

3. Eigene Literatur zu neu entwickelten Methoden *in vivo* und *in vitro* zur Untersuchung stromal-epithelialer Wechselwirkungen

3.1. Optimierte Methodik zur Urothelzellkultivierung *in vitro* (Originalarbeit 1)

Parakrine Signaltransduktionen beeinflussen die Entwicklung und die Funktion von Organen während der Embryogenese, der Karzinogenese, der Gewebereparatur und Alterungsprozessen. Wir wissen aus eigenen *in vitro* Studien, dass dabei Proteine unterschiedlicher Gewebekomponenten, die z.B. vom Epithel oder Stroma sezerniert werden, involviert sind [18].

Die Rekombinationstechnik kann zur Evaluation dieser stromal-epithelialen Wechselwirkungen *in vivo* genutzt werden. Eine der Hauptbeeinträchtigungen dieses Modells bestand in der Schwierigkeit, humane primäre Urothelzellen zu kultivieren und diese in ausreichender Menge für anschließende Rekombinationsexperimente zur Verfügung zu haben. Im Labor der Urologischen Klinik der Stanford University habe ich 1995 begonnen, die Wachstumsbedingungen zu optimieren, die Einfluss auf Proliferation und Differenzierung humaner primärer Urothelzellkulturen nehmen:

- a) Etablierung eines Lysierungspuffers für Erythrozyten zur verbesserten Reinigung des Gewebes nach Erhalt aus dem OP;
- b) Modifikation des Wachstumsmediums u.a. durch 1%igem Zusatz von fetalem Rinderserum, spezielle Zusätze (Aminosäuren, Hydrokortison, Selen), die alle anhand von Wachstumskurven ausgetestet wurden (*siehe dazu Methodenteil in [18]*);
- c) Manuelle Kollagenbeschichtung der Zellkulturschälchen mit gereinigtem Kollagen Typ 1 als Kollagenmatrix (Collagen Corp., CA) zur verbesserten Adhäsion der Zellen, zur Gewähr eines einschichtigen Wachstums im Inkubationsschälchen und Verringerung einer Kontamination der Zellkultur mit Fibroblasten;

- d) Schälchenbeschichtung mit extrazellulärer Matrix zur Verbesserung der Adhäsion und Proliferation der Urothelzellen;
- e) Zellpassagierung unter Benutzung von Trypsin/EDTA in optimierter Konzentration (hierzu wurden ebenfalls Wachstumskurven angefertigt, die die Proliferationsrate der Urothelzellen nach der Benutzung von unterschiedlichen Konzentrationen von Trypsin/EDTA untersuchten), um besonders schonend die Zellen vom Schälchenuntergrund abzulösen;
- f) Zugabe von Cholera toxin zum Nährmedium, welches Epithelzellwachstum fördert und hemmend auf die Entwicklung von Fibroblasten wirkt;
- g) Anfertigung einer Urothelzell-, Kollagensuspension. Nach Gewebeernte und initialer Präparation werden die kleinen epithelialen Gewebefragmente (40µm) mit einer Kollagenlösung vermischt. Nach 7-10 Tagen wachsen einzelne Urothelzellen aus der Kollagensuspension ins Zellkulturschälchen heraus. Nach Erreichen von Konfluenz werden die Zellen passagiert und kryokonserviert [82].

Diese verbesserten Techniken konnte ich bereits 1998 an Klinik für Urologie der Charité einführen und daraus resultierende Ergebnisse auf mehreren Kongressen vorstellen (*siehe Anhang Kongressbeiträge: **Staack et al.** 1997, 1998, 2001, 2002*).

3.2. Zur Technik der Zell- und Gewebekombinationen in vivo am Mausmodell (Originalarbeit 2)

Zur experimentellen Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Stroma und Urothel wird ein Zell- bzw. Gewebekombinationsmodell genutzt, das ich in den Jahren 2000 bis 2002 in der Arbeitsgruppe von Prof. Cunha und Prof. Hayward an der UCSF erlernen und an der Klinik für Urologie der Charité, Berlin weiterentwickeln konnte. In diesem Modell können Zellen unterschiedlicher

Herkunft bzw. unterschiedliche Gewebearten miteinander rekombiniert werden (Abb. 1).

