre Anpassungsmechanismen an den geringen Nährstoffgehalt entwickeln und dementsprechend eine Widerstandsfähigkeit gegenüber des Nährstoffmangels erwerben (Ahmadiankia et al., 2019). Es wird sogar angenommen, dass diese zelluläre Anpassungsreaktion einen entscheidenden Schritt im Prozess der Tumorprogression und der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika einnimmt (Ahmadiankia, 2020). So stellt die Dysregulation des Energiestoffwechsels ebenfalls eine Fähigkeit dar, welche im Zuge der malignen Transformation seitens der Tumorzellen erworben wird. Eine Möglichkeit, welche Tumorzellen nutzen, um den besonders zu Beginn der Tumorentwicklung herrschenden Nährstoffmangel zu überwinden, stellt den Übergang in die *tumor dormancy* dar. In diesem Ruhestadium erfolgt zwar keine Proliferation der Tumorzellen, jedoch sind sie zu diesem Zeitpunkt unempfindlich gegenüber Chemotherapeutika und tragen daher zur Entstehung von Rezidiven bei (Rossari et al., 2020). Anhand von Prostatakarzinomzellen konnte im Rahmen von *in vitro* Versuchen demonstriert werden, dass der gezielt herbeigeführte

Mangel an Nährstoffen durch Serumentzug Adaptationsmechanismen induzierte, die zu einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress führten. Die Studie ergab, dass diese Anpassungsmechanismen der Prostatakarzinomzellen auf der Aktivierung des NF κ B-Signalwegs und dem nachgeschalteten Apoptoseregulator Bcl-2 basierten, wodurch die Apoptose gehemmt und das vermehrte Überleben der Prostatakarzinomzellen gewährleistet wurde (White et al., 2020). Ob und inwiefern UCC solche Adaptationsmechanismen und folglich einen aggressiveren Phänotyp unter Nährstoffrestriktion erlangen, ist bislang unklar.

Um der Frage nachzugehen, ob im Rahmen dieser Forschungsarbeit den UCC durch die Inkubation im KM womöglich ein optimales Nährmedium gefehlt hat, wurde die Zellviabilität der UCC zusätzlich unter dem Zusatz von FBS zu dem Osteoblasten-KM untersucht. Für die UMUC-3-Zellen konnte unter dem Zusatz keine Veränderung der relativen Zellviabilität detektiert werden, wodurch anzunehmen ist, dass die gesammelten Ergebnisse durch einen etwaigen Nährstoffmangel unbeeinflusst blieben.

Für die VMCUB-1- und BFTC-905-Zellen konnte jedoch unter dem Zusatz von 3 % FBS eine signifikant höhere Proliferationsrate und Zellzahl ermittelt werden. Diese Beobachtung könnte auf einen Nährstoffmangel in den Versuchsbedingungen hindeuten, was möglicherweise die Wachstumsbedingungen der beiden UCC in den Experimenten beeinträchtigt hat. Wenn man jedoch von einer Nährstoffrestriktion im Falle der BFTC-905- und VMCUB-1-Zellen ausgeht, könnte diese, gemäß den beschriebenen Forschungsergebnissen von Ahmadiankia et al. (2019), zur Entwicklung eines aggressiveren Phänotyps beigetragen haben, indem die Tumorzellen durch den Erwerb von Adaptationsmechanismen in der Lage gewesen sind, sich an ungünstige Umgebungsbedingungen anzupassen. Gestützt wird diese Annahme durch die in dieser vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse der Migrationsanalyse. Hierbei zeigten die BFTC-905- und VMCUB-1-Zellen im Gegensatz zu den UMUC-3-Zellen ein erhöhtes migratorisches Potenzial unter dem Einfluss des Osteoblasten-KM. Diese Beobachtung lässt schlussfolgern, dass der zuvor bestehende Nährstoffmangel möglicherweise Adaptationsmechanismen in den Zellen hervorgerufen haben könnte, die ihre Migrationsfähigkeit unter dem Einfluss des Osteoblasten-KM zusätzlich erhöht haben. Eine der Herausforderungen in zukünftigen Behandlungsansätzen der Tumorthherapie wird es sein, herauszufinden, inwiefern Tumorzellen an lokale Stressbedingungen angepasst sind, und diese spezifischen Anpassungsmechanismen zu identifizieren und zugunsten der Patientinnen und Patienten zu modifizieren. Jedoch sollte an dieser Stelle ebenfalls erwähnt werden, dass FBS essenzielle proliferations- und überlebensfördernde Komponenten wie Vitamine, Hormone, Spurenelemente und Wachstumsfaktoren enthält, wodurch ebenfalls die Proliferation der Tumorzellen induziert wird (Van der Valk et al.,

2018). Es lässt sich somit nicht abschließend klären, ob die erhöhte Proliferationsrate der BFTC-905- und VMCUB-1-Zellen unter dem Zusatz von 3 % FBS primär auf die Kompensation eines Nährstoffmangels oder auf die direkte Stimulation durch die im FBS enthaltenen proliferationsfördernden Faktoren zurückzuführen ist.

5.2 Einfluss der humanen Osteoblasten auf tumorprogressive Parameter der UCC

5.2.1 Einfluss des Osteoblasten-KM auf die Proliferation

Ein charakteristisches Merkmal maligner Transformationen stellt die unkontrollierte Proliferation von Zellverbänden dar. Hierbei ist eine erhöhte Proliferationsrate mit einer schlechteren Prognose sowie einem schlechteren prognostischen Ansprechen auf die Therapie mit Chemotherapeutika assoziiert (Baak, 1990). Im Gegensatz zu normalen Zellen gelingt es neoplastischen Zellen, sich der strengen Regulation des Zellzyklus, welche durch Umgebungssignale initiiert oder gehemmt wird, zu entziehen. Daraus ergibt sich die unkontrollierte Proliferation maligner Zellreihen. Ursächlich hierfür sind u. a. eine dysregulierte Expression von Schlüsselenzymen, welche an Zellzyklus-Kontrollpunkten beteiligt sind, wie die cyclin-abhängige Kinase (CDK) und das Retinoblastom-Protein (Rb), welches als Tumorsuppressor fungiert. Die unkontrollierte Zellproliferation ist ein wesentlicher Bestandteil der Tumorentstehung und der Metastasierung (Feitelson et al., 2015). Das Ziel der meisten Krebstherapien besteht daher darin, die Proliferation der Tumorzellen zu hemmen, um somit deren Ausbreitung und Metastasierung zu verhindern (Amjad et al., 2023). Ein Ziel dieser Arbeit war es zu eruieren, ob die von Osteoblasten sezernierten parakrinen Faktoren in der Lage sind, das Proliferationsvermögen der UCC zu modulieren und folglich deren Tumorprogression zu fördern. In der Literatur wurde bereits ein proliferationsfördernder Effekt des Osteoblasten-KM auf Zellen des Mammakarzinoms beschrieben, welcher am ehesten auf das Vorhandensein der Wachstumsfaktoren TGF- β und PDGF zurückzuführen war (Brama et al., 2007). Ein ebenfalls proliferationsfördernder Effekt der Osteoblasten konnte für die Tumorentität des Prostatakarzinoms (PC3-Zellen) beobachtet werden. So wurde nach einer viertägigen Inkubation eine Steigerung der Proliferationsrate der PC3-Zellen um 25 % durch den Einfluss des Osteoblasten-KM detektiert (Millimaggi et al., 2006). Im Einklang mit dem bereits in der Literatur beschriebenen proliferationsfördernden Einfluss der Osteoblasten konnte in dieser vorliegenden Dissertation ebenfalls ein signifikanter Anstieg der relativen Zellzahl der BFTC-905-Zellen unter dem Einfluss des Osteoblasten-KM beobachtet werden. Der Effekt auf die relative Zellzahl betrug etwa das Sechsfache im Vergleich zu den BFTC-905-Zellen, die in DMEM kultiviert wurden. Die gesammelten Ergebnisse der Proliferationsanalyse demonstrieren somit, dass die BFTC-905-Zellen trotz oder in Folge des in Abschnitt 5.1

beschriebenen Nährstoffmangels unter dem Einfluss der Osteoblasten in ihrer Proliferationskapazität *in vitro* signifikant gefördert wurden. Diese Beobachtung stützt somit die Annahme, dass die BFTC-905-Zellen Adaptationsmechanismen an die restriktiven Bedingungen entwickelt haben könnten. Ein solcher Effekt konnte weder für die VMCUB-1- noch für die UMUC-3-Zellen detektiert werden.

5.2.2 Einfluss auf die Zellmigration und Invasivität

Das Migrations- und Invasionsvermögen von Tumorzellen übernimmt entscheidende Funktionen im Prozess der Metastasierung und stellt somit eine wesentliche Einflussgröße der Tumorprogression dar. Von Osteoblasten synthetisierte und sezernierte Metaboliten nehmen hierbei wichtige Funktionen ein, indem sie sowohl die Proliferationsrate als auch die migratorische Kapazität maligner Zellen fördern (Chen et al., 2014). Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass von Osteoblasten sezernierte Faktoren wie TGF- β in der Lage sind das migratorische und invasive Potenzial von Prostatakarzinomzellen *in vitro* zu fördern (Festuccia et al., 1999). Karlsson et al. (2018) wiesen nach, dass TGF- β die Migration von Prostatakarzinomzellen förderte, indem es zur Ausbildung von Zellausläufern beitrug, woraus ein aggressiverer Phänotyp resultierte. Diese Beobachtung wurde dadurch gestützt, dass eine solche Modulation des Phänotyps durch die gezielt herbeigeführte Inhibierung des TGF- β Signalwegs ausblieb (Karlsson et al., 2018). Ähnliches konnte anhand der MCF-7-Brustkarzinom-Zelllinie demonstriert werden, da sie unter dem Einfluss des Osteoblasten-KM ebenfalls Pseudopodien entwickelte, wodurch ihr zusätzliche migratorische Fähigkeiten verliehen wurden. Ein weiterer wichtiger Faktor, der im Zusammenhang mit der Zellmigration von MCF-7 identifiziert wurde, stellt das Chemokin IL-8 dar. Chen et al. (2014) demonstrierten, dass Osteoblasten eine parakrine Quelle von IL-8 darstellen. Es wird angenommen, dass die Expression von IL-8 mit der Aggressivität verschiedener Tumorentitäten, wie dem Melanom und dem Mammakarzinom, korreliert, indem sie u. a. zu einer Förderung der Proliferation und Migration sowie der Induktion der Angiogenese und EMT beiträgt (Chen et al., 2014). Zudem konnte anhand von Zellen des Mammakarzinoms demonstriert werden, dass Osteoblasten aus osteoporotischem Knochengewebe bei Kontakt mit den Tumorzellen vermehrt IL-8 sezernierten (Pagani et al., 2015). Dies lässt annehmen, dass der direkte Kontakt zwischen Tumorzellen und aus osteoporotischem Knochen isolierten humanen Osteoblasten zu einer modifizierten Zytokinexpression führt, was möglicherweise zur Tumorprogression oder zu einem veränderten Tumor-Mikromilieu beiträgt. Torricelli et al. (2002) demonstrierten zudem, dass Osteoblasten unter osteoporotischen Zuständen vermehrt das proinflammatorische Zytokin IL-6 exprimierten (Torricelli et al., 2002). Weitere Studien zeigten, dass die vermehrte IL-6-

