

Aus dem Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
Fachrichtung Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# Die Effekte des Extrazellulären Adhärenzproteins auf Zellen nicht-muskulinvasiver Urothelkarzinome der Harnblase

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinische Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2021**

vorgelegt von  
Franziska Kathleen Velten  
geboren am 10.12.1994 in Bonn

Tag der Promotion: Mittwoch, der 09.06.2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Bischoff
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Stöckle

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
3D	Dreidimensional
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin Triphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BCG	Bacille Calmette Guerin
BrdU	Bromodesoxyuridin
Bzw	Beziehungsweise
CIS	Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
FKS	Fötales Kälberserum
FGFR	Engl. „fibroblast growth factor receptor“
Eap	Engl. „extracellular adherence protein“, Extrazelluläres Adhärenzprotein
Egr-1	Engl. „early growth response protein-1“
EGFR	Engl. „epidermal growth factor receptor“
engl.	Englisch
EORTC	European Organization for Research and Treatment on Cancer
ERK	Extrazellulär regulierte Kinasen
Et. al.	Et alii, lateinisch für „und andere“
G1	Malignitätsgrad 1 eines Tumors nach WHO
G2	Malignitätsgrad 2 eines Tumors nach WHO
G3	Malignitätsgrad 3 eines Tumors nach WHO
h	Stunde(n)
Her2	Engl. „human epidermal growth factor receptor-2“
ICAM-1	Engl. „intercellular adhesion molecule-1“
Map	Engl. „MHC-2 analogous protein“
MAP	Engl. „mitogen-activated protein“

MAPK	Engl. „mitogen-activated protein kinase“
MEK 1/2	MAP/ERK-Kinase
ml	Milliliter
MIBC	Engl. „muscle-invasive bladder cancer“ Muskelinvasives Karzinom der Harnblase
min	Minute
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NET	Engl. „neutrophil extracellular trap formation“
nm	Nanometer
NMIBC	engl. „non-muscle-invasive bladder cancer“ Nicht-muskelinvasives Karzinom der Harnblase
P70	Protein 70, ehemaliger Name von Eap
PBS	Engl. „phosphate buffered saline“ (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PK	Proteinase K
PUNLMP	Papilläre urotheliale Proliferation mit gering malignem Potential
Raf	Engl. „rapidly accelerated fibrosarcoma“, Proteinkinase
Ras	Engl. „rat sarcoma“, G- Protein
RLU	Engl. „relative light units“, Relative Lichteinheiten
ROI	Engl. „region of interest“
Rpm	Runden pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Engl. „Sodium dodecyl sulphate“ (Natriumdodecylphosphat)
SERAM	Engl. „secretable expanded repertoire adhesive molecule“
TF	Engl. „tissue factor“
TNM	Einteilung von Tumoren in Tumorgroße, Lymphknoten- (Nodus-) befall und Metastasen
TURB	Transurethrale Resektion der Harnblase
µg	Mikrogramm
UICC	Union International Contre Le Cancer
µl	Mikroliter
VEGF	Engl. „vascular endothelial growth factor“
vgl	Vergleiche

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Ras-Raf Aktivierung des ERK1/2 MAPK-Signalweges unter Einfluss von Eap.10	
Abbildung 2: Vergleich einer osseären Metastasierung mit und ohne Eap-Therapie. ....	12
Abbildung 3: T-Klassifikation und Grading des Harnblasenkarzinoms .....	16
Tabelle 1: Überblick der verwendeten Zelllinien.....	22
Abbildung 4: Schematische Darstellung der <i>in vitro</i> Instillationstherapie.....	27
Abbildung 5: BrdU-Assay im Kurzzeitintervall. ....	33
Abbildung 6: Der BrdU-Assay im Langzeitintervall.....	34
Abbildung 8: Der MTT-Assay im Langzeitintervall. ....	36
Abbildung 9: Verlauf der Querschnittsfläche des Sphäroids der Zelllinie RT-4 .....	39
Abbildung 10: Verlauf der Querschnittsfläche des Sphäroids der Zelllinie RT-112.....	41
Abbildung 11: Verlauf der Querschnittsfläche des Sphäroids der Zelllinie 5637.....	43
Abbildung 12: Verlauf der Querschnittsfläche des Sphäroids der Zelllinie UMUC-3.....	44
Abbildung 13: Bestimmung der ATP-Mengen in Sphäroiden 24 h nach Aussaat. ....	46
Abbildung 14: Flächenzunahme der transferierten RT-4-Sphäroide über die Zeit.....	49
Abbildung 15: Flächenzunahme der transferierten RT-112-Sphäroide über die Zeit.....	51
Abbildung 16: Flächenzunahme der transferierten 5637-Sphäroide über die Zeit.....	53
Abbildung 17: Flächenzunahme der transferierten UMUC-3-Sphäroide über die Zeit.....	55
Abbildung 18: Tumorgewebe <i>in vivo</i> (a) und in einem Sphäroid (b).....	62