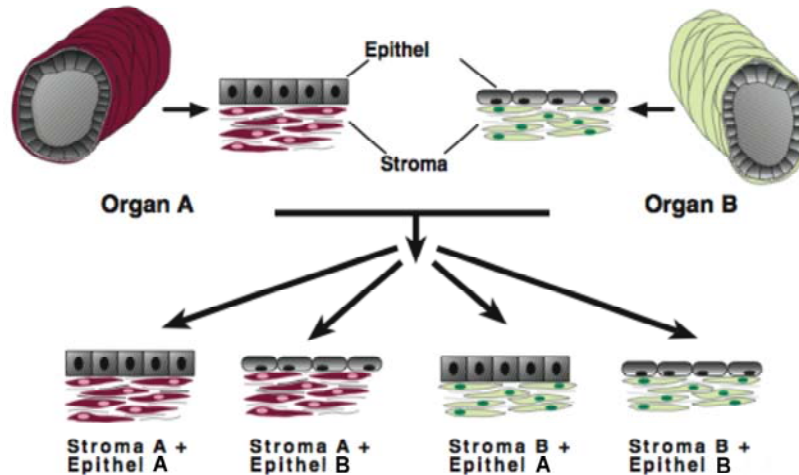


Abb. 1: Schema zum Prinzip der Zell-, Geweberekombination. Stroma- und Epithelzellen werden voneinander getrennt präpariert. Nach der Isolation werden die Zellen rekombiniert. Die Rekombination erfolgt entweder homotypisch, d.h. Stroma und Epithelzellen des gleichen Organs werden miteinander rekombiniert oder heterotypisch, d.h. Stroma und Epithel von verschiedenen Organen werden miteinander rekombiniert (mit freundlicher Genehmigung modifiziert nach [83]).

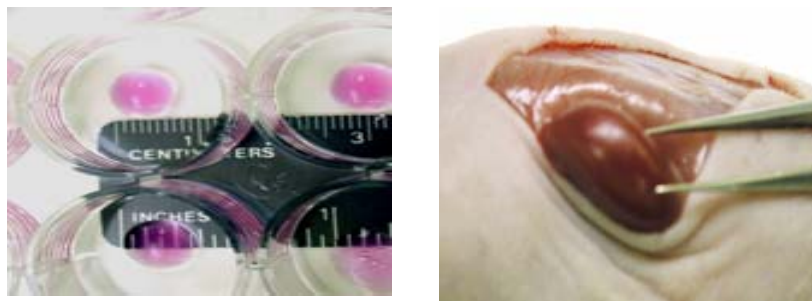


Abb. 2: Links: Kollagenpellets mit Zellsuspension bzw. Zell- und Gewebesuspension; Rechts: Transperitoneal freigelegte Niere einer 8 Wochen alten NUDE-Maus in Vorbereitung zur Implantation des Kollagenpellets. Die Pinzettenspitze veranschaulicht das Größenverhältnis zur luxierten Niere.

Das Zell-Kollagen-Pellet polymerisiert und steht zur Implantation unter die Nierenkapsel einer NUDE-Maus zur Verfügung (Abb. 2). An diesem gut

vaskularisierten Ort *in vivo*, unter dem physiologischen Nährstoffangebot des athymischen Mauswirts, kann die Funktion des Zell- bzw. Gewebematerials unter optimalen Bedingungen erhalten werden. Die Zellen können ferner proliferieren, sich reorganisieren, formieren und differenzieren. Es werden Substanzen sezerniert, die phänotypische Veränderungen beim Stroma bzw. Urothel bewirken. Nach einer bestimmten Inkubationszeit ist das Implantat unter der Nierenkapsel leicht wieder auffindbar und steht zur weiteren experimentellen Auswertung zur Verfügung.