Expression in Harnblasenkarzinomzellen mit einer verstärkten EMT und folglich gesteigerter Invasivität sowie einer erhöhten Angiogenese und einer reduzierten Überlebensrate assoziiert ist (Chen et al., 2013). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Osteoblasten unter osteoporotischen Zuständen durch die vermehrte IL-6-Sekretion u. a. zu einer erhöhten Invasivität und folglich zur Tumorprogression des Harnblasenkarzinoms beitragen könnten. Ebenso wird dem von Osteoblasten synthetisierten Protein RANKL eine chemotaktische Wirkung zugesprochen, indem es die Migration einiger RANK-exprimierender Tumorzellen fördert (Armstrong et al., 2008). So konnte durch die Interaktion von rekombinantem RANKL mit RANK-exprimierenden Zellen des malignen Melanoms sowie des Mamma- und Prostatakarzinoms eine ausgeprägte Aktinpolymerisation nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt schlussfolgern, dass das RANK/RANKL-System eine wichtige Funktion im Prozess der Knochenmetastasierung einnimmt, indem RANKL die Migration RANK-exprimierender Tumorzellen in Richtung des Knochengewebes fördert (Jones et al., 2006). Auch in Bezug auf das Invasionsvermögen von Tumorzellen übt der von Osteoblasten sezernierte Faktor TGF- β einen wesentlichen Einfluss aus. Anhand von Zelllinien des Prostatakarzinoms wurde gezeigt, dass TGF- β eine Hochregulierung der Integrine $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\beta 1$ in den Tumorzellen induziert. Diese Integrine nehmen eine entscheidende Funktion im Prozess der Zelladhäsion und -migration ein. Die durch TGF- β induzierte Erhöhung der Integrinexpression in Prostatakarzinomzellen verstärkte deren Bindung an Bestandteile der ECM, wie Laminin und Kollagen Typ I. Dies führte zu einem gesteigerten Invasionsvermögen der Tumorzellen und begünstigte deren Ansiedlung im Knochen. Diese beschriebenen Beobachtungen von Festuccia et al. (1999) legen nahe, dass das u. a. von Osteoblasten sezernierte TGF- β das Metastasierungspotenzial von Prostatakarzinomzellen beeinflusst, indem es ihre Fähigkeit zur Penetration der Basalmembran modulieren kann. Dies wiederum erleichtert die Ansiedlung und das Überleben der Tumorzellen in der Knochenmikroumgebung (Nakai et al., 1992, Festuccia et al., 1999). Weitere in der Literatur beschriebene, durch Osteoblasten-KM vermittelte invasionsfördernde Mechanismen umfassen die Induktion von MMP-2 und MMP-9 in Prostatakarzinomzellen. Diese Enzyme sind in der Lage, die ECM zu degradieren und folglich den Prozess der Invasion zu vereinfachen. Die Degradation der ECM stellt eine essenzielle Bedingung für die Invasion von Tumorzellen dar (Millimaggi et al., 2006).

Im Rahmen dieser vorliegenden Forschungsarbeit sollte daher die Frage beantwortet werden, ob die von Osteoblasten sezernierten parakrinen Faktoren ebenfalls die Invasion und Migration von UCC fördern können. Die Migrationsanalysen demonstrierten, dass durch die Inkubation mit Osteoblasten-KM eine signifikante Steigerung der migratorischen

Kapazität der BFTC-905 und VMCUB-1-Zellen erzielt werden konnte. Im Falle der VMCUB-1-Zellen wurde bereits nach 4 h und für die BFTC-905-Zellen nach 8 h eine signifikante Zunahme der Migration beobachtet. Auf die UMUC-3-Zellen übte das Osteoblasten-KM keinen migrationsfördernden Einfluss aus. Auch im Zuge der Invasionsanalysen konnte in der vorliegenden Arbeit ein signifikant fördernder Einfluss des Osteoblasten-KM auf alle untersuchten UCC beobachtet werden. Hierbei zeigte sich die Auswirkung am deutlichsten bei den BFTC-905-Zellen, welche unter der Wirkung der Osteoblasten einen 5-fachen Anstieg der invadierten Zellen im Vergleich zur DMEM-Kontrollgruppe aufwiesen. An dieser Stelle sollte noch erwähnt werden, dass im Falle der BFTC-905-Zellen nicht auszuschließen ist, dass der beschriebene invasionsfördernde Effekt der Osteoblasten durch den ebenfalls proliferationsfördernden Effekt des KM unterstützt worden sein könnte, da die publizierte Verdopplungszeit der BFTC-905-Zellen bei 21,4 h liegt (DSMZ, 2024). Eine weitere Überlegung wäre, dass die beschriebene Nährstoffrestriktion im Falle der BFTC-905-Zellen vermutlich die stärksten Adaptationsmechanismen induziert hat. Die signifikant gesteigerte Proliferations-, Migrations- und Invasionsfähigkeit dieser Zelllinie deutet darauf hin, dass sie über eine erhöhte Anpassungskapazität unter restriktiven Bedingungen verfügt und ihre Überlebensstrategien effizient optimieren kann.

5.2.2.1 Einfluss der Osteoblasten auf die CXCR4-Proteinexpression

Der CXCL12/CXCR4-Achse wird eine hohe Relevanz im Pathomechanismus der Knochenmetastasierung zugesprochen, da CXCL12 als chemotaktischer Botenstoff der CXCR4-exprimierenden Tumorzellen fungiert. CXCL12 stellt hierbei den am besten erforschten Liganden des Chemokinrezeptors CXCR4 dar und wird zu einem hohen Anteil von Osteoblasten exprimiert. Aus diesem Grund nehmen Osteoblasten eine essenzielle Funktion in der Entstehung von Knochenmetastasen ein (Chatterjee et al., 2014, Wang et al., 2006, Neiva et al., 2005). Interagieren CXCR4-positive Harnblasenkarzinomzellen mit CXCL12, resultiert dies in einem Anstieg ihres invasiven und migratorischen Potentials (Retz et al., 2005). Auslöser hierfür ist die Aktivierung diverser Signaltransduktionswege, u. a. des PI3K/Akt-, MAPK-, und IP3-Signalwegs, die Schlüsselfunktionen im Rahmen der Proliferation, Chemotaxis und des Zellüberlebens einnehmen (Nazari et al., 2017). Retz et al. (2005) konnten mittels mRNA-Expressionsanalysen feststellen, dass das CXCR4-Expressionsniveau von UCC, u. a. ebenfalls von UMUC-3-Zellen, mit dem Tumorprogress korrelierte und dass diese CXCR4 überexprimierten. Des Weiteren wurde demonstriert, dass der Einfluss von CXCL12 zur Aktinpolymerisation und Ausbildung von Pseudopodien führte und den Harnblasenkarzinomzellen dadurch zusätzliche migratorische Fähigkeiten verliehen wurden (Retz et al., 2005). Die Funktion des Rezeptorproteins CXCR4 im Rahmen der Metastasierung wird noch deutlicher ersichtlich, wenn man den Einfluss von

CXCR4-Antagonisten auf tumorprogressive Parameter hin untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass CXCR4-Antagonisten das Tumorwachstum verlangsamen, die Tumorlast reduzieren und die Ansprechrate auf zytotoxische Therapien für diverse Tumorentitäten erhöhen (Chatterjee et al., 2014). So konnte im Falle des Prostatakarzinoms *in vivo* demonstriert werden, dass der Einsatz von CXCR4-Antagonisten die Ausbildung von Knochenmetastasen reduzierte, wodurch die Relevanz der CXCL12/CXCR4-Achse im Prozess der Knochenmetastasierung zusätzlich untermauert wird (Neiva et al., 2005). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss des Osteoblasten-KM auf die CXCR4-Proteinexpression in den UCC untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von Cisplatin in diesem Zusammenhang beobachtet. Hierbei konnte nur im Falle der BFTC-905-Zellen ein tendenzieller Anstieg der CXCR4-Proteinmenge durch die Inkubation mit Osteoblasten-KM oder Cisplatin beobachtet werden. Dies lässt annehmen, dass die durch Osteoblasten induzierte vermehrte Expression von CXCR4 in den BFTC-905-Zellen die Knochenansiedlung und folglich den Prozess der Knochenmetastasierung begünstigen könnte. Es lässt sich festhalten, dass CXCL12 eine bedeutende chemotaktische Wirkung auf CXCR4-positive UCC ausübt und die Interaktion von Ligand und Rezeptor zum Tumorprogress sowie zur Knochenmetastasierung beiträgt. Basierend auf dieser Erkenntnis könnte die CXCL12/CXCR4-Achse ein vielversprechendes Therapieziel in der Behandlung von Knochenmetastasen darstellen.

5.2.3 Einfluss des Osteoblasten-KM auf die Proteinexpression von CD44

Im Rahmen der Analyse invasiver Eigenschaften von Tumorzellen übt CD44, der ebenfalls als membranständiger HA-Rezeptor fungiert und dessen Wechselwirkung mit seinen zugehörigen Liganden Migrations- und Invasionsprozesse fördert, eine zentrale Funktion aus (Senbanjo and Chellaiah, 2017). So konnte anhand von Zelllinien des Mammakarzinoms demonstriert werden, dass der *knock-out* von CD44 die Invasion der Tumorzellen und folglich den Prozess der Metastasierung inhibierte (Nam et al., 2015). Ein weiterer Anhaltspunkt, weshalb eine Hemmung CD44-spezifischer Interaktionen in Zukunft erfolgsversprechende therapeutische Ergebnisse in Bezug auf die Reduktion der Tumorprogression von UCC liefern könnte, stellt die Beobachtung dar, dass die durch die Hemmung der HA-Synthese verbundene Reduktion der HA-CD44-Interaktion *in vitro* zu einer Erhöhung der Chemosensitivität gegenüber Cisplatin führte (Anand et al., 2019). Im Zusammenhang mit dem MIBC scheint eine erhöhte CD44-Expression mit einer erhöhten Tumoraggressivität, Lymphknotenbefall und einer reduzierten Lebenserwartung zu korrelieren (Wu et al., 2018a). Wu et al. (2017) demonstrierten zudem, dass eine vermehrte CD44-Expression in Harnblasenkarzinomzellen mit einem schlechteren Ansprechen auf zytostatische und strahlentherapeutische Behandlungen korrelierte (Wu et al., 2017).

Neben seiner Funktion als Invasivitätsmarker wurde CD44 ebenfalls als sogenannter Krebsstammzellmarker identifiziert. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Oberflächenglykoprotein CD44 eine höhere Expressionsrate in diversen Tumorentitäten sowie in Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften aufwies (Chen et al., 2018). Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften besitzen ein hohes tumorigenes Potenzial, da sie sich durch ein hohes Proliferations- und Selbsterneuerungspotenzial sowie eine hohe Resistenz gegenüber Zytostatika auszeichnen. All diese Eigenschaften fördern das Auftreten von Metastasen und Residualtumoren (Visvader and Lindeman, 2008). Bereits 1993 beobachteten Seiter et al. (1993), dass der monoklonale Antikörper Anti-CD44v im Mausmodell das Auftreten von Lungen- und Lymphknotenmetastasen beim Pankreaskarzinom reduzieren konnte (Seiter et al., 1993). Seither wurden im Rahmen der zielgerichteten Therapie gegen Stammzeleigenschaften-besitzende Tumorzellen mehrere Anti-CD44-Antikörper erforscht, welche die Eindämmung der Tumorprogression diverser Tumorentitäten in Mausmodellen herbeiführen konnten (Jin et al., 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit konnte für die VMCUB-1-Zellen eine signifikante Steigerung des CD44-Expressionsniveaus und für die BFTC-905-Zellen ein tendenzieller Anstieg durch den Einfluss des Osteoblasten-KM erfasst werden. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass die Osteoblasten aus osteoporotischem Knochengewebe durch die Hochregulierung von CD44 im Falle der VMCUB-1-Zellen nicht bloß deren invasives Potenzial fördern, sondern auch zusätzlich deren Plastizität. Das Erlangen von stammzellähnlichen Eigenschaften geht mit einer Förderung des Selbsterneuerungs- und Proliferationsvermögens sowie der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika einher (Hassn Mesrati et al., 2021). Die Förderung der CD44-Expression durch die Osteoblasten erhöht somit die Aggressivität sowie Therapieresistenz des Harnblasenkarzinoms. Die geschilderten Ergebnisse lassen annehmen, dass zumindest im Falle der VMCUB-1-Zellen die pharmakologische Adressierung des CD44-Rezeptors eine zukünftige Strategie zur Eindämmung des Metastasierungsvermögens und folglich einen antikanzerogenen Therapieansatz darstellen könnte.

