

## 4. Ergebnisse eigener Arbeiten

### ***4.1. In vitro Studien zur Co-Kultivierung von Urothelzellen und Fibroblasten (Originalarbeit 1)***

Es wird eine Abhängigkeit der Urothelzellen von Blasenfibroblasten der Basalmembran angenommen. Dieses intrazelluläre Verhältnis zwischen Epithel und Stroma haben wir in diesem Co-Kultivierungsexperiment untersucht [18]. Wir legten primäre Zellkulturen aus humanem Blasenepithel, Ureterepithel und aus intestinalen Fibroblasten an. Weiterhin wurden Urothelzellen und Fibroblasten vom Schwein kultiviert. Die Urothelzellen wurden mit Fibroblasten co-kultiviert und die Wachstumskurven mit den Urothelzellen und Fibroblasten, die jeweils allein kultiviert wurden, verglichen. Zusätzlich wurde das Medium der Fibroblastenkultur entnommen, gefiltert und gesammelt. Mit diesem Fibroblasten spezifischen, konditionierten Medium wurden die Urothelzellkulturen für jeweils 6, 12 und 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das humane und porcine Urothelzellwachstum unter der Co-Kultivierung mit Fibroblasten sowie unter dem konditionierten Medium ausgewertet.

Wir konnten schlussfolgern, dass die humanen Urothelzellkulturen eine signifikante Wachstumsstimulation durch die Co-Kultivierung mit humanen Fibroblasten sowie durch das mit humanen Fibroblasten konditionierte Medium über eine Inkubationszeit von 24 Stunden erfahren haben. Die Co-Kultivierung der humanen Urothelzellen bzw. Kultivierung mit konditioniertem Medium von intestinalen Fibroblasten oder porcinen Fibroblasten zeigte keine signifikante Wachstumsstimulation. Es handelt sich also um Organ- und Spezies-spezifische Substanzen, die gelöst vorliegen und eine Epithelstimulation bewirken. Diese sezernierten Substanzen gilt es, in zukünftigen Forschungsprojekten zu isolieren, um Interaktionsmechanismen zwischen den beiden Zelltypen zu verstehen und perspektivisch bei Erkrankungen der Harnblase gezielt therapeutisch zu intervenieren [18].

Angestrebtes Ziel ist es, Langzeiturothelzellkulturen zu erhalten. In einer weiteren Studie haben wir Urothel von Rattenblasen vom Stroma getrennt und in 40µl kleine Kollagensuspensionen mit den Urothelzellen angelegt [82]. Nach 7-10 Tagen wuchsen die Urothelzellen vom Kollagenpellet hinaus ins Zellkulturgefäß bis zum Erreichen einer Konfluenz, wurden dann passagiert und kryokonserviert. Immunhistochemisch konnte eine reine Epithelzellkultur bestätigt werden, die auch nach mehr als 20 Zellpassagen Uroplakin exprimierte. Wir haben weiterhin zum ersten Mal gezeigt, dass es möglich ist, diese Urothelzellen für spätere Geweberekombinationsexperimente *in vivo* zu verwenden [82].

#### **4.2. *In vivo* Studien zu stromal-epithelialen Interaktionen im Harnblasengewebe am Rekombinationsmodell (Übersichtsarbeit)**

Neue Strategien zur Blasenrekonstruktion, wie beispielsweise beim Tissue engineering, setzen ein verbessertes Verständnis der Urogenitalentwicklung, molekularbiologischer und zellulärer Prozesse im Urothel sowie der Zell-, Zellinteraktion voraus, die für Gewebereparatur, Funktionserhalt, Gewebemöostase und Urotheldifferenzierung die Grundlage bilden. Durch einen Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe um Prof. Cunha an der UCSF erhielt ich die Möglichkeit, mich mit speziellen Arbeitstheorien und Techniken vertraut zu machen und konnte als Essenz in einer Übersichtsarbeit den derzeitigen Kenntnisstand zu Prozessen der Harnblasenregeneration und zur Blasenrekonstruktion publizieren [40]. Darin werden die wichtigsten Studien zu Eigenschaften des Urothels sowie zur Geweberekombination, die vor allem aus dieser Arbeitsgruppe stammen, benannt.

