

## 5. Diskussion und Ausblick

Die Karzinogenese der Harnblase ist eine Störung der homöostatischen Wechselwirkungen zwischen Epithel und Stroma. Die stromal-epitheliale Interaktion sowie der Einfluss der beiden Gewebekomponenten auf die Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms mit Tumorzellinvasion und -progression sind bisher unzureichend untersucht. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir ein Modell etablieren, mit dem die Interaktion zwischen Epithel- und Stromazellen der Harnblase unterschiedlicher Dignität untersucht werden kann.

Die Tumorzellinvasion setzt drei Schritte voraus: 1.) die Tumorzelladhäsion, 2.) Proteasesekretion durch Tumorzellen mit konsekutiver Zerstörung der Zellmatrix und schließlich 3.) die Tumorzellmigration [90]. Eine Korrelation zwischen Proteolyse und Tumorprogression wird in der Literatur beschrieben [91]. Erhöhte Enzymaktivitäten stehen in Zusammenhang mit Tumorinvasion, Metastasierung und einer schlechten Prognose bei Patienten mit Harnblasenkarzinom [92]. Um ein besseres Verständnis zur Karzinogenese zu erhalten, ist es von grundlegender Bedeutung, die Einfluss nehmenden Proteine zu isolieren und die intrazelluläre sowohl als auch die interzelluläre Wirkung sowie ihre Wechselwirkungen im Gewebe zu analysieren. Beim Nierenzellkarzinom haben wir gezeigt, dass Epithelzellen als auch Stromazellen uPA-mRNA exprimieren [52]. Beim Harnblasenkarzinom konnten wir nur bei malignen Urothelzellen eine uPA-Expression und im benachbarten Tumorstroma eine alleinige uPAR-Expression nachweisen [54]. Nakanishi *et al.* [93] beobachteten hingegen eine immunhistochemische Expression von uPA im malignen Urothel als auch im Tumorstroma. Wir vermuten, dass uPA rezeptorgebunden an der Zellmatrix vorliegt, um eine proteolytisch aktivierte Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix zu initiieren.

Großes wissenschaftliches Interesse besteht darin, die einzelnen proteolytischen Proteine und ihre Rezeptoren zu finden, die an der Tumorprogression beteiligt sind, um sie zu isolieren und im weiteren Schritt therapeutisch zu blockieren. Der exakte Mechanismus, der die proteolytische Zersetzung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix bewirken, ist noch

nicht vollständig geklärt. Unsere *in vitro* Versuche schreiben dem Plasminogen vom Urokinase-Typ sowie den Cathepsinen L im Urin und Cathepsinen B und H in Zellen und im Gewebe eine prognostische Bedeutung beim Harnblasenkarzinom zu. Es zeigt sich, dass mit zunehmender Tumoraggressivität die Enzymaktivitäten bzw. die Expression erhöht sind. In folgenden Arbeiten ist es von Interesse, die Expression und Enzymaktivitäten *in vivo* an benignem und malignem Urothel und Stroma der Harnblase zu untersuchen. Dazu existieren bereits vorbereitende Experimente, die anhand von Blasenzelllinien eine Interaktion zwischen Urothel und Stroma in unserem *in vivo* Modell beschreiben [18]. In den nächsten Versuchen steht die Rolle der Serin- und Cysteinproteasen im Vergleich zwischen benignem und malignem Gewebe in der Rekombination im Vordergrund.

In weiteren Projekten sollen genotypische Veränderungen anhand von Expressionsunterschieden differentieller Gene untersucht werden, die durch den Einfluss von normalem Stroma der Harnblase auf unterschiedlich differenziertes Urothel zurückzuführen sind. Im Fokus stehen Proteasen, die bereits in unseren Vorarbeiten als Kandidaten-Gene beschrieben wurden [12,40,54,63] sowie weitere Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmoleküle. Unter Anwendung unserer optimierten Methodik zur Anfertigung primärer Zellkulturen werden jeweils benignes und malignes Urothel und Stroma kultiviert. Mit dem Zellmaterial sollen anschließend Rekombinationsexperimente durchgeführt werden. Nach Explantation der Zellrekombinationspräparate aus dem Mauswirt werden diese nach der Entnahme und Gefrierschnittanfertigung unter Zuhilfenahme eines Lasermikrodissektionsmikroskops in Urothel und Stroma separiert. Hiernach wird die RNA separat aus den jeweiligen Lasermikrodissektaten der Zellrekombinationen (Urothel+Stroma) isoliert. Das Screening der herauf- und herunterregulierten Gene im Urothel und Stroma soll durch eine Oligonukleotid-Mikroarray-Analyse durchgeführt werden. Die Validierung bedeutender Expressionsmuster erfolgt durch die quantitative RT-PCR. Um die Expressionsunterschiede auf Proteinebene zu überprüfen, werden abschließend immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Ziel dieser Arbeit wird es

sein, malignes Urothel in Abhängigkeit vom Harnblasenstroma zu untersuchen, um Wechselwirkungen zu analysieren, sezernierte Substanzen zu isolieren und daraus Ansätze zur Therapie des Harnblasenkarzinoms abzuleiten.

Fortschritte in der Zellkultivierung *in vitro* schaffen neue Möglichkeiten, ausreichend Zellmaterial für Geweberekombinationsexperimente und Genmanipulationsversuche zur Verfügung zu haben. Sie bilden weiterhin eine experimentelle Basis bei der Gewinnung von autologem Urothel und Stroma zur Konstruktion einer humanen bio-artifiziellen Blase durch neue Tissue engineering-Methoden [40,94,95].

Durch die Anwendung der Rekombinationstechnik können Zellsuspensionen von Harnblasengewebe unterschiedlicher Herkunft miteinander kombiniert werden. Die Implantation der Zellrekombination unter die Nierenkapsel einer athymischen Maus erlaubt unter physiologischen Bedingungen *in vivo* den Funktionserhalt sowie eine Zellorganisation und kann Differenzierung und Proliferation ermöglichen. Diese Methode ermöglicht ein verbessertes Verständnis morphologischer und funktioneller Charakteristika des Urothels.