5.2.4 Einfluss des Osteoblasten-KM auf die Proteinexpression von CK14

Eine vermehrte Expression von CK14 ist mit einer schlechteren Prognose des Harnblasenkarzinoms assoziiert und geht mit einer erhöhten Muskelinvasivität und einem aggressiveren Phänotyp einher. Mehrere Forschungsergebnisse legen nahe, dass eine veränderte CK14-Expression womöglich ein frühes Ereignis bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms darstellt und es daher als Marker der Frühdiagnostik in Betracht gezogen werden könnte (Al-Sharaky et al., 2021). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Osteoblasten-KM auf die CK14-Expression der UCC

untersucht. Zudem wurde in diesem Zusammenhang eruiert, ob der Zusatz von Cisplatin zum KM einen modulierenden Einfluss auf dieses Expressionsniveau hat. Skowron, Hoffmann et al. (2015) zeigten in einer Vorgängerarbeit, dass die epithelialen Zelllinien BFTC-905 und VMCUB-1 CK14 exprimieren (Skowron et al., 2015). Dies lässt sich mit den in dieser Arbeit gesammelten Ergebnissen in Einklang bringen. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit auch für die UMUC-3-Zellen ein CK14-Expressionslevel detektiert werden. Jedoch konnte keine Modulierung des CK14-Expressionsniveaus der UCC durch den Einfluss des Osteoblasten-KM beobachtet werden.

5.2.5 Auswirkungen des Osteoblasten-KM auf die EMT

Tumorzellen sind hoch anpassungsfähig und können eine Vielzahl diverser Phänotypen annehmen, wodurch sie auf die ständig wechselnden externen Umweltbedingungen reagieren können. Durch diese zelluläre Plastizität generieren die Tumorzellen einen Überlebensvorteil, welcher den Prozess der Metastasierung begünstigt (Torborg et al., 2022). Damit Tumorzellen die Fähigkeit zur Migration und folglich zur Metastasierung erlangen, durchlaufen sie einen solchen Phänotypwechsel, bei welchem sie durch die Umgestaltung ihrer Zellpolarität invasive Eigenschaften erlangen (Roche, 2018). Dieser Prozess, welcher als EMT bezeichnet wird, steht im Rahmen der metastatischen Kaskade an erster Stelle und umfasst die Umwandlung eines epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp (Rucci and Teti, 2018, Rucci and Teti, 2010, van der Horst et al., 2012). Im Zuge dieser Transformation werden epitheliale Beschaffenheiten durch mesenchymale ersetzt, indem Zelladhäsionsmoleküle, wie E-Cadherin, Desmoplakin und β -Catenin herunter- und mesenchymale Marker, wie Vimentin, Fibronectin und α -SMA heraufreguliert werden. Durch die EMT ist es den Tumorzellen möglich, den Primärtumor zu verlassen, durch die ECM zu migrieren, zu invadieren und folglich zu metastasieren (Wu et al., 2018b, Zhang et al., 2020, Serrano-Gomez et al., 2016). Ein zentraler Regulator der EMT, besonders in späteren Tumorstadien, stellt das Zytokin TGF- β dar, welches maßgeblich die EMT induziert und dementsprechend eine entscheidende Funktion im Prozess der malignen Entartung von Zellen einnimmt (Zhang et al., 2020). Untersuchungen an Zellen des UC haben gezeigt, dass eine TGF- β -Überexpression mit einem fortgeschrittenen pathologischen Tumorstadium assoziiert war und folglich mit einer schlechteren Prognose korrelierte (Stojnev et al., 2019). Um den Einfluss humaner Osteoblasten auf die Aktivität des multifunktionalen Zytokins TGF- β und dessen Signalweg zu analysieren, wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit die Proteinexpression von PAI-1 und dem Transkriptionsfaktor SMAD4 bestimmt. PAI-1 und SMAD4 eignen sich als zuverlässige Marker für eine verstärkte Aktivierung des TGF- β -Signalwegs, da TGF- β über die

intrazellulären SMAD-Proteine die PAI-1-Produktion induziert (Dong et al., 2002). TGF- β entfaltet seine Wirkung durch die Bindung an zwei Rezeptoren, welche eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität besitzen. Die Interaktion von TGF- β mit dem TGF- β -Rezeptor Typ 2 führt zur Phosphorylierung des TGF- β -Rezeptor Typ 1 und folglich zu dessen Aktivierung. SMAD-Proteine, wie u. a. SMAD2 und SMAD3 werden vom aktivierten TGF- β -Rezeptor Typ 1 phosphoryliert und bilden einen Komplex mit SMAD4. Dieser Komplex transloziert nun in den Zellkern und führt zur Transkription spezifischer Gene, welche die epithelialen Beschaffenheiten der Zelle herunterregulieren und die Transformation in einen mesenchymalen Phänotyp fördern (Xu et al., 2009b). Ebenso kommt es u. a. zur Transkription des PAI-1-Gens (Tsuchida et al., 2003). Bei diversen Tumorentitäten ist die erhöhte Expression von PAI-1 mit einer schlechteren Prognose des Krankheitsverlaufs assoziiert. Eine solche Korrelation wurde ebenfalls für das Harnblasenkarzinom beschrieben (Becker et al., 2010). PAI-1 wird im Prozess der Angiogenese eine stimulierende Funktion zugeschrieben, wodurch es eine wichtige Funktion bei der Regulierung des Tumorwachstums einnimmt (Isogai et al., 2001, McMahon et al., 2001). Zudem übt PAI-1 eine antiapoptotische Wirkung aus, indem es die Effektor-Caspase 3 inhibiert und folglich Tumorzellen vor dem Chemotherapie-induzierten Zelltod bewahrt (Schneider et al., 2008). Darüber hinaus demonstrierten *in vitro* Experimente, dass Antikörper gegen PAI-1 invasive und migratorische Eigenschaften von Fibrosarkomzellen signifikant reduzieren konnten (Brooks et al., 2000).

Die Resultate der vorliegenden Forschungsarbeit belegen, dass das Osteoblasten-KM eine signifikant höhere PAI-1-Konzentration aufwies als die DMEM-Kontrollgruppe. Jedoch konnte kein signifikanter Einfluss auf die PAI-1-Expression der UCC durch das Osteoblasten-KM nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass die Osteoblasten keinen Einfluss auf die PAI-1-Expression der UCC ausüben, jedoch selbst in der Lage sind, eine hohe Konzentration an PAI-1 zu sezernieren. Dieses Ergebnis wird dadurch gestützt, dass ebenfalls kein modulierender Effekt des KM auf das SMAD4-Expressionsniveau beobachtet werden konnte.

Um den Einfluss von humanen Osteoblasten auf den zellulären Phänotyp der UCC detaillierter analysieren zu können, wurden ergänzend der epitheliale Marker E-Cadherin auf mRNA- und Proteinebene und die mesenchymalen Adhäsionsmoleküle Vimentin und α -SMA unter dem Einfluss des KM auf Proteinebene bestimmt sowie Immunfluoreszenzfärbungen von E-Cadherin und Vimentin angefertigt. Zusätzlich zum Effekt des KM wurde auf Ebene der Protein- und Genexpression auch der Einfluss einer Cisplatinbehandlung untersucht.

Auf immunzytochemischer Ebene konnte im Falle der VMCUB-1-Zellen eine Intensitätszunahme der Vimentin-Färbung durch den Einfluss des Osteoblasten-KM detektiert werden. Unterstützt wird diese Beobachtung durch den tendenziellen Anstieg des Vimentin-Expressionsniveaus unter der Einwirkung des KM. Zudem konnte eine signifikante Abnahme des E-Cadherin-Expressionsniveaus unter dem Zusatz von Cisplatin zu dem KM detektiert werden. Diese geschilderten Beobachtungen lassen vermuten, dass das Osteoblasten-KM in der Lage zu sein scheint, Parameter der EMT im Sinne eines aggressiveren Phänotyps zu modulieren, indem mesenchymale Marker der VMCUB-1-Zellen, welche ursprünglich einen epithelialen Phänotyp aufweisen (Skowron et al., 2015), potenziell hochreguliert werden. Diese Annahme unterstützt zudem die erzielten Forschungsergebnisse bezüglich des stimulierenden Einflusses des Osteoblasten-KM auf das Migrations- und Invasionsvermögen der VMCUB-1-Zellen, welche in Abschnitt 5.2.2 veranschaulicht wurden. Zudem scheint es, dass in einer durch Osteoblasten-KM modifizierten Umgebung die Behandlung mittels Cisplatin zu einer signifikanten Reduktion epithelialer Beschaffenheiten der VMCUB-1-Zellen beiträgt. Dies könnte bedeuten, dass das KM die Wirksamkeit des Chemotherapeutikums herabsetzt, indem es die EMT der Tumorzellen fördert und damit womöglich zur Entstehung von Resistenzmechanismen beiträgt.

Im Falle der BFTC-905-Zellen, bei denen es sich ursprünglich ebenfalls um eine epitheliale Zelllinie handelt (Skowron et al., 2015), lässt die immunzytochemische Färbung eine Intensitätszunahme des epithelialen Markers E-Cadherin unter dem Einfluss des KM annehmen. Unterstützt wird diese Beobachtung durch einen tendenziellen Anstieg der E-Cadherin-Expression auf Protein- und Genexpressionsebene. Dies lässt annehmen, dass das Osteoblasten-KM die epitheliale Integrität der Zellen aufrechterhält und zu einer Verstärkung des epithelialen Charakters im Sinne einer MET-Induktion führen könnte. Die Rolle der MET im Prozess der Metastasierung ist nicht abschließend geklärt. Einerseits konnte anhand von Harnblasenkarzinomzellen demonstriert werden, dass eine Zunahme epithelialer Eigenschaften die Tumorprogression unterdrückt (Su et al., 2019). Andererseits gibt es jedoch auch Belege, welche der MET eine progressionsrelevante Funktion im Prozess der Metastasierung zuschreiben. Anhand von Zellen des Ovarialkarzinoms konnte demonstriert werden, dass eine Überexpression des epithelialen Markers E-Cadherin mit der malignen Transformation korreliert und folglich mit der Karzinogenese dieser Tumorentität assoziiert ist. Zudem besteht die Annahme, dass die MET, ebenso wie die EMT, als Parameter der zellulären Plastizität essenziell für eine erfolgreiche Metastasierung ist (Hugo et al., 2007). Die Relevanz der Überexpression epithelialer Marker für die Entstehung von Metastasen konnte ebenfalls anhand von Untersuchungen an UCC (TSU-Pr1) nachgewiesen werden. Chaffer et al. (2006) demonstrierten, dass die

Rückkehr der Tumorzellen zu einem epithelialen Phänotyp mit einer schlechteren Prognose korrelierte, indem das Wiedererlangen epithelialer Eigenschaften den Zellen die Fähigkeit zur Bildung von Sekundärtumoren verlieh (Chaffer et al., 2006). Gestützt wird diese Beobachtung durch McConkey et al. (2009), welche anhand von muskelinvasiven UCC feststellten, dass die Transformation in einen epithelialen Phänotyp mit einer schlechteren Prognose assoziiert war als durch das Erlangen mesenchymaler Eigenschaften im Rahmen der EMT (McConkey et al., 2009). Bezogen auf die in der vorliegenden Forschungsarbeit gesammelten Ergebnisse könnte dies bedeuten, dass im Falle der BFTC-905-Zellen die beschriebene tendenzielle Zunahme des E-Cadherin-Expressionsniveaus mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Sekundärtumoren einhergehen könnte.

Die UMUC-3-Zellen zeigten in der Immunfluoreszenzfärbung eine Abnahme der Intensität der E-Cadherin-Färbung unter dem Einfluss des Osteoblasten-KM. Auf Ebene der Genexpression konnte diese Beobachtung durch eine tendenzielle Abnahme des E-Cadherin-Expressionsniveaus sowie eine tendenzielle Zunahme der Vimentin-Expression gestützt werden. Somit lassen diese Beobachtungen vermuten, dass das Osteoblasten-KM die UMUC-3-Zellen, welche ursprünglich bereits einen mesenchymalen Phänotyp aufweisen, in ihren mesenchymalen Eigenschaften und dem damit verbundenen Zellverhalten fördert.