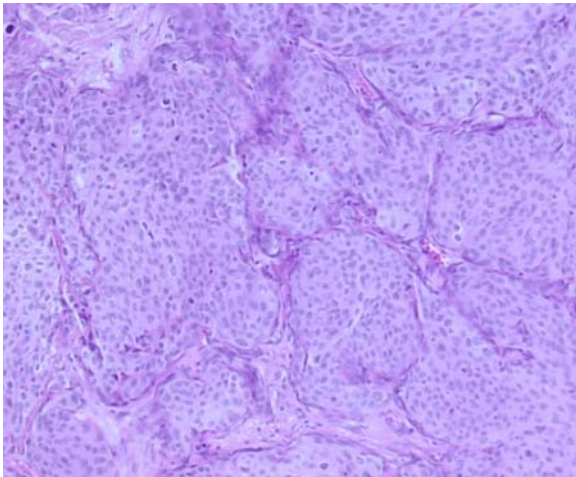
Schon früh wurde von Cunha *et al.* [86] erkannt, dass der urotheliale Phänotyp eine große Plastizität aufweist und induktive Signale völlig Spezies unspezifisch eine veränderte humane Urotheldifferenzierung bewirken können. Am Beispiel von Ratten-Prostatamesenchym konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass dieses in der Lage ist, den Phänotyp von erwachsenem humanen Blasenepithel zu verändern [87]. In diesem Experiment induzierte das

Mesenchym beim Urothel eine azinär-sekretorische Epithelmorphologie mit nachgewiesener PSA-Expression. In einem anderen Experiment wurde Ratten- und Mäusemesenchym vom Rektum in Kombination mit vollständig differenziertem Blasenepithel rekombiniert. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wurden im Urothel glanduläre Strukturen und Krypten, einer typischen glandulären Schleimhautmorphologie entsprechend, nachgewiesen. Die Epithelzellen zeigten eine positive Expression muzin-sezernierender Zellen mittels PAS (Periodic acid Schiff)-Anfärbung und hatten die Fähigkeit verloren, Uroplakin und Cytokeratin 7, 14 und 19 zu exprimieren [88]. Zwei Theorien erklären diese phänotypische De-Differenzierung. Zum einen im Sinne einer Transdifferenzierung, bei der voll ausgebildetes, erwachsenes humanes Urothel re-programmiert wird und in diesem Beispiel prostata-spezifische Differenzierungsmarker exprimiert. Zum anderen könnten bisher unbekannte Stammzellen die Entstehung prostatistisches Gewebes unter dem Einfluss spezieller Wachstumsfaktoren induzieren.

Die an der UCSF erworbenen Erfahrungen zur Geweberekombination [40] mündeten in eigene Forschungsprojekte mit Fragestellungen zu stromal-epithelialen Wechselwirkungen im Gewebe der Harnblase. Unter Zuhilfenahme des *in vivo* Modells haben wir eine Rekombination von normalen Blasenstromazellen von Mäusen mit der gut differenzierten humanen Urothelzelllinie RT112 angefertigt und zur weiteren Proliferation, Differenzierung und Formation unter die Nierenkapsel athymischer Mäuse implantiert. Es sollte der Einfluss bestimmter sezernierter Substanzen auf den Phänotyp der Blasenkarzinomzelllinie RT112 nachgewiesen werden. In vergangenen Arbeiten wurde bereits beschrieben, das Mesenchym in der Lage ist, neoplastische Eigenschaften eines Prostatakarzinoms zu verändern [17,89].