Während eines Forschungsaufenthaltes konnte ich die Technik des subkapsulären renalen Graftings direkt im Labor von Prof. G. Cunha, Department of Anatomy, UCSF, USA erlernen und auf Fragen zur stromal-epithelialen Interaktion der Harnblase übertragen. Unter der folgenden Webseite ist die Technik schrittweise erklärt und bildlich dargestellt: <http://mammary.nih.gov/tools/mousework/Cunha001/index.html>. Dieses Modell ermöglicht es, humanes Gewebe unter Beibehaltung seiner normalen Funktion und Differenzierung *in vivo* zu untersuchen und ist Voraussetzung und Gegenstand für eigene Originalarbeiten [84] und Kongressbeiträge [9].

Die initiale Studie zu Effekten auf Gewebe, welches sich *in vivo* unter der Nierenkapsel einer athymischen Maus befindet, wurde von mir mit benignem Prostatagewebe durchgeführt [85]. Ziel dieser Studie war es, durch Androgenentzug eine Apoptose im BPH-Gewebe zu induzieren und die Androgenabhängigkeit auf die Apoptose des humanen Prostataepithels zu untersuchen. Es wurden nach Adenomektomien von Patienten mit nachgewiesener benigner Prostatahyperplasie Prostatagewebeproben unter die Nierenkapsel von männlichen NUDE-Mäusen eingepflanzt. Die Implantationsstechnik erlaubt eine Zellmanipulation *in vivo*. Die Mäuse der einen Versuchsgruppenhälfte wurden an aufeinander folgenden Tagen -bis zum Tag 21- durch Kastration androgendepriviert. In der anderen Hälfte der Versuchsgruppe befanden sich die humanen Prostatagewebeproben unter der Nierenkapsel ungestört unter dem physiologischen Androgeneinfluss der Maus. Die Apoptose im humanen Prostatagewebe wurde nach Entnahme aus dem

Mauswirt mittels TUNEL-Färbung ermittelt. Wir konnten in diesem *in vivo*-Experiment die Apoptoserate quantifizieren und zeigen, dass durch einen Androgenentzug im Mauswirt die Apoptose im humanen Prostataepithel signifikant induziert wird mit der höchsten induzierten Apoptoserate am 3. Post-Kastrationstag [85].

Diese anhand von BPH-Gewebe *in vivo* experimentell gewonnenen Erfahrungen sowie die verbesserte Methodik zur Urothelzellkultivierung bildeten die Grundlage für weitere Studien zur Untersuchung der stromal-epithelialen Interaktion beim Harnblasenkarzinom. In einer weiteren Studie wurden Harnblasen von Ratten und von Mausembryos entnommen, um Urothel und Stroma zu isolieren [82]. Von den Epithel- und Stromazellen wurden separate Zellkulturen angelegt. Danach wurden Rekombinationen aus Urothelzellen und embryonalen Stromazellen (Mesenchym) der Maus angefertigt. Diese Zell-, Geweberekombinationen wurden unter die Nierenkapsel von 7-8 Wochen alten athymischen Mäusen zur weiteren Differenzierung und Proliferation implantiert. Die Präparate wurden einmal nach 28 und nach 42 Tagen geerntet. Die explantierten Rekombinationen wurden anschließend mit H&E sowie immunhistochemisch mit Uroplakin, Smooth muscle alpha-actin (SMA) und Smooth muscle gamma-actin (SGA) angefärbt und ausgewertet. Die immunhistochemische Anfärbung der Rekombinationsschnitte präsentierte eine strukturelle Stromadifferenzierung und eine Organformation. Mit dieser Arbeit konnten wir zeigen, daß Rattenblasenurothel erfolgreich isoliert, kultiviert und kryokonserviert werden kann, um für weitere Experimente zur Verfügung zu stehen. Es ist uns das erste Mal gelungen, eine Geweberekombination aus primär kultiviertem Rattenurothel und embryonalem Blasenstroma der Maus anzufertigen. Mit dieser Methode steht eine wichtige Technik zur Verfügung, um molekularbiologische Mechanismen der Harnblasenentwicklung und der Entstehung von Erkrankungen zu untersuchen [82].