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
1. Zusammenfassung.....	1
2. Abstract.....	3
3. Einleitung .....	5
3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
3.2. Das Extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap) .....	6
3.2.1. Historie .....	6
3.2.2. Eap als Immunmodulator.....	6
3.2.3. Eap hemmt die Wundheilung.....	8
3.2.4. Eap als onkologisches Therapeutikum .....	11
3.3. Harnblasenkarzinome .....	13
3.3.1. Epidemiologie und Risikofaktoren .....	13
3.3.2. Molekulargenetische Veränderungen von Harnblasenkarzinomen.....	14
3.3.3. Klinik, Diagnose und Risikobewertung .....	15
3.3.4. Nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinome (NMIBC) .....	17
3.3.4.1. Therapie .....	17
3.3.4.2. Instillationstherapie.....	17
3.3.4.3. Progress zu einem muskelinvasiven Tumor.....	19
3.4. Fragestellung.....	20
4. Material und Methoden.....	21
4.1. Material.....	21
4.1.1. Zelllinien und Wachstumsbedingungen .....	21
4.1.1.1. Inkulturnahme der Zellen .....	22
4.1.1.2. Kryokonservierung.....	23
4.1.2. Extrazelluläres Adhärenz Protein .....	23
4.1.3. Zellkulturmedien.....	24

4.1.4. Lösungen, Puffer, Enzyme .....	24
4.1.5. Reaktionssysteme (Kits) .....	24
4.1.6. Laborgeräte .....	24
4.1.7. Verbrauchsgegenstände .....	25
4.1.8. Software.....	25
4.2. Methoden .....	26
4.2.1. <i>In vitro</i> Instillationsmodell .....	26
4.2.2. Proliferationsassays .....	27
4.2.2.1. BrdU-Assay .....	27
4.2.2.2. MTT-Assay .....	28
4.2.3. Sphäroide .....	29
4.2.3.1. Analyse der Querschnittsfläche .....	29
4.2.3.2. ATPLite 3D-Assay .....	30
4.2.3.3. Wiederaussaat des Sphäroids .....	30
4.2.4. Statistische Auswertungen.....	31
5. Ergebnisse .....	32
5.1. Proliferationsassays.....	32
5.1.1. BrdU-Assay.....	32
5.1.2. MTT-Assay .....	34
5.2. 3D-Zellkulturmodell.....	37
5.2.1. Auswertung der Querschnittsfläche des Sphäroids .....	37
5.2.1.1. RT-4 .....	37
5.2.1.2. RT-112 .....	40
5.2.1.3. 5637 .....	42
5.2.1.4. UMUC-3 .....	43
5.2.2. ATPLite 3D-Assay.....	45
5.2.3. Wiederaussaat der Sphäroide.....	47
5.2.3.1. RT-4 .....	48
5.2.3.2. RT-112 .....	50
5.2.3.3. 5637 .....	52

5.2.3.4. UMUC-3 .....	54
6. Diskussion.....	57
6.1. Die Eap-bedingte Proliferationsinhibition .....	57
6.2. Die Auswirkungen von Eap auf die Größe von NMIBC-Sphäroiden .....	61
6.3. Eap hemmt das Auswachsen von NMIBC-Zellen aus einem Sphäroid .....	67
6.4. Schlussfolgerung .....	71
7. Literaturverzeichnis .....	73
8. Anhang.....	84
9. Danksagung .....	86
10. Lebenslauf.....	87