In unserem Experiment haben wir die Blasenzelllinie RT112 allein und in Kombination mit normalem Blasenstroma in Kollagen eingebettet und unter die Nierenkapsel von NUDE-Mäusen gepflanzt. Nach 8 Wochen wurden die Präparate aus den Tieren entnommen und aufgearbeitet. Die Blasenkarzinomzelllinie RT112 allein wuchs sehr schnell (Abb. 3), zeigte größere

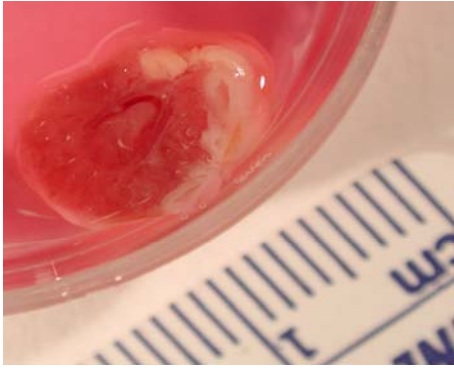
Blasenkarzinomzelllinie RT112 allein wuchs sehr schnell (Abb. 3), zeigte größere Grafts und formte große, invasiv wachsende Tumore. Die Immunexpression für Uroplakin fehlte, Cytokeratin 8 und 14 waren schwach exprimiert.



**Abb. 3:**

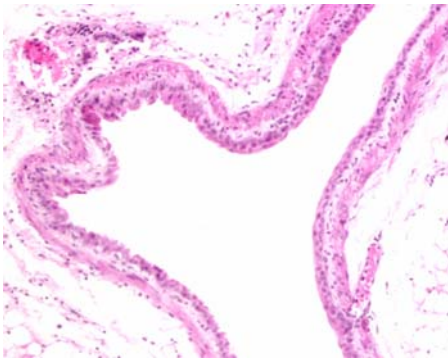
*Mäßig differenzierte  
Urothelkarzinomzelllinie RT112, 100x.  
H&E-Färbung zeigt epitheliales  
Tumorwachstum in Bündeln.*

Zellkombinationen mit RT112 und normalen Stromazellen waren makroskopisch kleiner (Abb. 4) und präsentierten eine differenzierte, zirkuläre lumenartige Urothelstruktur mit angrenzendem Stroma (Abb. 5) jeweils positiv für Uroplakin und SMA (Abb. 6, 7). Im gleichen Transplantat zeigte sich auch invasives Epithelzellwachstum mit Keratinisierungen, positiv für Cytokeratin 10. Die Antikörper gegen Cytokeratin 8 und 14 identifizierten luminale und basale Epithelzellen. Mit der Hoechst-Anfärbung wurden Zellen vom Mauswirt im Transplantat ausgeschlossen. Mit der Hoechst-Anfärbung kann die typische unregelmäßig gezackte Zellkernkonfiguration für Mäuse von glatt konfigurierten Zellkernen bei Ratten oder Menschen unterschieden werden. Phänotypische Veränderungen der mäßig differenzierten humanen Blasenzelllinie RT112 wurden in Kombination mit normalem Stroma induziert. Die Ergebnisse, in die auch Forschungsergebnisse zweier Dissertationen münden, befinden sich derzeit in Vorbereitung zur Publikation.



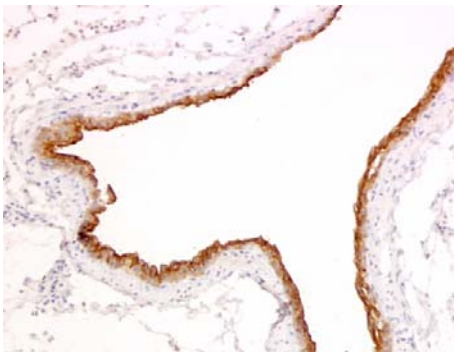
**Abb. 4:**

*Makroskopische Übersicht einer entnommenen Niere aus dem Mauswirt mit Zellrekombination der Zelllinie RT112 und normalem humanen Blasenstroma. Zu beachten sind die blasenähnlichen Zellformationen mit Lumenbildung.*