3.3. Dissektionsanleitung zur Präparation des Urogenitaltraktes beim Mausembryo (Originalarbeit 3)

Aufgrund der großen Bedeutung mesenchymal-epithelialer Interaktionen in der Entwicklung des Urogenitaltraktes ist es für Forschungsprojekte essentiell, embryonales Epithel und Mesenchym zu isolieren. Durch ein genaues anatomisches Verständnis von Mausembryos kann Mesenchym des Urogenitalsinus (UGS) als Vorstufe von Prostata und Samenblase durch eine Mausdissektion und exakte Gewebepräparation geerntet werden. Ich habe eine Photodokumentation zur schrittweisen Dissektion von Mausembryos während unterschiedlicher embryonaler Entwicklungsstufen angefertigt [84]. Bitte entnehmen Sie die umfangreichen Abbildungen und die Beschreibung der Dissektionstechniken dieser im Anhang aufgeführten Originalarbeit. Trainierte Dissektionsfertigkeiten sowie präzise Kenntnisse der Entwicklungsstadien des Embryos sind essentiell, den Urogenitaltrakt zu verstehen und Gewebestrukturen zu präparieren und zu isolieren. Urogenitalsinusmesenchym und Urogenitalsinusepithel werden benötigt, um Zellkulturversuche *in vitro* und Geweberekombinationsexperimente *in vivo* durchzuführen und Wechselwirkungen zu untersuchen. Genaue anatomische Kenntnisse embryonaler Entwicklungsstufen während der Embryogenese sind besonders für Experimente mit knock-out Mäusen, beispielsweise für eine Untersuchung von Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, verschiedenen Homeobox-Genen, wie in *Kapitel 2.4.* aufgeführt ist, essentiell. Der UGS ist erst ab dem 15. Tag in der Embryonalentwicklung ausgebildet; die ambisexuelle Entwicklung endet am 16. Tag. Zur besseren Unterscheidung von Mutationen bzw. nicht angelegten Organen in genetisch veränderten Versuchsmäusen soll ebenfalls die Photodokumentation der normalen Embryonalentwicklung der Maus zum Vergleich und zur Vorlage bei der Beurteilung von Entwicklungsdefekten bzw. von experimentell veränderten Tieren dienen, beispielsweise entwickeln FGF-10 knock-out Mäuse keine Prostata und andere männliche Reproduktionsorgane.

Für die Dissektionsanleitung in dieser Arbeit wurden 16 Tage alte Mausembryos aus CD-1 Mäusen entnommen (*siehe Abbildung 10, S. 409 in*

Originalarbeit 3 im Anhang). Um den Urogenitaltrakt zu präparieren, müssen die gastrointestinalen Organe vorsichtig mit Schere und Pinzette unter einem Dissektionsmikroskop entfernt werden (*siehe Abbildung 11, S. 409 in Originalarbeit 3 im Anhang*). Nach dem die oberen Anteile des Genitaltraktes (Gonaden, die Müllerschen Gänge und Wolffschen Gänge) freipräpariert sind, wird die Harnblase nach kaudal disloziert, um den UGS unterhalb der prostatatischen Region von der Urethra zu lösen (*siehe Abbildung 13, S. 412 in Originalarbeit 3 im Anhang*). Durch Trypsinisierung wird der UGS in Epithel und Mesenchym separiert (*siehe Abbildung 14, S. 413 in Originalarbeit 3 im Anhang*). Mit dieser Methode ist es möglich, den UGS zu isolieren und Urogenitalsinusmesenchym sowie –epithel für Geweberekombinationsstudien zu nutzen. Dieses illustrierte Tutorium bietet eine anatomische und methodische Grundlage für zukünftige Forschungsaufgaben **[84]**.