## 1. Zusammenfassung

Das von *Staphylococcus aureus* sezernierte Extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap) zeichnet sich durch diverse Wirkungen auf die Proliferation, Migration, Adhäsion sowie Zellmorphologie und Differenzierung verschiedener humaner Zelltypen aus. In der jüngsten Forschung unseres Institutes konnte auch ein inhibitorischer Einfluss auf das Zellwachstum neoplastischer Zellen nachgewiesen werden. Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen von einer kurzzeitigen Inkubation mit Eap an Zelllinien nicht-muskelinvasiver Karzinome der Harnblase (NMIBC), welches den zehnthäufigsten Tumortyp weltweit darstellt, untersucht. NMIBC zeichnen sich durch sehr heterogene Erkrankungsverläufe aus, wobei eine der häufigsten Komplikationen das Auftreten eines Rezidivs trotz einer durchgeführten Standardtherapie, welche aus einer transurethralen Resektion des Tumors mit anschließender Spülung der Blase mit einem Therapeutikum besteht, darstellt. Für die durchgeführten Untersuchungen wurde diese Therapie zu einem *in vitro* Instillationsmodell modifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass von den untersuchten vier Zelllinien nur die Zelllinie RT-112 24 Stunden nach einer zweistündigen *in vitro* Instillationstherapie mit Eap eine signifikant geringere Proliferation als die Kontrolle aufwies. Bei der Betrachtung der Stoffwechselaktivität der Zellen fiel nach der Therapie mit Eap bei den Zelllinien RT-112 und 5637 lediglich der statistische Trend auf, dass diese weniger aktiv waren als die unbehandelte Kontrolle. Auch vier Tage nach der einmaligen Behandlung mit 40 µg/ml Eap konnte für diese beiden Zelllinien weiterhin ein statistischer Trend registriert werden, der auf eine verringerte Proliferationsrate im Vergleich zu der Kontrolle hinwies. Zusätzlich wurden als einfaches dreidimensionales Tumor-Modell Sphäroide unter Einfluss von Eap beobachtet. Hier konnte im besonderen Maße eine Beeinflussung der Sphäroidbildung von mit 40 µg/ml vorbehandelten RT-112-Zellen beobachtet werden, die im Vergleich zu den Kontroll-Sphäroiden über den gesamten Versuchszeitraum signifikant kleiner waren. Da aber bei keiner Zelllinie innerhalb des Sphäroidverbandes nach einer Eap-Therapie ein von der Kontrollsituation im relevanten Maße abweichender Adenosintriphosphat-Gehalt beobachtet wurde, kann vermutet werden, dass Eap vermutlich mehr die Zellaggregation der RT-112-Sphäroide und weniger deren Stoffwechselaktivität beeinflusst. Die Sphäroide der drei weiteren hier untersuchten Zelllinien schienen in ihrer Bildung, ihrem Wachstumsverlauf und ihrer Stoffwechselaktivität hingegen weitestgehend unbeeinflusst von Eap zu sein. Um einen potenziellen Effekt von Eap auf die Rezidivbildung von NMIBC zu untersuchen, wurden bereits angewachsene Sphäroide nach einer Inkubation mit aufsteigenden Eap-Konzentrationen auf eine die Blasenwand simulierende Flachbodenwellplatte ausgesät. In Hinblick auf das Grading der Tumore inhibierte Eap in diesem Assay die als G1-eingestufte Zelllinie RT-4 am geringsten und zeigte auf den als G3-Tumor klassifizierten UMUC-3-Sphäroid den stärksten inhibitorischen Einfluss

auf das Auswachsen der Zellen. Die von G2-Tumoren entstammenden Zelllinien RT-112 und 5637 gebildeten Sphäroide waren nach einer zweistündigen Eap-Vorbehandlung ebenfalls signifikant in Ihrer Ausbreitungsfähigkeit reduziert. Die Beobachtung, dass Eap drei der vier verwendeten Zelllinien in ihrem Auswachsen hemmt, deutet auf eine Beeinflussung von Eap auf das Wachstum von NMIBC und deren Rezidivbildung hin. In Anbetracht des schon bekannten hemmenden Einflusses von Eap auf die Neovaskularisierung und der im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Effekte könnte das bakterielle Protein ein vielversprechendes neues Therapeutikum im Rahmen einer Instillationstherapie von NMIBC darstellen.