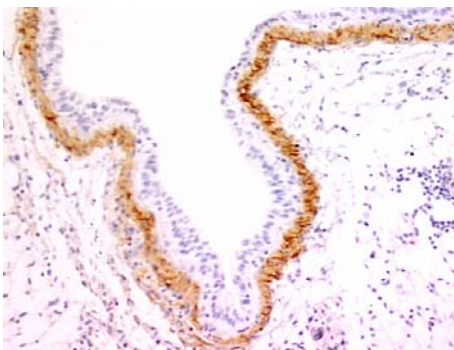
**Abb. 5:**

*Luminale Struktur der Zellrekombination mit Epithel und Stroma, H&E, 100x.*



**Abb. 6:**

*Nachweis von Urothel in einem Lumen der Zellrekombination, Uroplakin, 100x.*



**Abb. 7:**

*Nachweis glatter Muskulatur, die die Lumenformation umrandet, Smooth muscle alpha actin, 100x.*

In einem weiteren Experiment wurden, wie bereits im Methodenteil beschrieben, erwachsene Rattenblasen und embryonale Mausblasen in Epithel und Stroma getrennt. Nach erfolgreicher Zellkultivierung der jeweiligen Zelltypen wurden Rekombinationen mit Rattenepithelzellen und embryonalen Mausstromazellen angefertigt. Bei 6 von 10 Rekombinationspräparaten mit Urothelzellen lassen sich nach dem Wachstum *in vivo* unter der Nierenkapsel des Mauswirts zentrale Lumina erkennen, die von Urothel ausgekleidet sind und von Bindegewebe mit glatten Muskelzellen umgeben werden. Die immunhistochemische Untersuchung belegt eine positive Expression von Uroplakin der luminalen oberflächlichen Zellschicht und umgebende SMA positive Zellen. Nicht alle Strukturen innerhalb des Grafts weisen Lumina auf, aber der größte Teil bildet Epithelzellnester umgeben von glatten Muskelzellen. Weiterhin konnte man im Graft Blutgefäße mit eingeschlossenen Erythrozyten im Sinne einer Neovaskularisation feststellen. Diese neu gebildeten Blutgefäße waren SMA positiv und in der Hoechst-Anfärbung negativ für Zellen vom Mauswirt. Die Rekombinationen erhielten alle glatte Muskulatur, welches durch die immunhistochemische Anfärbung mit SMA und SMG verifiziert wurde. Die Expression beider Marker für glatte Muskelzellen bestätigt eine abgeschlossene Differenzierung des Stromas. Hingegen zeigten die Präparate ohne Epithel keinen immunhistochemischen Anhalt für eine Differenzierung der glatten Muskelzellen. Sie waren positiv für Vimentin, aber nicht für SMA. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt [16].

Unsere Ergebnisse vielfältiger Fragestellungen demonstrieren Wechselwirkungen zwischen Urothel und Stroma bzw. Mesenchym mit Differenzierung zur Harnblase. Wir stellen die Hypothese auf, dass in unserem Modell Epithelstrukturen früher Stadien der Blasenformation während der Embryogenese auftreten. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Lumenentwicklung zunimmt, je länger die Rekombination *in vivo* belassen wurde [9,82].

### **4.3. Proteasen zur Tumordetektion im Urin und Gewebe der Harnblase (Originalarbeiten 4-6)**

Ein weiteres Ziel unserer Forschungsarbeit ist es, Wechselwirkungen zwischen Harnblasenstroma und Urothel experimentell zu bestätigen sowie tumorassoziierte Substanzen zu isolieren. Durch die Analyse von Cathepsinen [61,63], Metalloproteinasen [12] und dem Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) [54] wurden die Auswirkungen dieser Proteasen auf die Zerstörung der extrazellulären Matrix bei der Tumorprogression der Harnblase in unserem Labor aufgezeigt. Mit der etablierten Rekombinationsmethode können wir perspektivisch den molekularen Mechanismus der Harnblasenentwicklung sowie die Entstehung von Erkrankungen für diesen Gewebetyps genauer untersuchen. Aus eigenen Arbeiten wissen wir, dass Proteasen einen entscheidenden Einfluss auf die Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms nehmen.