Karlsson et al. (2018) zeigten, dass Prostatakarzinomzellen unter dem Einfluss von Osteoblasten-KM eine gesteigerte Migrationsfähigkeit aufwiesen, die auf zytoskelettale Umstrukturierungen zurückzuführen war. Veränderungen der Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin konnten dabei jedoch als Ursache ausgeschlossen werden (Karlsson et al., 2018). Ähnlich könnten auch die in dieser vorliegenden Forschungsarbeit gesammelten Ergebnisse interpretiert werden. Es kann nicht abschließend geklärt werden, ob die beobachtete Zunahme des migratorischen und invasiven Potenzials durch eine Veränderung der Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin bedingt ist, da nur Tendenzen und keine signifikante Modifikation festgestellt wurden. Die Zunahme der Migration und Invasion unter dem Einfluss des Osteoblasten-KM könnte daher ebenfalls auf andere Mechanismen, wie etwa eine Umstrukturierung des Zytoskeletts, zurückzuführen sein. Eine Möglichkeit, dieser Fragestellung weiter nachzugehen, wäre, in zukünftigen Untersuchungen die Auswirkungen des Osteoblasten-KM auf die molekularen Grundlagen morphologischer Veränderungen in UCC beispielsweise mithilfe proteomischer Methoden genauer zu analysieren. Die vorliegende Forschungsarbeit hat durch ihre umfangreichen Untersuchungen auf verschiedenen Ebenen einen Einblick in die Wirkung von Osteoblasten auf UCC ermöglicht. Da in dieser Arbeit viele verschiedene Aspekte der Tumorprogression und Metastasierung untersucht wurden, war die Anzahl der möglichen Versuchsdurchläufe dementsprechend begrenzt. Dies führte stellenweise zu hohen

Standardabweichungen. Um die statistische Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verbessern und die beobachteten Schwankungen zu verringern, könnte in zukünftigen Studien eine größere Anzahl biologischer Replikate in den Protein- und Genexpressionsanalysen einbezogen werden. Dies würde die Aussagekraft der Ergebnisse weiter stärken und eine noch fundiertere Bewertung des Einflusses von Osteoblasten auf die EMT ermöglichen.

5.2.6 Einfluss des KM auf den zellulären Immunphänotyp

Mithilfe der hochregulierten Expression der Oberflächenproteine CD274 und CD273, auch als PD-L1 und PD-L2 bekannt, gelingt es Tumorzellen, sich der Immunantwort der T-Zellen zu entziehen. PD-L1 und PD-L2 fungieren als Liganden des auf T-Zellen präsentierten Oberflächenproteins PD1. Durch die verstärkte Wechselwirkung zwischen den Liganden und dem PD1-Rezeptor wird die Aktivität der T-Zellen gehemmt, wodurch die gezielte Immunantwort seitens der T-Zellen unterbunden wird. Folglich können die Tumorzellen, indem sie sich vor einer effektiven Immunantwort schützen, ungehindert proliferieren und schlussendlich metastasieren. Durch die Überexpression von PD-L1 und PD-L2 erwerben die Tumorzellen dementsprechend einen Überlebensvorteil (Zak et al., 2017). Fortschritte im Verständnis der Interaktionsmechanismen zwischen dem körpereigenen Immunsystem und den Tumorzellen haben in den letzten Jahren neue therapeutische Ansätze für diverse Tumorentitäten hervorgebracht. Insbesondere für Patientinnen und Patienten mit metastasiertem Harnblasenkarzinom, welche sich nicht für eine Cisplatin-basierte Chemotherapie eignen, scheint die Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren erfolgsversprechende Ergebnisse zu erzielen, sodass PD-L1-Inhibitoren wie Atezolizumab und Pembrolizumab inzwischen als Erst- und Zweitlinientherapie zugelassen worden sind (Lopez-Beltran et al., 2021). Anhand immunhistochemischer und durchflusszytometrischer Analysen konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte PD-L1-Expression mit einer gesteigerten Aggressivität des UC und einem ungünstigeren Gesamtüberleben korreliert (Nakanishi et al., 2007). Im Falle des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) konnte zudem demonstriert werden, dass die Expression von PD-L1 und PD-L2 durch TGF- β gefördert wurde. Weitere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass das gezielte Eindämmen der TGF- β /PD-L1-Achse zu einer Reduktion der Migration und des Zellwachstums führen sowie die Wirksamkeit von Fluorouracil gegenüber kolorektalen Karzinomzellen verstärken könnte (Khalili-Tanha et al., 2023). In dieser vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg der CD273-Expression für die UMUC-3- und VMCUB-1-Zellen durch die KM-Inkubation beobachtet werden. Zudem exprimierten die in Osteoblasten-KM inkubierten VMCUB-1-Zellen ebenfalls signifikant mehr CD274 als in der DMEM-Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass das Osteoblasten-

KM möglicherweise immunmodulatorische Eigenschaften in den UCC induziert, indem die Expression von CD273 und CD274 gefördert wird. Solche Veränderungen könnten dazu beitragen, dass diese UCC der T-Zell-Antwort entkommen, was möglicherweise ein Fortschreiten der Tumormasse begünstigt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Osteoblasten eine potenziell wichtige Funktion bei der Interaktion zwischen UCC und dem Immunsystem einnehmen könnten.

5.2.7 Einfluss des Osteoblasten-KM auf Apoptosefaktoren der UCC

Dem Ungleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotisch wirksamen Proteinen wird eine wichtige Funktion im Prozess der malignen Transformation zugesprochen (Fulda, 2009). Je nach Stimulus erfolgt die Apoptose in der Regel entweder über den extrinsischen Weg, welcher über die Aktivierung von Todesrezeptoren initiiert wird, oder über den intrinsischen Signalweg. In beiden Fällen kommt es zur Aktivierung einer Initiatorcaspase, welche nachfolgend zur Aktivierung von Effektorcaspasen führt, wodurch schlussendlich der programmierte Zelltod herbeigeführt wird (Wu and Bratton, 2013). Aktiviert wird die intrinsische Apoptose, welche ebenfalls als Bcl-2-regulierter oder mitochondrialer Signalweg bezeichnet wird, u. a. durch zytotoxische Einflüsse wie Virusinfektionen, DNA-Schäden oder einen Mangel an Wachstumsfaktoren. Eine Schlüsselfunktion im Prozess der intrinsischen Apoptose nimmt die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran ein. Reguliert wird die Aufhebung der Membranintegrität vornehmlich durch Proteine der Bcl-2-Familie, zu denen sowohl pro- als auch antiapoptotische Proteine gehören. Zu den Hauptakteuren der antiapoptotisch wirkenden Proteine der Bcl-2-Unterfamilie gehören Bcl-2 und Bcl-XL. Sie inhibieren die Einleitung der Apoptose, indem sie die Oligomerisierung proapoptotischer Proteine wie Bax und Bak hemmen. Folglich wird die Porenbildung der äußeren Mitochondrienmembran verhindert, wodurch wiederum die Freisetzung von Caspase-Aktivatoren aus den Mitochondrien blockiert wird (Moriishi et al., 2016, Sedlackova and Korolchuk, 2019). Während der Onkogenese erlangen Tumorzellen die Fähigkeit, sich der Apoptose zu entziehen, wodurch sie tumorprogressive und therapieresistente Eigenschaften gewinnen. Das Glykoprotein OPG, welches vor allem von Osteoblasten sezerniert wird, scheint eine bedeutsame Funktion bei der Förderung des Überlebens von Zellen des Prostatakarzinoms einzunehmen, indem es sie vor der TRAIL-induzierten Apoptose schützt. Physiologisch leitet TRAIL durch seine Bindung an den Rezeptor TRAIL-R den extrinsischen Weg der Apoptose ein. Holen et al. (2002) demonstrierten anhand von *in-vitro*-Modellen, dass OPG diese Interaktion unterband und somit den Tumorzellen einen Überlebensvorteil bot (Holen et al., 2002). Ein zusätzlicher Mechanismus, welchen einige maligne Zellen adaptiert haben, um der Apoptose zu entgehen, besteht in der Überexpression der antiapoptotisch

wirksamen Proteine Bcl-2 und Bcl-XL (Nayak et al., 2024). Bcl-2-Hemmer wie Venetoclax wurden daher inzwischen als Zweitlinientherapie der chronisch lymphatischen Leukämie zugelassen. Die gezielt herbeigeführte Hemmung der antiapoptotisch wirksamen Proteine der Bcl-2-Familie durch antineoplastische Arzneimittel kann die Apoptose der malignen Zellen fördern und womöglich die Entstehung von Therapieresistenzen eindämmen (Qian et al., 2022).

Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob das Osteoblasten-KM die Expression von Bcl-2 und Bcl-XL seitens der UCC fördern könne. Hierbei zeigte sich, insbesondere im Falle der VMCUB-1-Zellen, ein tendenzieller Anstieg im Expressionsniveau der antiapoptotisch wirksamen Proteine. In den UMUC-3-Zellen wurde ein geringfügiger Anstieg der Bcl-2- und Bcl-XL-Expressionsniveaus unter der Behandlung mit Cisplatin beobachtet, was einen Hinweis auf die Entstehung von Therapieresistenzen geben könnte. Die Fragestellung, ob Osteoblasten einen Einfluss auf das Apoptoseverhalten der UCC ausüben, kann mit der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Um die statistische Aussagekraft weiter zu erhöhen und detailliertere Erkenntnisse zu gewinnen, wären daher weiterführende Experimente mit einer größeren Stichprobengröße erforderlich, um den Einfluss des Osteoblasten-KM präziser zu quantifizieren und mögliche Auswirkungen auf das Apoptoseverhalten der UCC genauer zu evaluieren. Um die Fragestellung detaillierter zu analysieren und ein umfassenderes Verständnis der Apoptoseregulation zu gewinnen, wäre es zudem sinnvoll, neben den in dieser Forschungsarbeit untersuchten antiapoptotischen Mediatoren auch die Expression proapoptotischer Faktoren und regulatorischer Proteine der Apoptose, wie des Tumorsuppressors p53 und insbesondere der Effektorcaspasen, unter dem Einfluss des Osteoblasten-KM zu untersuchen.

5.2.8 Einfluss des KM auf die Cisplatin-Sensitivität

Das Harnblasenkarzinom weist eine hohe Rate an Rezidiven auf, welche auf die häufige Entstehung von Resistenzen gegenüber Cisplatin zurückzuführen sind (Drayton and Catto, 2012). Problematisch ist dies insbesondere daher, weil die cisplatinbasierte Kombinationstherapie die medikamentöse Therapie der ersten Wahl bei Patientinnen und Patienten mit MIBC darstellt (van der Horst et al., 2012). Jedoch liegt die Ansprechrate der Betroffenen, welche eine cisplatinbasierte Chemotherapie erhalten, lediglich bei 30 – 40 % (Choi et al., 2014). Aktuelle Untersuchungen legen nahe, dass Osteoblasten im Falle des Mammakarzinoms eine bedeutende Funktion bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika in Knochenmetastasen einnehmen. Zheng et al. (2017) beobachteten, dass die Vorbehandlung von Mäusen mit Cisplatin die Ausbreitung von Zellen des Mammakarzinoms im Knochen in unmittelbarer Nähe zu Osteoblasten

signifikant erhöhte (Zheng et al., 2017). Hierbei wird der Überexpression des Proteins Jagged-1 und dem damit verbundenen Notch-Signalweg eine entscheidende Funktion zugesprochen. Die tumorinduzierte Überexpression von Jagged-1 führt zu einer vermehrten Aktivierung des Notch-Signalweges der Osteoblasten. Dies resultiert wiederum in einer erhöhten Sekretion von IL-6 und *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), wodurch die Proliferation von Tumorzellen angeregt wird (Mohammad and Guise, 2017). Der Einfluss von Osteoblasten auf die Entstehung der Therapieresistenz des UC gegenüber Cisplatin ist bislang nicht im Detail geklärt. Ziel der Resistenzanalyse der vorliegenden Forschungsarbeit war es zu eruieren, ob das Osteoblasten-KM lösliche Signalmediatoren enthält, welche den UCC das Überleben in einer mit Cisplatin angereicherten Umgebung ermöglichen und dementsprechend zu einer Erhöhung der Resistenz gegenüber Cisplatin beitragen. Im Gegensatz zu den beschriebenen Beobachtungen im Falle des Mammakarzinoms konnte kein aussagekräftiges Ergebnis bezüglich des Einflusses von Osteoblasten auf die Entwicklung von Zytostatikaresistenzen in UCC eruiert werden. Bei nahezu allen gewählten Cisplatin-Konzentrationen wurde kein Überlebensvorteil der in KM inkubierten UCC im Vergleich zur DMEM-Kontrollgruppe beobachtet. Zusammenfassend legen die derzeitigen Ergebnisse nahe, dass die KM-Umgebung in der getesteten Konfiguration keinen signifikanten Überlebensvorteil für die UCC unter Cisplatinbehandlung bietet.

