

Aus der Klinik für Urologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin Campus Mitte
Direktor: Prof. Dr. med. S. Loening, F.A.C.S.

HABILITATIONSSCHRIFT

Bedeutung stromal-epithelialer Interaktionen im Harnblasengewebe und deren Einfluss auf die Karzinogenese

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Urologie

von

Frau Dr. med. Andrea Staack

Geboren am 14. September 1972 in Berlin

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der
Charité-Universitätsmedizin Berlin

Dekan: Prof. Dr. M. Paul

Eingereicht: am 4. Mai 2006

Datum der Habilitation: 6. Februar 2007

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Hofmann
2. Prof. Dr. med. C. Stief

Abkürzungen

Cathepsin B, H, L	CB, CH, CL
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
MMP	Matrixmetalloproteinase
SMA	Smooth muscle cell alpha-actin
SMG	Smooth muscle cell gamma-actin
TIMP	Tissue inhibitor der Matrixmetalloproteinasen
UGS	Urogenitalsinus
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ
uPAR	Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ-Rezeptor

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungen	4
1. Vorbemerkungen	5
2. Einleitung	7
2.1. Epidemiologie und Symptomatik des Harnblasenkarzinoms	7
2.2. Intra- und interzelluläre stromal-epitheliale Wechselwirkungen.....	8
2.3. Bedeutung von Proteasen auf die Karzinogenese und Tumorinvasion des Harnblasenkarzinoms.....	10
2.4. Genetische Veränderungen beim Harnblasenkarzinom	12
3. Eigene Literatur zu neu entwickelten Methoden in vivo und in vitro zur Untersuchung stromal-epithelialer Wechselwirkungen	15
3.1. Optimierte Methodik zur Urothelzellkultivierung in vitro (Originalarbeit 1)	15
3.2. Zur Technik der Zell- und Geweberekombinationen in vivo am Mausmodell (Originalarbeit 2).....	16
3.3. Dissektionsanleitung zur Präparation des Urogenitaltraktes beim Mausembryo (Originalarbeit 3)	20
4. Ergebnisse eigener Arbeiten	22
4.1. In vitro Studien zur Co-Kultivierung von Urothelzellen und Fibroblasten (Originalarbeit 1).....	22
4.2. In vivo Studien zu stromal-epithelialen Interaktionen im Harnblasengewebe am Rekombinationsmodell (Übersichtsarbeit)	23
4.3. Proteasen zur Tumordetektion im Urin und Gewebe der Harnblase (Originalarbeiten 4-6)	28
5. Diskussion und Ausblick	31
6. Zusammenfassung	34
7. Literaturverzeichnis	35
8. Danksagung	45

9. Eidesstattliche Erklärung	47
10. Anhang der eigenen Originalarbeiten, der Übersichtsarbeit, Publikationsliste und Kongressbeiträge	48
<u>Originalarbeit 1</u> : Organ and species specificity in the stimulation of transitional epithelial cell growth by fibroblasts	48
<u>Originalarbeit 2</u> : Quantitation of apoptotic activity following castration in human prostatic tissue in vivo	49
<u>Originalarbeit 3</u> : Mouse urogenital development: a practical approach	50
<u>Originalarbeit 4</u> : Cathepsin B, H, and L activities in urine of patients with transitional cell carcinoma of the bladder	51
<u>Originalarbeit 5</u> : Expression of cathepsins B, H, and L and their inhibitors as markers of transitional cell carcinoma of the bladder	52
<u>Originalarbeit 6</u> : In situ gene expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in transitional cell carcinoma of the human bladder	53
<u>Übersichtsarbeit</u> : Molecular, cellular and developmental biology of urothelium as a basis of bladder regeneration	54
Eigene Publikationsliste	55
Zur Publikation eingereichte Manuskripte	57
Relevante Kongressbeiträge	57

8. Danksagung

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit ist das Ergebnis eines kontinuierlichen Prozesses, der bereits während meines Medizinstudiums begann. Nur durch persönliche und institutionelle Unterstützung war es mir möglich, die Begeisterung, Ausdauer und Konsequenz zu erlangen, um mit dieser Arbeit einen Grundstein für eine weitere akademische Karriere legen zu können. Die Benennung der Menschen, die mich auf diesem Weg begleitet haben, ist mir ein besonderes Bedürfnis.