## 2. Abstract

The extracellular adherence protein (Eap) secreted by *Staphylococcus aureus* is known for its diverse inhibitory effects on proliferation, migration, adherence and differentiation of various eukaryotic cell types. Recent findings of our Institute demonstrated furthermore that Eap also exerts some inhibitory effects on neoplastic cells. Based on these findings, the impact of a short-term Eap incubation on cell lines derived from non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC), which is the tenth most frequent tumor worldwide, was investigated. NMIBC are characterized by very heterogeneous disease histories, whereby one of the most common complications is a recurrence of the tumor despite of the fact that the patient was treated by the standard therapy, which includes a transurethral resection of the tumor followed by a drug-instillation of the bladder. In order to mimic this scenario, an *in vitro* instillation model was developed and tested with Eap and four different NMIBC-derived cell lines. When 2D-cell cultures of the NMIBC cell lines were challenged with Eap for a duration of two hours, significant reductions of the proliferation rates were observed for just one (RT-112) out of the four tested cell lines at 24 hours post treatment compared with the control. Moreover, a statistical trend concerning a reduction of metabolic activity after the *in vitro* instillation with Eap compared to the control was examined for the cell lines RT-112 and 5637. However, at four days post Eap treatment, this statistical trend could still be shown for these two cell lines, which indicated a reduced rate of proliferation compared to the control. To mimic the *in vivo* growth characteristics of tumors more closely, the impact of Eap on spheroid formation and outgrowth was studied next. In this assay format, the two hours *in vitro* instillation therapy with Eap significantly decreased the spheroid formation of the cell line RT112, while the other three NMIBC cell lines tested here were not markedly affected by this bacterial protein. Regarding the adenosin triphosphat-concentrations of spheroids revealed no clear differences between Eap-challenged and control spheroids for all cell lines, suggesting that Eap probably affects the cell aggregation of RT-112-spheroids rather than the metabolic activity of the spheroids of this cell line. To study the impact of Eap on the recurrence of the tumor, the instillation therapy was next applied in combination with an outgrow model, in which preformed spheroids were challenged for two hours with Eap and subsequently placed on a flat-bottom well plate to stimulate outgrowth. When related to the grading of the tumor cell lines, the weakest effect of Eap was observed for the G1-classified cell line RT-4 in this assay, while the strongest inhibitory influence on the outgrow was found for the G3-classified tumor UMUC-3 spheroid. The G2-classified tumor cell lines RT-112 and 5637 also displayed marked decreases in outgrow of cells after Eap treatment. The fact that Eap significantly reduced the area covered by cells for three out of four cell lines, suggesting that Eap is likely to affect the recurrence of tumor tissue. Together with its previously demonstrated inhibitory capacity on

neovascularization, the findings presented here suggest that Eap might represent a potential agent for a transurethral instillation therapy for NMIBCs.

## 3. Einleitung

### 3.1. *Staphylococcus aureus*

Der Mediziner Friedrich Julius Rosenbach entdeckte bereits 1884 im Rahmen seiner Forschungen zu chirurgischen Wundinfektionen einen Organismus, der später in die Familie der *Staphylococcae* (lateinisch) eingeordnet werden sollte. Zu den 38 Arten dieser Familie zählen gram-positive Bakterien, die unter fakultativ anaeroben Bedingungen anwachsen. Dem wohl bekanntesten Vertreter der *Staphylococcae*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), verlieh sein rundliches Erscheinungsbild und die dichte, traubenartige Anordnung der Bakterien, die Rosenbach damals durch ihre gold-glänzende Farbgebung imponierte, seinen Namen (griechisch „*staphylé*“ Weintraube; „*kókkos*“ Kern; lateinisch „*aureus*“ golden).