5.3 Fazit

Trotz der Fortschritte in der systemischen Polychemotherapie gibt es bislang keinen kurativen Therapieansatz in der Behandlung des metastasierten Harnblasenkarzinoms. Daher ist es von großer Bedeutung, die Mechanismen der Tumorprogression sowie der zellulären Plastizität, welche den Tumorzellen die stetige Anpassung an das Tumormikromilieu ermöglichen, zu erforschen und neue Zielstrukturen für die Hemmung der metastatischen Ausbreitung zu identifizieren. Die molekularen Mechanismen und der Einfluss humaner Osteoblasten auf die Tumorprogression bei MIBC sind Gegenstand aktueller Untersuchungen. Der neueste Stand der Forschung sowie die in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass humane Osteoblasten die Tumorprogression von UCC relevant im Sinne eines aggressiveren Phänotyps modulieren könnten. In den durchgeführten Experimenten konnte demonstriert werden, dass Osteoblasten, stammend von Patientinnen und Patienten mit Osteoporose, sowohl das Migrations- als auch das Invasionsvermögen der untersuchten UCC signifikant steigern konnten. Ebenso konnte ein signifikanter Einfluss des KM auf das Proliferationsvermögen der BFTC-905-Zellen beobachtet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die Interaktion mit Osteoblasten aus osteoporotischem Knochengewebe den UCC nicht bloß ermöglicht, Gewebe effizienter zu durchdringen, sondern auch zur Umgehung immunologischer Kontrollmechanismen beitragen könnte. Infolgedessen können die UCC ungehindert metastasieren, was die Prognose des UC verschlechtert und eine erfolgreiche Behandlung erschweren kann. Basierend auf den gesammelten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass das Osteoblasten-KM Faktoren enthält, welche essenzielle Schritte der Tumorprogression der UCC fördern und folglich zur Metastasierung des UC beitragen können. Darüber hinaus zeigen die Beobachtungen, dass die Einflussnahme des KM unterschiedlich auf die verschiedenen UCC wirkt. Diese Erkenntnisse unterstreichen die komplexe Rolle, welche Osteoblasten im Tumormikromilieu einnehmen. Ein besseres Verständnis, welche Faktoren an der Tumorprogression des UC beteiligt sind und inwiefern die Interaktion von Osteoblasten und UCC die Tumorlast erhöht, könnte Hinweise auf neue therapeutische Interventionen geben und sollte daher Gegenstand weiterer Forschung sein.

6 Literaturverzeichnis

- AHMADIANKIA, N. 2020. In vitro and in vivo studies of cancer cell behavior under nutrient deprivation. *Cell Biology International*, 44, 1588-1597.
- AHMADIANKIA, N., BAGHERI, M. & FAZLI, M. 2019. Nutrient Deprivation Modulates the Metastatic Potential of Breast Cancer Cells. *Rep Biochem Mol Biol*, 8, 139-146.
- AL-SHARAKY, D. R., ABDELWAHED, M., ASAAD, N., FODA, A. & ABDOL, A. G. 2021. Stratification of urinary bladder carcinoma based on immunohistochemical expression of CK5, CK14 and CK20. *J Immunoassay Immunochem*, 42, 236-251.
- AMARASEKARA, D. S., YUN, H., KIM, S., LEE, N., KIM, H. & RHO, J. 2018. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw*, 18.
- AMJAD, M. T., CHIDHARLA, A. & KASI, A. 2023. Cancer Chemotherapy. *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- ANAND, V., KHANDELWAL, M., APPUNNI, S., GUPTA, N., SETH, A., SINGH, P., MATHUR, S. & SHARMA, A. 2019. CD44 splice variant (CD44v3) promotes progression of urothelial carcinoma of bladder through Akt/ERK/STAT3 pathways: novel therapeutic approach. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145, 2649-2661.
- ANTONI, S., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., ZNAOR, A., JEMAL, A. & BRAY, F. 2017. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *European Urology*, 71, 96-108.
- ARMAS, L. A. & RECKER, R. R. 2012. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 41, 475-86.
- ARMSTRONG, A. P., MILLER, R. E., JONES, J. C., ZHANG, J., KELLER, E. T. & DOUGALL, W. C. 2008. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *The Prostate*, 68, 92-104.
- BAAK, J. P. 1990. Mitosis counting in tumors. *Hum Pathol*, 21, 683-5.
- BAN, J., FOCK, V., ARYEE, D. N. T. & KOVAR, H. 2021. Mechanisms, Diagnosis and Treatment of Bone Metastases. *Cells*, 10, 2944.
- BASU, S. & ALAVI, A. 2007. Bone Marrow and Not Bone Is the Primary Site for Skeletal Metastasis: Critical Role of [18F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography in This Setting. *Journal of Clinical Oncology*, 25, 1297-1297.
- BECKER, M., SZARVAS, T., WITTSCHIER, M., VOM DORP, F., TÖTSCH, M., SCHMID, K. W., RÜBBEN, H. & ERGÜN, S. 2010. Prognostic impact of plasminogen activator inhibitor type 1 expression in bladder cancer. *Cancer*, 116, 4502-12.
- BELLMUNT, J., ORSOLA, A., LEOW, J. J., WIEGEL, T., DE SANTIS, M. & HORWICH, A. 2014. Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up †. *Annals of Oncology*, 25, iii40-iii48.
- BOSKEY, A. L., DICARLO, E., PASCHALIS, E., WEST, P. & MENDELSON, R. 2005. Comparison of mineral quality and quantity in iliac crest biopsies from high- and low-turnover osteoporosis: an FT-IR microspectroscopic investigation. *Osteoporos Int*, 16, 2031-8.
- BOYCE, B. F., YONEDA, T. & GUISE, T. A. 1999. Factors regulating the growth of metastatic cancer in bone. *Endocrine-related cancer Endocr Relat Cancer Endocr. Relat. Cancer*, 6, 333-347.
- BOYERINAS, B., ZAFRIR, M., YESILKANAL, A. E., PRICE, T. T., HYJEK, E. M. & SIPKINS, D. A. 2013. Adhesion to osteopontin in the bone marrow niche regulates lymphoblastic leukemia cell dormancy. *Blood*, 121, 4821-4831.

- BOZZUTO, G., RUGGIERI, P. & MOLINARI, A. 2010. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Annali dell'Istituto superiore di sanit *, 46, 66-80.
- BRABLETZ, T., KALLURI, R., NIETO, M. A. & WEINBERG, R. A. 2018. EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18, 128-134.
- BRAMA, M., BASCIANI, S., CHERUBINI, S., MARIANI, S., MIGLIACCIO, S., ARIZZI, M., ROSANO, G., SPERA, G. & GNESSI, L. 2007. Osteoblast-conditioned medium promotes proliferation and sensitizes breast cancer cells to imatinib treatment. *Endocrine-Related Cancer Endocr Relat Cancer*, 14, 61-72.
- BROOKS, T. D., SLOMP, J., QUAX, P. H. A., DE BART, A. C. W., SPENCER, M. T., VERHEIJEN, J. H. & CHARLTON, P. A. 2000. Antibodies to PAI-1 alter the invasive and migratory properties of human tumour cells in vitro. *Clinical & Experimental Metastasis*, 18, 445-453.
- BURGER, M., CATTO, J. W. F., DALBAGNI, G., GROSSMAN, H. B., HERR, H., KARAKIEWICZ, P., KASSOUF, W., KIEMENEY, L. A., LA VECCHIA, C., SHARIAT, S. & LOTAN, Y. 2013. Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. *European Urology*, 63, 234-241.
- CAETANO-LOPES, J., CANHAO, H. & FONSECA, J. E. 2007. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*, 32, 103-10.
- CECCHINI, M. G., WETTERWALD, A., PLUIJM, G. V. D. & THALMANN, G. N. 2005. Molecular and Biological Mechanisms of Bone Metastasis. *EAU Update Series*, 3, 214-226.
- CHAFFER, C. L., BRENNAN, J. P., SLAVIN, J. L., BLICK, T., THOMPSON, E. W. & WILLIAMS, E. D. 2006. Mesenchymal-to-Epithelial Transition Facilitates Bladder Cancer Metastasis: Role of Fibroblast Growth Factor Receptor-2. *Cancer Research*, 66, 11271-11278.
- CHAMBERS, A. F., GROOM, A. C. & MACDONALD, I. C. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2, 563-572.
- CHATTERJEE, S., BEHNAM AZAD, B. & NIMMAGADDA, S. 2014. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res*, 124, 31-82.
- CHEN, C., ZHAO, S., KARNAD, A. & FREEMAN, J. W. 2018. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of Hematology & Oncology*, 11, 64.
- CHEN, G., SIRCAR, K., APRIKIAN, A., POTTI, A., GOLTZMAN, D. & RABBANI, S. A. 2006. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer*, 107, 289-298.
- CHEN, M. F., LIN, P. Y., WU, C. F., CHEN, W. C. & WU, C. T. 2013. IL-6 expression regulates tumorigenicity and correlates with prognosis in bladder cancer. *PLoS One*, 8, e61901.
- CHEN, X., LU, J., JI, Y., HONG, A. & XIE, Q. 2014. Cytokines in osteoblast-conditioned medium promote the migration of breast cancer cells. *Tumour Biol*, 35, 791-8.
- CHO, S. H., PARK, Y. S., KIM, H. J., KIM, C. H., LIM, S. W., HUH, J. W., LEE, J. H. & KIM, H. R. 2012. CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion. *Int J Oncol*, 41, 211-8.
- CHOI, W., PORTEN, S., KIM, S., WILLIS, D., PLIMACK, E. R., HOFFMAN-CENSITS, J., ROTH, B., CHENG, T., TRAN, M., LEE, I. L., MELQUIST, J., BONDARUK, J., MAJEWSKI, T., ZHANG, S., PRETZSCH, S., BAGGERLY, K., SIEFKER-RADTKE, A., CZERNIAK, B., DINNEY, C. P. & MCCONKEY, D. J. 2014. Identification of distinct basal and luminal subtypes of

- muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell*, 25, 152-65.
- CLÉZARDIN, P., COLEMAN, R., PUPPO, M., OTTEWELL, P., BONNELYE, E., PAYCHA, F., CONFAVREUX, C. B. & HOLEN, I. 2021. Bone metastasis: mechanisms, therapies, and biomarkers. *Physiol Rev*, 101, 797-855.
- COPPOLA, D., SZABO, M., BOULWARE, D., MURACA, P., ALSARRAJ, M., CHAMBERS, A. F. & YEATMAN, T. J. 2004. Correlation of Osteopontin Protein Expression and Pathological Stage across a Wide Variety of Tumor Histologies. *Clinical Cancer Research*, 10, 184-190.
- CUMBERBATCH, M. G., ROTA, M., CATTO, J. W. F. & LA VECCHIA, C. 2016. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *European Urology*, 70, 458-466.
- DAVEY, P., MERRICK, M. V., DUNCAN, W. & REDPATH, A. T. 1985. Bladder cancer: the value of routine bone scintigraphy. *Clin Radiol*, 36, 77-9.
- DE BENEDETTI, F., RUCCI, N., DEL FATTORE, A., PERUZZI, B., PARO, R., LONGO, M., VIVARELLI, M., MURATORI, F., BERNI, S., BALLANTI, P., FERRARI, S. & TETI, A. 2006. Impaired skeletal development in interleukin-6–transgenic mice: A model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis & Rheumatism*, 54, 3551-3563.
- DEL FATTORE, A., TETI, A. & RUCCI, N. 2012. Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4, 2302-21.
- DESJARDINS, P. & CONKLIN, D. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*.
- DESOUZA, K., CHOWDHURY, S. & HUGHES, S. 2014. Prompt diagnosis key in bladder cancer. *Practitioner*, 258, 23-7, 3.
- DONG, C., ZHU, S., WANG, T., YOON, W. & GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. 2002. Upregulation of PAI-1 is mediated through TGF-beta/Smad pathway in transplant arteriopathy. *J Heart Lung Transplant*, 21, 999-1008.
- DONG, F., SHEN, Y., GAO, F., XU, T., WANG, X., ZHANG, X., ZHONG, S., ZHANG, M., CHEN, S. & SHEN, Z. 2017. Prognostic value of site-specific metastases and therapeutic roles of surgery for patients with metastatic bladder cancer: a population-based study. *Cancer Manag Res*, 9, 611-626.
- DRAKE, M. T. 2013. Osteoporosis and Cancer. *Current Osteoporosis Reports*, 11, 163-170.
- DRAYTON, R. M. & CATTO, J. W. 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in bladder cancer. *Expert review of anticancer therapy*, 12, 271-281.
- DSMZ, L.-I. 2024. *BFTC-905* [Online]. DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Available: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-361> [Accessed 13.05.2024].
- DUNN, W. A., JR. 1990. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*, 110, 1923-33.
- ESPOSITO, M., GUISE, T. & KANG, Y. 2018. The Biology of Bone Metastasis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.
- FAGET, J., CONTAT, C., ZANGGER, N., PETERS, S. & MEYLAN, E. 2018. RANKL Signaling Sustains Primary Tumor Growth in Genetically Engineered Mouse Models of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 13, 387-398.