Es ist schwierig mit Worten zu beschreiben, welche Bedeutung die fachliche Unterstützung nachstehender Personen für mich hat. Herr Prof. Dr. Klaus Jung hat mich auf meinem Weg maßgeblich begleitet und mir eine stete wissenschaftliche und menschliche Unterstützung zukommen lassen. Ihm schulde ich meinen größten Dank. Ich schätze mich glücklich, sein Vertrauen in meine Arbeit stets genossen zu haben und bin froh, immer auf seine Hilfe und Beratung zurückgreifen zu können.

Herr Prof. Dr. Loening und Herr Prof. Dr. Schnorr haben mir ermöglicht, Forschungsarbeit mit klinischem Alltag in Einklang zu bringen. Ohne ihre nachhaltige Förderung, ihr Vertrauen in meine Tätigkeit und Aufforderung zur Umsetzung von eigenen Forschungsprojekten wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen. Ihnen verdanke ich viel Flexibilität und Hilfe bei der Umsetzung meiner ausländischen Forschungsprojekte.

Während meiner Forschungsaufenthalte in den Vereinigten Staaten sei der fördernde Einfluss von Prof. Dr. T. Stamey, Prof. Donna Peehl und Prof. Dr. Martha Terris von der Stanford University, Department of Urology sowie der Professoren Peter Carroll, Gerald Cunha sowie Simon Hayward der University of California San Francisco, Department of Urology erwähnt. Als motivierende Ideengeber waren sie allesamt Teil meiner wissenschaftlichen Entwicklung und hatten großen Anteil am Aufbau meiner Studien. Es bestehen darüber hinaus wertvolle Kooperationen zur UCSF sowie nach Prof. Haywards Umzug, zur Vanderbilt University Nashville, Tennessee, Department of Urologic Surgery.

Für die tägliche Arbeit gebührt den Mitarbeiterinnen der Urologischen Forschungsabteilung, Universitätsmedizin-Charité, Campus Mitte, insbesondere Frau S. Becker und Frau I. Baumert, dem Labor der Radiologie für die Nutzung von Geräten, meinen Doktoranden, Frau K. Henke, Frau E. Perez, Herrn C. Rupprecht sowie Dr. Claudia Abramjuk als Tierärztin für die Betreuung meiner Forschungsmäuse während unserer tierexperimentellen Studien, ein ganz besonderer Dank.

Vom Institut für Pathologie möchte ich Herrn PD Dr. G. Kristiansen meine Anerkennung für sein Interesse an meiner Arbeit sowie die grosse Unterstützung und Beteiligung an gemeinsamen Studien aussprechen.

Während der letzten Jahre konnte ich auf Zuwendungen unterschiedlicher Organisationen und Personen bauen. Die Heraeus-Stiftung sowie die Sonnenfeld-Stiftung haben meine Tätigkeit im Bereich der Urologischen Forschungsabteilung durch Gerätespenden unterstützt. Mithilfe zur Finanzierung der NUDE-Mäuse erfuhr ich durch eine private Zuwendung der Familie Raithel aus Kahla. Meinen Forschungsaufenthaltes an der Klinik für Urologie der Stanford University ermöglichte ein Stipendium der Konrad-Adenauer-Stiftung. Meine Forschungstätigkeit während des Post-doctoral Fellowships an der Klinik für Urologie der UCSF wurde durch die Unterstützung seitens des SPORE-Programms (NCI Specialized Program of Research Excellence) der UCSF möglich. Als weitere Hilfe bei der Umsetzung meiner Forschungsziele standen mir die Universitäre Forschungsförderung der Charite-Universitätsmedizin sowie einige Forschungspreise der Stiftung für Urologische Forschung e.V. zur Seite.

Der abschließende Gedanke gilt meinem familiären und privaten Umfeld. Was aus einem Menschen wird und was er zu leisten vermag, ist durch seine Umgebung beeinflusst. Ohne Eure Geduld, Nachsicht und mentale Unterstützung hätte ich es nicht geschafft. Euch, Bernd, Brigitte, Christian, Claudia, Heinrich, Helga, Karsten, Kristin, Lisa, Ralph, sage ich von ganzem Herzen Danke.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde, die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden und mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist (*gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité*).

Berlin, den 4.Mai 2006

Andrea Staack

10. Anhang der eigenen Originalarbeiten, der Übersichtsarbeit, Publikationsliste und Kongressbeiträge

Originalarbeit 1: Organ and species specificity in the stimulation of transitional epithelial cell growth by fibroblasts

[Staack A, Alexander T, Merguerian P, Terris MK. Organ and species specificity in the stimulation of transitional epithelial cell growth by fibroblasts. Eur Urol 2001; 39:471-477.]