Zu den von uns untersuchten Proteasen gehören die Cathepsine B, H, und L im Urin [63], in Blasenzelllinien und im Gewebe [61] sowie von uPA im Gewebe (Originalarbeiten 4-6, siehe Kapitel 10 im Anhang) [54]. Bisher existierten in der Literatur kaum Untersuchungen zu diesen proteolytischen Enzymen beim Harnblasenkarzinom.

Wir haben mittels Spektrofluorometrieassays die katalytische Aktivität der CB, CH, CL und ihrer Inhibitoren im Urin bei Patienten mit diagnostiziertem Harnblasenkarzinom sowie bei einer gesunden Kontrollgruppe bestimmt (Originalarbeit 4) [63]. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde bei Patienten mit muskelinvasiven Karzinomen eine statistisch signifikante Aktivitätserhöhung für CL im Urin ermittelt. Bei CB und CH wurden keine signifikante tumor-assoziierten Enzymaktivitäten gemessen.

In einer weiteren Studie haben wir die katalytische Aktivität der Cathepsine B, H und L und ihrer Inhibitoren in normalem und malignem humanen Blasengewebe gemessen sowie in verschiedenen differenzierten Blasenzelllinien (HCV29, normal; RT4, gut differenziert; J82, schlecht differenziert) bestimmt (Originalarbeit 5) [61]. Unsere Ergebnisse zeigten einen statistisch signifikanten

Unterschied zwischen der CB- und CH-Expression in normalem Harnblasengewebe und in Karzinomgewebe mit erhöhter Expression. Die Expressionen von CL und CIP zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Bei den Zelllinien wurden im Vergleich zur normalen Zelllinie HCV29 signifikant größere Mengen CB, CH und CL von der schlecht differenzierten Zelllinie J82 in den Überstand sezerniert. Zusätzlich zur Aktivitätsbestimmung der Cathepsine im Zellkulturüberstand wurden die Zellen lysiert, um den intrazellulären Enzymgehalt zu ermitteln. Die intrazelluläre Cathepsinaktivitäten von CB, CH, und CL bei der normalen Blasen Zelllinie waren statistisch signifikant höher als bei der schlecht differenzierten Zelllinie J82. Aus diesen Ergebnissen postulieren wir, dass mit zunehmender Entdifferenzierung der Zelllinie oder des Gewebes, die extrazelluläre Cathepsinaktivität zunimmt. In invasiven Tumoren beeinflussen die Cathepsine die Pathogenese durch proteolytische Prozesse. Dabei werden sie extrazellulär detektiert, da diese Cathepsine aktiv die Zellmembranen zerstören. Daher eignen sich Cathepsine auch zur Detektion im Urin.

uPA gehört zur Familie der Serinproteasen und ist an Metastasierungsprozessen durch Bindung an seinen Rezeptor (uPAR) beteiligt. Studien haben bereits gezeigt, dass uPA in malignem Gewebe stärker exprimiert wird. Wir haben in einer eigenen Arbeit die Untersuchung der Gen- sowie Proteinexpression von uPA und uPAR getrennt im normalen und malignem Harnblasenstroma und -epithel vorgenommen, um Aussagen zur Tumorprognose zu treffen (*Originalarbeit 6*) [54]. Wir konnten eine statistisch signifikante gesteigerte mRNA-Expression von uPA und uPAR bei Gewebeproben von Patienten mit nachgewiesenem Harnblasenkarzinom im Vergleich zu normalem Blasengewebe feststellen. uPA-mRNA und das Protein wurden von Urothelzellen exprimiert, aber nicht von Stromazellen. Hingegen war eine Expression des Rezeptors uPAR im Urothel als auch im Stroma nachweisbar. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein Trend aufzeichnen, dass eine erhöhte uPA- bzw. uPAR-Expression mit einem aggressiveren Phänotyp in Zusammenhang steht.



Eine Differenzierung der Expressionslokalisation zwischen Urothel und Stroma erscheint im Hinblick auf die Tumorprogression von Bedeutung. Regulationsmechanismen, die die Interaktion zwischen Urothel und Stroma bei der Tumorinvasion und Metastasierung des Harnblasenkarzinoms beeinflussen, gilt es weiterführend zu untersuchen.