- FAKHRY, M., HAMADE, E., BADRAN, B., BUCHET, R. & MAGNE, D. 2013. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells*, 5, 136-48.
- FEITELSON, M. A., ARZUMANYAN, A., KULATHINAL, R. J., BLAIN, S. W., HOLCOMBE, R. F., MAHAJNA, J., MARINO, M., MARTINEZ-CHANTAR, M. L., NAWROTH, R., SANCHEZ-GARCIA, I., SHARMA, D., SAXENA, N. K., SINGH, N., VLACHOSTERGIOS, P. J., GUO, S., HONOKI, K., FUJII, H., GEORGAKILAS, A. G., BILSLAND, A., AMEDEI, A., NICCOLAI, E., AMIN, A., ASHRAF, S. S., BOOSANI, C. S., GUHA, G., CIRIOLO, M. R., AQUILANO, K., CHEN, S., MOHAMMED, S. I., AZMI, A. S., BHAKTA, D., HALICKA, D., KEITH, W. N. & NOWSHEEN, S. 2015. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S25-S54.
- FERRARI, S. L., AHN-LUONG, L., GARNERO, P., HUMPHRIES, S. E. & GREENSPAN, S. L. 2003. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 255-9.
- FESTUCCIA, C., BOLOGNA, M., GRAVINA, G. L., GUERRA, F., ANGELUCCI, A., VILLANOVA, I., MILLIMAGGI, D. & TETI, A. 1999. Osteoblast conditioned media contain TGF- β 1 and modulate the migration of prostate tumor cells and their interactions with extracellular matrix components. *International Journal of Cancer*, 81, 395-403.
- FIDLER, I. J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3, 453-8.
- FONG, M. H. Y., FENG, M., MCCONKEY, D. J. & CHOI, W. 2020. Update on bladder cancer molecular subtypes. *Transl Androl Urol*, 9, 2881-2889.
- FORNETTI, J., WELM, A. L. & STEWART, S. A. 2018. Understanding the Bone in Cancer Metastasis. *J Bone Miner Res*, 33, 2099-2113.
- FULDA, S. 2009. Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of Cancer*, 124, 511-515.
- FUTAKUCHI, M., FUKAMACHI, K. & SUZUI, M. 2016. Heterogeneity of tumor cells in the bone microenvironment: Mechanisms and therapeutic targets for bone metastasis of prostate or breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99, 206-211.
- GONZALEZ, D. M. & MEDICI, D. 2014. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*, 7, re8.
- GRÁVALOS, C., RODRÍGUEZ, C., SABINO, A., SEGUÍ, M. Á., VIRIZUELA, J. A., CARMONA, A., CASSINELLO, J., ISLA, D., JARA, C. & MARTÍN, M. 2016. SEOM Clinical Guideline for bone metastases from solid tumours (2016). *Clinical and Translational Oncology*, 18, 1243-1253.
- GROSSMAN, H. B., WEDEMEYER, G., REN, L., WILSON, G. N. & COX, B. 1986. Improved Growth of Human Urothelial Carcinoma Cell Cultures. *Journal of Urology*, 136, 953-959.
- GUISE, T. A., YIN, J. J. & MOHAMMAD, K. S. 2003. Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. *Cancer*, 97, 779-784.
- HADJI, P., KLEIN, S., GOTHE, H., H%USSLER, B., KLESS, T., SCHMIDT, T., STEINLE, T., VERHEYEN, F. & LINDER, R. 2013. Epidemiologie der Osteoporose ñ Bone Evaluation Study. *Dtsch Arztebl International*, 110, 52-57.
- HARMER, D., FALANK, C. & REAGAN, M. R. 2019. Interleukin-6 Interweaves the Bone Marrow Microenvironment, Bone Loss, and Multiple Myeloma. *Frontiers in Endocrinology*, 9.

- HASSN MESRATI, M., SYAFRUDDIN, S. E., MOHTAR, M. A. & SYAHIR, A. 2021. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules*, 11.
- HENSEL, J. & THALMANN, G. N. 2016. Biology of Bone Metastases in Prostate Cancer. *Urology*, 92, 6-13.
- HIRAGA, T. 2018. Hypoxic Microenvironment and Metastatic Bone Disease. *Int J Mol Sci*, 19.
- HIRAGA, T. 2019. Bone metastasis: Interaction between cancer cells and bone microenvironment. *J Oral Biosci*, 61, 95-98.
- HOFBAUER, L. C., BOZEC, A., RAUNER, M., JAKOB, F., PERNER, S. & PANTEL, K. 2021. Novel approaches to target the microenvironment of bone metastasis. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18, 488-505.
- HOLEN, I., CROUCHER, P. I., HAMDY, F. C. & EATON, C. L. 2002. Osteoprotegerin (OPG) Is a Survival Factor for Human Prostate Cancer Cells¹. *Cancer Research*, 62, 1619-1623.
- HUANG, Z., LI, G., ZHANG, Z., GU, R., WANG, W., LAI, X., CUI, Z. K., ZENG, F., XU, S. & DENG, F. 2019. β 2AR-HIF-1 α -CXCL12 signaling of osteoblasts activated by isoproterenol promotes migration and invasion of prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 19, 1142.
- HUGO, H., ACKLAND, M. L., BLICK, T., LAWRENCE, M. G., CLEMENTS, J. A., WILLIAMS, E. D. & THOMPSON, E. W. 2007. Epithelial—mesenchymal and mesenchymal—epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal of Cellular Physiology*, 213, 374-383.
- HUO, Q., WANG, S., GUO, L., SHEN, Y., GORCZYNSKI, R. M., ZHAI, Q., LI, L., ZHANG, L. & LI, T. 2024. Editorial: Bone metastases and secondary osteoporosis. *Frontiers in Endocrinology*, 15.
- ISOGAI, C., LAUG, W. E., SHIMADA, H., DECLERCK, P. J., STINS, M. F., DURDEN, D. L., ERDREICH-EPSTEIN, A. & DECLERCK, Y. A. 2001. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin. *Cancer Res*, 61, 5587-94.
- JIA, J., ZHOU, H., ZENG, X. & FENG, S. 2017. Estrogen stimulates osteoprotegerin expression via the suppression of miR-145 expression in MG-63 cells. *Mol Med Rep*, 15, 1539-1546.
- JIN, L., HOPE, K. J., ZHAI, Q., SMADJA-JOFFE, F. & DICK, J. E. 2006. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nature Medicine*, 12, 1167-1174.
- JONASON, J. H., XIAO, G., ZHANG, M., XING, L. & CHEN, D. 2009. Post-translational Regulation of Runx2 in Bone and Cartilage. *J Dent Res*, 88, 693-703.
- JONES, D. H., NAKASHIMA, T., SANCHEZ, O. H., KOZIERADZKI, I., KOMAROVA, S. V., SAROSI, I., MORONY, S., RUBIN, E., SARAO, R., HOJILLA, C. V., KOMNENOVIC, V., KONG, Y. Y., SCHREIBER, M., DIXON, S. J., SIMS, S. M., KHOKHA, R., WADA, T. & PENNINGER, J. M. 2006. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*, 440, 692-6.
- KANIS, J. A., COOPER, C., RIZZOLI, R. & REGINSTER, J. Y. 2019. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int*, 30, 3-44.
- KANTOR, A. F., HARTGE, P., HOOVER, R. N. & FRAUMENI, J. F., JR. 1988. Epidemiological characteristics of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the bladder. *Cancer Res*, 48, 3853-5.
- KARLSSON, T., SUNDAR, R., WIDMARK, A., LANDSTRÖM, M. & PERSSON, E. 2018. Osteoblast-derived factors promote metastatic potential in human prostate cancer

- cells, in part via non-canonical transforming growth factor β (TGF β) signaling. *The Prostate*, 78, 446-456.
- KHALILI-TANHA, G., FIUJI, H., GHARIB, M., MOGHBELI, M., KHALILI-TANHA, N., RAHMANI, F., SHAKOUR, N., MAFTOOH, M., HASSANIAN, S. M., ASGHARZADEH, F., SHAHIDSALES, S., ANVARI, K., MOZAFARI, M. R., FERNS, G. A., BATRA, J., GIOVANNETTI, E., KHAZAEI, M. & AVAN, A. 2023. Dual targeting of TGF- β and PD-L1 inhibits tumor growth in TGF- β /PD-L1-driven colorectal carcinoma. *Life Sciences*, 328, 121865.
- KIM, J. M., LIN, C., STAVRE, Z., GREENBLATT, M. B. & SHIM, J. H. 2020. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*, 9.
- KINGSLEY, L. A., FOURNIER, P. G. J., CHIRGWIN, J. M. & GUISE, T. A. 2007. Molecular Biology of Bone Metastasis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 2609-2617.
- KNOWLES, M. A. 2006. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*, 27, 361-73.
- KOBAYASHI, K., MATSUMOTO, H., MATSUYAMA, H., FUJII, N., INOUE, R., YAMAMOTO, Y. & NAGAO, K. 2016. Clinical significance of CD44 variant 9 expression as a prognostic indicator in bladder cancer. *Oncol Rep*, 36, 2852-2860.
- KOIE, T., OHYAMA, C., YAMAMOTO, H., IMAI, A., HATAKEYAMA, S., YONEYAMA, T., HASHIMOTO, Y., YONEYAMA, T. & TOBISAWA, Y. 2014. Neoadjuvant gemcitabine and carboplatin followed by immediate cystectomy may be associated with a survival benefit in patients with clinical T2 bladder cancer. *Med Oncol*, 31, 949.
- KOTHARI, A. N., ARFFA, M. L., CHANG, V., BLACKWELL, R. H., SYN, W. K., ZHANG, J., MI, Z. & KUO, P. C. 2016. Osteopontin-A Master Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Clin Med*, 5.
- KRZESZINSKI, J. Y. & WAN, Y. 2015. New therapeutic targets for cancer bone metastasis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36, 360-373.
- LE, Q.-T., DENKO, N. C. & GIACCIA, A. J. 2004. Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23, 293-310.
- LEE, J. A., JUNG, J. S., KIM, D. H., LIM, J. S., KIM, M. S., KONG, C.-B., SONG, W. S., CHO, W. H., JEON, D.-G., LEE, S.-Y. & KOH, J.-S. 2011. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. *Pediatric Blood & Cancer*, 56, 738-743.
- LIANG, B., BURLEY, G., LIN, S. & SHI, Y.-C. 2022. Osteoporosis pathogenesis and treatment: existing and emerging avenues. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27, 72.
- LLOVET, J. M. & BRUIX, J. 2003. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*, 37, 429-42.
- LOGOTHETIS, C. J. & LIN, S. H. 2005. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer*, 5, 21-8.
- LOPEZ-BELTRAN, A., CIMADAMORE, A., BLANCA, A., MASSARI, F., VAU, N., SCARPELLI, M., CHENG, L. & MONTIRONI, R. 2021. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*, 13.
- MACEDO, F., LADEIRA, K., PINHO, F., SARAIVA, N., BONITO, N., PINTO, L. & GONCALVES, F. 2017. Bone Metastases: An Overview. *Oncol Rev*, 11, 321.
- MAGERS, M. J., LOPEZ-BELTRAN, A., MONTIRONI, R., WILLIAMSON, S. R., KAIMAKLIOTIS, H. Z. & CHENG, L. 2019. Staging of bladder cancer. *Histopathology*, 74, 112-134.