Originalarbeit 2: Quantitation of apoptotic activity following castration in human prostatic tissue in vivo

[Staack A, Kassis AP, Olshen A, Wang Y, Wu D, Carroll PR, Grossfeld GD, Cunha GR, Hayward SW. Quantitation of apoptotic activity following castration in human prostatic tissue in vivo. *Prostate* 2003; 54:212-219.]

Originalarbeit 3: Mouse urogenital development: a practical approach

[Staack A, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, Carroll P. Mouse urogenital development: a practical approach. Differentiation 2003; 71:402-413.]

Originalarbeit 4: Cathepsin B, H, and L activities in urine of patients with transitional cell carcinoma of the bladder

[Staack A, Koenig F, Daniltchenko D, Hauptmann S, Loening SA, Schnorr D, Jung K: Cathepsins B, H, and L activities in urine of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. Urology 2002; 59:308-312.]

Originalarbeit 5: Expression of cathepsins B, H, and L and their inhibitors as markers of transitional cell carcinoma of the bladder

[Staack A, Tolic D, Kristiansen G, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Expression of cathepsins B, H, and L and their inhibitors as markers of transitional cell carcinoma of the bladder. Urology 2004; 63:1089-1094.]

Originalarbeit 6: *In situ gene expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in transitional cell carcinoma of the human bladder*

[Bhuvaramurthy V, Schroeder J, Denkert C, Kristiansen G, Schnorr D, Loening SA, Jung K, Staack A. In situ gene expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in transitional cell carcinoma of the human bladder. Oncol Rep 2004; 12:909-913.]

Übersichtsarbeit: Molecular, cellular and developmental biology of urothelium as a basis of bladder regeneration

[Staack A, Hayward SW, Baskin LS, Cunha GR. Molecular, cellular and developmental biology of urothelium as a basis of bladder regeneration. *Differentiation* 2005; 73:121-133.]

Eigene Publikationsliste

Originalarbeiten als Erst- bzw. Letztautor in Peer-reviewed Journals

1. **Staack A.** Alexander T, Merguerian P, Terris MK. Organ and species specificity in the stimulation of transitional epithelial cell growth by fibroblasts. *Eur Urol* 2001; 39: 471-7.
2. **Staack A.** Koenig F, Daniltchenko D, Hauptmann S, Loening SA, Schnorr D, Jung K. Cathepsins B, H, and L activities in urine of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2002; 59: 308-12.
3. **Staack A.** Kassis AP, Olshen A, Wang Y, Wu D, Carroll PR, Grossfeld GD, Cunha GR, Hayward SW. Quantitation of apoptotic activity following castration in human prostatic tissue in vivo. *The Prostate* 2003; 54: 212-219.
4. **Staack A.** Donjacour AA, Brody J, Cunha JR, Carroll P. Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation* 2003; 71: 402-413.
5. **Staack A.** Tolic D, Kristiansen G, Schnorr D, Loening ST, Jung K. Expression of cathepsins B, H, and L and their inhibitors as markers of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2004; 63: 1089-1094.
6. Bhuvaramurthy V, Schroeder J, Denkert C, Kristiansen G, Schnorr D, Loening SA, Jung K, and **Staack A.** In situ gene expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in transitional cell carcinoma of the human bladder. *Oncology Reports* 2004; 12: 909-13.
7. Bhuvaramurthy V, Schroeder J, Denkert C, Kristiansen G, Roigas J, Denkert C, Johannsen M, Lein M, Loening SA, Schnorr D, Jung K, **Staack A.** Differential gene expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in human renal cell carcinoma. *Oncology Reports* 2005; 14: 777-82.
8. Bhuvaramurthy V, Kristiansen G, Johannsen M, Loening SA, Schnorr D, Jung K, **Staack A.** *In situ* gene expression and localization of metalloproteinases MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, and their inhibitors

- TIMP1 and TIMP2 in human renal cell carcinoma. *Oncology Reports* 2006, 15:1379-84.
9. Jung K, von Hösslin K, Lein M, Ringsdorf M, Roigas J, Loening SA, Schnorr D, **Staack A.** Diagnostic and prognostic validity of serum bone turnover markers in metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Urology* 2006, 13: im Druck.
 10. **Staack A.** Schlechte H, Sachs M, Kristiansen G, Burkhardt M, Schnorr D. The clinical value of vesical leukoplakia and evaluation of the neoplastic risk by mutation analyzes of the tumor suppressor gene TP53. *International Journal of Urology* 2006, im Druck.

Originalarbeiten in Co-Autorenschaft in Peer-reviewed Journals

11. Johannsen M, Sachs M, Roigas R, Hinke A, **Staack A.** Loening SA, Schnorr D, Wille AH. Phase II trial of weekly paclitaxel and carboplatin chemotherapy in patients with advanced transitional cell cancer. *Eur Urol* 2005; 48: 246-251.
12. Abramjuk C, Jung K, Krell H-W, Juchem R, Peters R, Taymoorian K, **Staack A.** Stephan C, Schnorr J, Loening SA, Lein M. Matrix-metalloproteinase inhibitor Ro 28-2653 in combination with estramustine: tumor reducing effects on hormone sensitive prostate cancer in rats. *Anti-Cancer Drugs* 2005; 16: 855-61.

Übersichtsarbeit

Staack A. Hayward SW, Baskin LS, Cunha GR. Molecular, cellular and developmental biology of urothelium as a basis of bladder regeneration. *Differentiation* 2005; 73: 121-133.

Zur Publikation eingereichte Manuskripte

1. **Staack A**, Badendieck S, Johannsen M, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Plasma MMP2 in combination with MMP9 and TIMP1 improves the non-invasive detection of transitional cell carcinoma of the bladder. Eingereicht bei BMC Urology im Dezember 2005, in Revision.
2. Oottamasathien S, Williams K, Franco EO, Thomas JC, Saba K, Bhowmick NA, **Staack A**, DeMarco RT, Brock III JW, Hayward SW, Pope IV JC. Cultured bladder epithelium can interact with bladder mesenchyme to form bladder tissue in a tissue recombination model. Eingereicht bei J Urol im Februar 2006.
3. Franiel T, Fritzsche F, **Staack A**, Rost J, Hamm B, Beyersdorff D: Histopathologische Qualität von Prostatastanzzylindern: Vergleich einer MR-kompatiblen Biopsienadel mit einer im Ultraschall eingesetzten ferromagnetischen Biopsienadel. Eingereicht bei RöFo im April 2006.

Relevante Kongressbeiträge

1. Alexander TA, Terris MK, **Staack A**, Best CD, Merguerian PA. Urothelial cell dependence upon fibroblasts for growth in cell culture. 1996 Paralyzed veterans of America/ Spinal Cord Injury Summer Scholars Program, Stanford University, Kalifornien, USA, 22. August 1996. (Poster)
2. Alexander TA, Terris MK, **Staack A**, Best CD, Merguerian PA. Urothelial cell dependence upon fibroblasts for growth in cell culture. [Abstract 1009: J Urol 1997; 157 (suppl): 258]. 92th Annual Meeting of the American Urological Association, New Orleans, April 12-17, 1997. (Poster)

3. **Staack A**, Terris MK. Urothelial cell dependence upon fibroblasts for growth in cell culture. 8. Europäische Studentenkonferenz Charité, Berlin, 18. Oktober 1997. (Vortrag, Poster)
4. Terris MK, **Staack A**. Organ and species specificity in the stimulation of transitional epithelial cell growth by fibroblasts. International Bladder Research Congress, San Francisco, 23. April 1998. (Poster)
5. Terris MK, **Staack A**. Evaluation of potential growth factors involved in the stimulation of transitional epithelial cell growth by fibroblasts. International Bladder Research Congress, San Francisco, 23. April 1998. (Poster)
6. **Staack A**, Guddat H-M, Schlechte HH, Loening SA. Leukoplakie: Eine anatomische Variante in der weiblichen Harnblase. 4. Tagung der Berliner Urologischen Gesellschaft gemeinsam mit der 40. Tagung der Vereinigung der Norddeutschen Urologen und der Societas Urologica Danica, Berlin, Juni 1998. (Vortrag)
7. Terris MK, **Staack A**. Organ and species specificity in the stimulation of transitional epithelial cell growth by fibroblasts. 74th Annual Meeting Western Section, American Urological Association, Kona, Hawaii, 28. Oktober 1998. (Poster)
8. Terris MK, **Staack A**. Evaluation of potential growth factors involved in the stimulation of transitional epithelial cell growth by fibroblasts. 74th Annual Meeting Western Section, American Urological Association, Kona, Hawaii, 28. Oktober 1998. (Poster)
9. **Staack A**, Lee AM, Terris MK. Response of normal human and porcine urothelium to growth factors. Annual Meeting of the Society of Woman in Urology, Dallas, 4. Mai 1999. (Poster)
10. **Staack A**, Koenig F, Daniltchenko D, Lein M, Carroll PR, Hayward SW, Schnorr D, Jung K. Expression of cathepsin B, H, and L in the urine of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. International Bladder Research Congress, Washington D.C., März 2001. (Poster)
11. **Staack A**, Wu D, Kassis A, Wang Y, Grossfeld G, Hayward SW, Cunha G. Quantitation of apoptotic activity following castration in human prostate