- MAKRI, D., SCHULZ, W. A., GRIMM, M., CLASEN, S., BOJAR, H. & SCHMITZ-DRÄGER, B. J. 1998. WAF1/p21 regulates proliferation, but does not mediate p53-dependent apoptosis in urothelial carcinoma cell lines. *Int J Oncol*, 12, 621-8.
- MARKL, I. D. & JONES, P. A. 1998. Presence and location of TP53 mutation determines pattern of CDKN2A/ARF pathway inactivation in bladder cancer. *Cancer Res*, 58, 5348-53.
- MCCONKEY, D. J., CHOI, W., MARQUIS, L., MARTIN, F., WILLIAMS, M. B., SHAH, J., SVATEK, R., DAS, A., ADAM, L., KAMAT, A., SIEFKER-RADTKE, A. & DINNEY, C. 2009. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 28, 335-44.
- MCCMAHON, G. A., PETITCLERC, E., STEFANSSON, S., SMITH, E., WONG, M. K. K., WESTRICK, R. J., GINSBURG, D., BROOKS, P. C. & LAWRENCE, D. A. 2001. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates Tumor Growth and Angiogenesis*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 33964-33968.
- MILLIMAGGI, D., FESTUCCIA, C., ANGELUCCI, A., D'ASCENZO, S., RUCCI, N., FLATI, S., BOLOGNA, M., TETI, A., PAVAN, A. & DOLO, V. 2006. Osteoblast-conditioned media stimulate membrane vesicle shedding in prostate cancer cells. *Int J Oncol*, 28, 909-914.
- MOHAMED, A. A. H., AHMED, A. T., AL ABDULMONEM, W., BOKOV, D. O., SHAFIE, A., AL-HETTY, H. R. A. K., HSU, C.-Y., ALISSA, M., NAZIR, S., JAMALI, M. C. & MUDHAFAR, M. 2024. Interleukin-6 serves as a critical factor in various cancer progression and therapy. *Medical Oncology*, 41, 182.
- MOHAMMAD, K. S. & GUISE, T. A. 2017. Breaking Down Barriers to Chemoresistance: Role of Chemotherapy-Induced Osteoblastic Jagged1. *Cancer Cell*, 32, 717-718.
- MORIISHI, T., FUKUYAMA, R., MIYAZAKI, T., FURUICHI, T., ITO, M. & KOMORI, T. 2016. Overexpression of BCLXL in Osteoblasts Inhibits Osteoblast Apoptosis and Increases Bone Volume and Strength. *Journal of Bone and Mineral Research*, 31, 1366-1380.
- MUNDY, G. R. 1997. Mechanisms of bone metastasis. *Cancer*, 80, 1546-1556.
- MUNDY, G. R. 2002. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 2, 584-593.
- NAKAI, M., MUNDY, G. R., WILLIAMS, P. J., BOYCE, B. & YONEDA, T. 1992. A Synthetic Antagonist to Laminin Inhibits the Formation of Osteolytic Metastases by Human Melanoma Cells in Nude Mice1. *Cancer Research*, 52, 5395-5399.
- NAKANISHI, J., WADA, Y., MATSUMOTO, K., AZUMA, M., KIKUCHI, K. & UEDA, S. 2007. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother*, 56, 1173-82.
- NAM, K., OH, S., LEE, K.-M., YOO, S.-A. & SHIN, I. 2015. CD44 regulates cell proliferation, migration, and invasion via modulation of c-Src transcription in human breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 27, 1882-1894.
- NAYAK, D., LV, D., YUAN, Y., ZHANG, P., HU, W., NAYAK, A., RUBEN, E. A., LV, Z., SUNG, P., HROMAS, R., ZHENG, G., ZHOU, D. & OLSEN, S. K. 2024. Development and crystal structures of a potent second-generation dual degrader of BCL-2 and BCL-xL. *Nature Communications*, 15, 2743.
- NAZARI, A., KHORRAMDELAZAD, H. & HASSANSHAHI, G. 2017. Biological/pathological functions of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axes in the pathogenesis of bladder cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 22, 991-1000.

- NEIVA, K., SUN, Y. X. & TAICHMAN, R. S. 2005. The role of osteoblasts in regulating hematopoietic stem cell activity and tumor metastasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38.
- NELSON, J. B., HEDICAN, S. P., GEORGE, D. J., REDDI, A. H., PIANTADOSI, S., EISENBERGER, M. A. & SIMONS, J. W. 1995. Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med*, 1, 944-9.
- NEVE, A., CORRADO, A. & CANTATORE, F. P. 2011. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell and Tissue Research*, 343, 289-302.
- NUTI, R., BRANDI, M. L., CHECCHIA, G., DI MUNNO, O., DOMINGUEZ, L., FALASCHI, P., FIORE, C. E., IOLASCON, G., MAGGI, S., MICHIELI, R., MIGLIACCIO, S., MINISOLA, S., ROSSINI, M., SESSA, G., TARANTINO, U., TOSELLI, A. & ISAIA, G. C. 2019. Guidelines for the management of osteoporosis and fragility fractures. *Intern Emerg Med*, 14, 85-102.
- OKAMOTO, K. 2021. Role of RANKL in cancer development and metastasis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 39, 71-81.
- ONKOLOGIE, L. 2022. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0, 2020, AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL. awmf.org/leitlinien/detail/II/032-038OL.html.
- OTTEWELL, P. D. 2016. The role of osteoblasts in bone metastasis. *Journal of bone oncology*, 5, 124-127.
- OWEN, R. & REILLY, G. C. 2018. In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 134-134.
- PAGANI, S., FINI, M., GIAVARESI, G., SALAMANNA, F. & BORSARI, V. 2015. The active role of osteoporosis in the interaction between osteoblasts and bone metastases. *Bone*, 79, 176-182.
- PANDEY, A., YADAV, P. & SHUKLA, S. 2021. Unfolding the role of autophagy in the cancer metabolism. *Biochem Biophys Rep*, 28, 101158.
- PANG, X., GONG, K., ZHANG, X., WU, S., CUI, Y. & QIAN, B.-Z. 2019. Osteopontin as a multifaceted driver of bone metastasis and drug resistance. *Pharmacological Research*, 144, 235-244.
- PATEL, V. G., OH, W. K. & GALSKEY, M. D. 2020. Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70, 404-423.
- PERRINI, S., NATALICCHIO, A., LAVIOLA, L., CIGNARELLI, A., MELCHIORRE, M., DE STEFANO, F., CACCIOPPOLI, C., LEONARDINI, A., MARTEMUCCI, S., BELSANTI, G., MICCOLI, S., CIAMPOLILLO, A., CORRADO, A., CANTATORE, F. P., GIORGINO, R. & GIORGINO, F. 2008. Abnormalities of insulin-like growth factor-I signaling and impaired cell proliferation in osteoblasts from subjects with osteoporosis. *Endocrinology*, 149, 1302-13.
- PICCIOLI, A., MACCAURO, G., SPINELLI, M. S., BIAGINI, R. & ROSSI, B. 2015. Bone metastases of unknown origin: epidemiology and principles of management. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 16, 81-86.
- PIETSCHMANN, P. & PETERLIK, M. 1999. [Pathophysiology of osteoporosis]. *Wien Med Wochenschr*, 149, 454-62.
- PLOEG, M., ABEN, K. K. & KIEMENEY, L. A. 2009. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol*, 27, 289-93.
- QIAN, S., WEI, Z., YANG, W., HUANG, J., YANG, Y. & WANG, J. 2022. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol*, 12, 985363.

- RACHNER, T. D., KASIMIR-BAUER, S., GÖBEL, A., ERDMANN, K., HOFFMANN, O., BROWNE, A., WIMBERGER, P., RAUNER, M., HOFBAUER, L. C., KIMMIG, R. & BITTNER, A. K. 2019. Prognostic Value of RANKL/OPG Serum Levels and Disseminated Tumor Cells in Nonmetastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 25, 1369-1378.
- RAO, S., SIGL, V., WIMMER, R. A., NOVATCHKOVA, M., JAIS, A., WAGNER, G., HANDSCHUH, S., URIBESALGO, I., HAGELKRUYS, A., KOZIERADZKI, I., TORTOLA, L., NITSCH, R., CRONIN, S. J., ORTHOFER, M., BRANSTETTER, D., CANON, J., ROSSI, J., D'ARCANGELO, M., BOTLING, J., MICKE, P., FLEUR, L., EDLUND, K., BERGQVIST, M., EKMAN, S., LENDL, T., POPPER, H., TAKAYANAGI, H., KENNER, L., HIRSCH, F. R., DOUGALL, W. & PENNINGER, J. M. 2017. RANK rewires energy homeostasis in lung cancer cells and drives primary lung cancer. *Genes Dev*, 31, 2099-2112.
- REED, J. C. 2000. Mechanisms of Apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157, 1415-1430.
- RENEMA, N., NAVET, B., HEYMANN, M.-F., LEZOT, F. & HEYMANN, D. 2016. RANK–RANKL signalling in cancer. *Bioscience Reports*, 36.
- RETZ, M. M., SIDHU, S. S., BLAVERI, E., KERR, S. C., DOLGANOV, G. M., LEHMANN, J., CARROLL, P., SIMKO, J., WALDMAN, F. M. & BASBAUM, C. 2005. CXCR4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Int J Cancer*, 114, 182-9.
- REUSS-BORST, M., HARTMANN, U., SCHEEDE, C. & WEIS, J. 2012. Prevalence of osteoporosis among cancer patients in Germany. *Osteoporosis International*, 23, 1437-1444.
- ROCHE, J. 2018. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers (Basel)*, 10.
- ROH, M. & ABDULKADIR, S. A. 2010. Targeting the endothelin receptor in prostate cancer bone metastasis: Back to the mouse? *Cancer Biol Ther*, 9, 615-7.
- ROODMAN, G. D. 2004. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med*, 350, 1655-64.
- ROSSARI, F., ZUCCHINETTI, C., BUDA, G. & ORCIUOLO, E. 2020. Tumor dormancy as an alternative step in the development of chemoresistance and metastasis - clinical implications. *Cellular Oncology*, 43, 155-176.
- RUCCI, N. & TETI, A. 2010. Osteomimicry: how tumor cells try to deceive the bone. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2, 907-15.
- RUCCI, N. & TETI, A. 2018. Osteomimicry: How the Seed Grows in the Soil. *Calcif Tissue Int*, 102, 131-140.
- SATO, K., TSUCHIHARA, K., FUJII, S., SUGIYAMA, M., GOYA, T., ATOMI, Y., UENO, T., OCHIAI, A. & ESUMI, H. 2007. Autophagy Is Activated in Colorectal Cancer Cells and Contributes to the Tolerance to Nutrient Deprivation. *Cancer Research*, 67, 9677-9684.
- SCHNEIDER, D. J., CHEN, Y. & SOBEL, B. E. 2008. The effect of plasminogen activator inhibitor type 1 on apoptosis. *Thromb Haemost*, 100, 1037-40.
- SCHUBERT, A., SCHULZ, H., EMONS, G. & GRÜNDKER, C. 2008. Expression of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) in HCC70 breast cancer cells and effects of treatment with gonadotropin-releasing hormone on RANKL expression. *Gynecol Endocrinol*, 24, 331-8.
- SEDLACKOVA, L. & KOROLCHUK, V. I. 2019. Mitochondrial quality control as a key determinant of cell survival. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866, 575-587.