- tissue in vivo. Prostate Retreat UCSF Comprehensive Cancer Center, San Francisco, 19. März 2001. (Poster)
12. Wu D, Wang Y, **Staack A**, Sudilovsky D, Cunha G, Hayward SW. A human epithelial model of hormonal carcinogenesis. Prostate Retreat UCSF Comprehensive Cancer Center, San Francisco, 19. März 2001. (Poster)
 13. **Staack A**, Wu D, Kassis A, Wang Y, Grossfeld G, Hayward S, Cunha G. Quantitation of apoptotic activity following castration in human prostate tissue in vivo. [Abstract 856: J Urol 2001; 165 (suppl): 207]. 96th Annual Meeting of the American Urological Association, Anaheim, June 2-7, 2001. (Poster)
 14. **Staack A**, Wu D, Uretsky S, Cunha GR, Grossfeld GD, Gold LI, Hayward SW. Effects of androgen deprivation on the levels of TGF-beta isoforms and TGF-beta signaling receptors type I and type II in a model for human prostate cancer. [Abstract 208: J Urol 2001; 165 (suppl): 51]. 96th Annual Meeting of the American Urological Association, Anaheim, June 2-7, 2001. (Poster)
 15. Wu D, Wang Y, **Staack A**, Sudilovsky D, Cunha G, Hayward S. A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. [Abstract 192: J Urol 2001; 165 (suppl): 47]. 96th Annual Meeting of the American Urological Association, Anaheim, June 2-7, 2001. (Poster)
 16. **Staack A**, Wu D, Kassis A, Wang Y, Grossfeld G, Hayward S, Cunha G. Quantifizierung der Apoptoserate nach Androgenentzug in vivo in humanem Prostatagewebe. [Abstract: Urologe A 2001; 1 (suppl)]. 53. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Düsseldorf, 20. September 2001. (Poster)
 17. **Staack A**, Sudilovsky D, Meng M, Carroll P, Grossfeld GD, Cunha GR, Hayward SW. Changes in extracellular matrix protein expression in low grade and high grade human prostate carcinomas. Prostate Retreat UCSF Comprehensive Cancer Center, San Francisco, 12. März 2002. (Poster)

18. **Staack A.** Interaktion von Stroma und Epithelzellen bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms. Wissenschaftliches Symposium für Urologie, Charité Berlin, 30. August 2002. (Vortrag)
19. **Staack A.**, Carroll P, Hayward SW, Cunha GR. Stromal-epitheliale Wechselwirkungen am Rekombinationsmodell aus normalem und neoplastischem Harnblasengewebe. [Abstract P5.4: Urologe A 2002; 41 (suppl)]. 54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Wiesbaden, 18.-21. September 2002. (Poster)
20. **Staack A.** Maligne Transformation von Urothelzellen durch Tissue Engineering. 16. Symposium Experimentelle Urologie, Arbeitskreis Experimentelle Urologie, Lübeck, 11.-13. März, 2004. (Vortrag)
21. **Staack A.**, Ringsdorf M, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, Carroll P. A practical approach to study epithelial-mesenchymal interactions in prostatic development. [Abstract P2.7: Urologe A 2004; 43 (suppl): 19]. 56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Wiesbaden, 22.-25. September 2004. (Poster)
22. **Staack A.**, Ringsdorf M, Tolic D, Kristiansen G, Schnorr D, Loening ST, Jung K. Cathepsins B, H, and L and their inhibitors as markers of transitional cell carcinoma of the bladder. [Abstract P4.11: Urologe A 2004; 43 (suppl): 30]. 56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Wiesbaden, 22.-25. September 2004. (Poster)
23. **Staack A.** Neue Diagnostik und Tumormarker beim Harnblasenkarzinom. Berliner Urologische Gesellschaft e.V, Berlin, 17.11.2004. (Vortrag)
24. **Staack A.**, Guddat H-M, Schlechte H, Sachs M, Loening ST, Schnorr D. Leukoplakia of the female bladder-an anatomic variant. [Abstract V2.2: Urologe A 2005; 44 (suppl): 76]. 57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Düsseldorf, 21.-24. September 2005. (Vortrag)