- SEITER, S., ARCH, R., REBER, S., KOMITOWSKI, D., HOFMANN, M., PONTA, H., HERRLICH, P., MATZKU, S. & ZÖLLER, M. 1993. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *Journal of Experimental Medicine*, 177, 443-455.
- SENBANJO, L. T. & CHELLAIAH, M. A. 2017. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol*, 5, 18.
- SENGELØV, L., KAMBY, C. & VON DER MAASE, H. 1996. Pattern of metastases in relation to characteristics of primary tumor and treatment in patients with disseminated urothelial carcinoma. *J Urol*, 155, 111-4.
- SERRANO-GOMEZ, S., MAZIVEYI, M. & ALAHARI, S. 2016. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Molecular Cancer*, 15.
- SHANNON, A. M., BOUCHIER-HAYES, D. J., CONDRON, C. M. & TOOMEY, D. 2003. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev*, 29, 297-307.
- SHUPP, A. B., KOLB, A. D., MUKHOPADHYAY, D. & BUSSARD, K. M. 2018. Cancer Metastases to Bone: Concepts, Mechanisms, and Interactions with Bone Osteoblasts. *Cancers (Basel)*, 10.
- SILVA, I. & BRANCO, J. 2011. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta reumatologica portuguesa*, 36, 209-218.
- SIMS, N. A. & MARTIN, T. J. 2020. Chapter 4 - The osteoblast lineage: Its actions and communication mechanisms. In: BILEZIKIAN, J. P., MARTIN, T. J., CLEMENS, T. L. & ROSEN, C. J. (eds.) *Principles of Bone Biology (Fourth Edition)*. Academic Press.
- SKOVSGAARD, T. 1977. Transport and binding of daunorubicin, adriamycin, and rubidazone in ehrlich ascites tumour cells. *Biochemical Pharmacology*, 26, 215-222.
- SKOWRON, M. A., NIEGISCHE, G., FRITZ, G., ARENT, T., VAN ROERMUND, J. G. H., ROMANO, A., ALBERS, P., SCHULZ, W. A. & HOFFMANN, M. J. 2015. Phenotype plasticity rather than repopulation from CD90/CK14+ cancer stem cells leads to cisplatin resistance of urothelial carcinoma cell lines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34, 144.
- SOWDER, M. E. & JOHNSON, R. W. 2019. Bone as a Preferential Site for Metastasis. *JBMR Plus*, 3, e10126.
- STENEHJEM, D. D., TRAN, D., NKRUMAH, M. A. & GUPTA, S. 2018. PD1/PDL1 inhibitors for the treatment of advanced urothelial bladder cancer. *Onco Targets Ther*, 11, 5973-5989.
- STOJNEV, S., KRSTIĆ, M., ČUKURANOVIĆ KOKORIS, J., CONIĆ, I., PETKOVIĆ, I., ILIĆ, S., MILOSEVIĆ-STEVAHOVIĆ, J. & VELIČKOVIĆ, L. J. 2019. Prognostic Impact of Canonical TGF- β Signaling in Urothelial Bladder Cancer. *Medicina (Kaunas)*, 55.
- SU, Y., DU, Z., ZHONG, G., YA, Y., BI, J., SHI, J., CHEN, L., DONG, W. & LIN, T. 2019. circ5912 suppresses cancer progression via inducing MET in bladder cancer. *Aging (Albany NY)*, 11, 10826-10838.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. & BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71, 209-249.
- THIERY, J. P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 442-54.

- TOBEIHA, M., MOGHADASIAN, M. H., AMIN, N. & JAFARNEJAD, S. 2020. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *Biomed Res Int*, 2020, 6910312.
- TORBORG, S. R., LI, Z., CHAN, J. E. & TAMMELA, T. 2022. Cellular and molecular mechanisms of plasticity in cancer. *Trends Cancer*, 8, 735-746.
- TORRICELLI, P., FINI, M., GIAVARESI, G. & GIARDINO, R. 2002. HUMAN OSTEOBLAST CULTURES FROM OSTEOPOROTIC AND HEALTHY BONE: BIOCHEMICAL MARKERS AND CYTOKINE EXPRESSION IN BASAL CONDITIONS AND IN RESPONSE TO 1,25(OH) 2D 3. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 30, 219-227.
- TSUCHIDA, K., ZHU, Y., SIVA, S., DUNN, S. R. & SHARMA, K. 2003. Role of Smad4 on TGF-beta-induced extracellular matrix stimulation in mesangial cells. *Kidney Int*, 63, 2000-9.
- TSUDA, Y., NAKAGAWA, T., SHINODA, Y., KANATANI, A., KAWAI, T., TAGUCHI, S., YAMADA, Y., SAWADA, R., KUME, H., HOMMA, Y., TANAKA, S. & KAWANO, H. 2017. Skeletal-related events and prognosis in urothelial cancer patients with bone metastasis. *International Journal of Clinical Oncology*, 22, 548-553.
- TZENG, C. C., LIU, H. S., LI, C., JIN, Y. T., CHEN, R. M., YANG, W. H. & LIN, J. S. 1996. Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan. *Anticancer Res*, 16, 1797-804.
- VALASTYAN, S. & WEINBERG, R. A. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 275-92.
- VAN DER HORST, G., BOS, L. & VAN DER PLUIJM, G. 2012. Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma. *Mol Cancer Res*, 10, 995-1009.
- VAN DER VALK, J., BIEBACK, K., BUTA, C., COCHRANE, B., DIRKS, W., FU, J., HICKMAN, J., HOHENSEE, C., KOLAR, R. & LIEBSCH, M. 2018. Fetal bovine serum (FBS): past-present-future. *Altex*, 35, 1-20.
- VISVADER, J. E. & LINDEMAN, G. J. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*, 8, 755-768.
- WALSH, C. A., BIRCH, M. A., FRASER, W. D., GINTY, A. F. & GALLAGHER, J. A. 2000. Cytokine expression by cultured osteoblasts from patients with osteoporotic fractures. *Int J Exp Pathol*, 81, 159-63.
- WANG, J., LOBERG, R. & TAICHMAN, R. S. 2006. The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25, 573-587.
- WANG, N., REEVES, K. J., BROWN, H. K., FOWLES, A. C., DOCHERTY, F. E., OTTEWELL, P. D., CROUCHER, P. I., HOLEN, I. & EATON, C. L. 2015. The frequency of osteolytic bone metastasis is determined by conditions of the soil, not the number of seeds; evidence from in vivo models of breast and prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 34, 124.
- WANG, S.-H. & LIN, S.-Y. 2013. Tumor dormancy: potential therapeutic target in tumor recurrence and metastasis prevention. *Experimental Hematology & Oncology*, 2, 29.
- WEILBAECHER, K. N., GUISE, T. A. & MCCAULEY, L. K. 2011. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer*, 11, 411-25.
- WHITE, E. Z., PENNANT, N. M., CARTER, J. R., HAWSAWI, O., ODERO-MARAH, V. & HINTON, C. V. 2020. Serum deprivation initiates adaptation and survival to oxidative stress in prostate cancer cells. *Scientific Reports*, 10, 12505.

- WILLIAMS, R. D. 1980. Human urologic cancer cell lines. *Invest Urol*, 17, 359-63.
- WU, C.-T., LIN, W.-Y., CHANG, Y.-H., CHEN, W.-C. & CHEN, M.-F. 2017. Impact of CD44 expression on radiation response for bladder cancer. *Journal of Cancer*, 8, 1137-1144.
- WU, C.-T., LIN, W.-Y., CHEN, W.-C. & CHEN, M.-F. 2018a. Predictive Value of CD44 in Muscle-Invasive Bladder Cancer and Its Relationship with IL-6 Signaling. *Annals of Surgical Oncology*, 25, 3518-3526.
- WU, C. C. & BRATTON, S. B. 2013. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*, 19, 546-58.
- WU, S., DU, Y., BECKFORD, J. & ALACHKAR, H. 2018b. Upregulation of the EMT marker vimentin is associated with poor clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Journal of Translational Medicine*, 16, 170.
- XU, J., LAMOUILLE, S. & DERYNCK, R. 2009a. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*, 19, 156-72.
- XU, J., LAMOUILLE, S. & DERYNCK, R. 2009b. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19, 156-172.
- YANG, M. C., WANG, H. C., HOU, Y. C., TUNG, H. L., CHIU, T. J. & SHAN, Y. S. 2015. Blockade of autophagy reduces pancreatic cancer stem cell activity and potentiates the tumoricidal effect of gemcitabine. *Mol Cancer*, 14, 179.
- YASUDA, H. 2013. RANKL, a necessary chance for clinical application to osteoporosis and cancer-related bone diseases. *World J Orthop*, 4, 207-17.
- YIN, J. J., POLLOCK, C. B. & KELLY, K. 2005. Mechanisms of cancer metastasis to the bone. *Cell Res*, 15, 57-62.
- ZACHARIA, B., JOY, J., SUBRAMANIAM, D. & PAI, P. K. 2021. Factors Affecting Life Expectancy After Bone Metastasis in Adults — Results of a 5-year Prospective Study. *Indian Journal of Surgical Oncology*, 12, 759-769.
- ZAK, K. M., GRUDNIK, P., MAGIERA, K., DÖMLING, A., DUBIN, G. & HOLAK, T. A. 2017. Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure*, 25, 1163-1174.
- ZHANG, J., THORIKAY, M., VAN DER ZON, G., VAN DINTHER, M. & TEN DIJKE, P. 2020. Studying TGF- β Signaling and TGF- β -induced Epithelial-to-mesenchymal Transition in Breast Cancer and Normal Cells. *J Vis Exp*.
- ZHANG, Z., ZHANG, X., ZHAO, D., LIU, B., WANG, B., YU, W., LI, J., YU, X., CAO, F., ZHENG, G., ZHANG, Y. & LIU, Y. 2019. TGF- β 1 promotes the osteoinduction of human osteoblasts via the PI3K/AKT/mTOR/S6K1 signalling pathway. *Mol Med Rep*, 19, 3505-3518.
- ZHAO, H., CHEN, Q., ALAM, A., CUI, J., SUEN, K. C., SOO, A. P., EGUCHI, S., GU, J. & MA, D. 2018. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death & Disease*, 9, 356.
- ZHENG, H., BAE, Y., KASIMIR-BAUER, S., TANG, R., CHEN, J., REN, G., YUAN, M., ESPOSITO, M., LI, W., WEI, Y., SHEN, M., ZHANG, L., TUPITSYN, N., PANTEL, K., KING, C., SUN, J., MORIGUCHI, J., JUN, H. T., COXON, A., LEE, B. & KANG, Y. 2017. Therapeutic Antibody Targeting Tumor- and Osteoblastic Niche-Derived Jagged1 Sensitizes Bone Metastasis to Chemotherapy. *Cancer Cell*, 32, 731-747.e6.
- ZHENG, Y., ZHOU, H., DUNSTAN, C. R., SUTHERLAND, R. L. & SEIBEL, M. J. 2013. The role of the bone microenvironment in skeletal metastasis. *J Bone Oncol*, 2, 47-57.

7 Danksagung

Diese Dissertation wäre ohne das Wissen, die Zeit und das Engagement vieler Menschen nicht möglich gewesen. Ihnen allen möchte ich meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie Priv. Doz. Dr. rer. nat. Vera Grotheer, meiner Betreuerin des unfallchirurgischen Forschungslabors. Liebe Vera, deine Unterstützung, Geduld und dein offenes Ohr haben mir in den nötigen Halt für dieses Projekt gegeben. Besonders schätze ich, dass du immer verfügbar und erreichbar warst und auf meine Fragen stets schnell und mit großem Engagement geantwortet hast. Du hast mich nicht nur fachlich hervorragend begleitet, sondern auch motiviert und bestärkt. Vielen lieben Dank für deine Betreuung!

Ebenso danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Bittersohl, aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie sowie meiner Doktormutter, Priv. Doz. Dr. rer. nat. Michèle Hoffmann aus dem urologischen Forschungslabor, für die wertvolle Unterstützung während des Forschungs- und Schreibprozesses.

Mein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. rer. nat. Christoph Suschek, dem Leiter des unfallchirurgischen Forschungslabors. Vielen Dank für deine wertvollen wissenschaftlichen Einsichten während meiner Zeit im Labor, die Förderung und insbesondere Ermöglichung dieser Forschungsarbeit.

Ein besonderer Dank gilt dem gesamten Team des unfallchirurgischen Forschungslabors, insbesondere Sabine, Jutta, Christa und Samira. Vielen Dank für eure freundliche Aufnahme ins Laborumfeld, die Unterstützung und insbesondere Geduld bei der Durchführung der Experimente. Die gemeinsame Zeit im Labor hat mir nicht nur fachlich weitergeholfen, sondern auch, dank euch, großen Spaß bereitet.

Mein Dank geht ebenso an das Team des urologischen Forschungslabors für die Bereitstellung von Zelllinien und Materialien.

Ebenso danke ich an dieser Stelle der Forschungskommission und der Medical Research School der Heinrich-Heine-Universität für die Unterstützung und die Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie von ganzem Herzen danken. Ihr habt mir nicht nur im Rahmen dieser Forschungsarbeit jederzeit bedingungslose Unterstützung und Geduld entgegengebracht, sondern mir überhaupt erst die Möglichkeit gegeben, zu studieren und meinen Weg zur Ärztin zu gehen. Ohne euch wäre all das nicht möglich gewesen. Dafür bin ich euch unendlich dankbar!