Als Teil der humanen Normalflora besiedelt *S. aureus* die Schleimhäute von etwa 20 Prozent (%) der Bevölkerung permanent und etwa 30% vorübergehend (Peacock et al. 2001; Wertheim et al. 2005). *S. aureus* befällt besonders häufig Wundflächen und bedingt dort eiterige Haut- und Weichteilentzündungen (Moet et al. 2007). Außerdem kann die perkutane Einbringung von Kathetern *S. aureus* als Eintrittspforte dienen. Nach Kolonisation der Oberfläche des Fremdkörpers, kann eine Bakteriämie zu einer Endokarditis, Osteomyelitis oder weiteren schwerwiegenden Infektionserkrankungen führen (Tong et al. 2015). Weitere komplikationsbehaftete Verläufe einer *S. aureus*-Infektion werden durch dessen sezernierte Toxine ausgelöst. So kann eine zunächst harmlos erscheinende Magen-Darm Infektion toxinbedingt in ein Toxisches Schock-Syndrom übergehen und zu einem drastischen Anstieg der Letalität führen (RKI- Abteilung für Infektionsepidemiologie, Dr. Astrid Milde-Busch).

Die zum Teil schwerwiegenden *S. aureus*-bedingten Infektionen sind durch seine diversen Virulenzfaktoren bedingt, die es dem Bakterium ermöglichen, sich vor der lokalen Immunabwehr zu schützen (Chavakis et al. 2007). Darunter fällt unter anderem eine Gruppe von bakteriell sezernierten Proteinen, die als „secretable expanded repertoire adhesive molecules“ (englisch (engl.), kurz: „SERAM“) zusammengefasst werden. Diese Proteine binden an diverse Strukturen der Extrazellulären Matrix und können dadurch verschiedenste Wirkungen entfalten, die die Immunabwehr gegen *S. aureus* einschränken und die Adhäsion von *S. aureus* an Wirtszellen vermitteln (Patti et al. 1994; Chavakis et al. 2005). Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe, der sich in 97,9% der klinischen *S. aureus* Isolate finden lässt, ist das Extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap), auf welches im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird (Hussain et al. 2001).

## 3.2. Das Extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap)

### 3.2.1. Historie

Yousif und Kollegen entdeckten 1991 ein Protein, das hoch affin zu Basalmembranen im Rattenmodell war und gaben ihm wegen dessen Größe von 70 Kilodalton den Namen „Protein 70“ (P70) (Yousif et al. 1994). Bodén und Flock erkannten 1992 ebenfalls, dass P70 stark an Fibrin zu binden vermag, wonach weiterführend McGavin 1993 in seinen Untersuchungen die generelle Adhäsion von P70 an verschiedene Bestandteile der Extrazellulären Matrix beschrieb (Bodén und Flock 1992; McGavin et al. 1993). Unabhängig von den zuvor beschriebenen Beobachtungen wurde zwei Jahre später von Jönsson und Kollegen ein Protein identifiziert, dessen Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu einer Subdomäne von „major histocompatibility complex“ Klasse-2 (engl., kurz MHC-2) Molekülen hatte, weshalb sie es „major histocompatibility complex class II analog protein“ (engl., kurz Map) nannten (Jönsson et al. 1995). Erst im Jahr 1999 gaben Palma und Kollegen einem von ihnen augenscheinlich erstmalig beschriebenen Protein wegen seiner vielfältig nachweisbaren adhäsiven Eigenschaften an die extrazelluläre Matrix den Namen „Extracellular Adherence Protein“ (Palma et al. 1999). Hussain und Kollegen bestätigten 2001, dass es sich bei P70, Map und Eap um ein und dasselbe Protein handelte, das in *S. aureus* jedoch stammspezifisch in unterschiedlichen Längen vorliegt (Hussain et al. 2001).

Daraufhin folgten viele Untersuchungen an Eap, die unter anderem darauf zielten, die vielfältigen Wirkungen, mit denen Eap zu einer *S. aureus*-Infektion beiträgt, näher zu beleuchten.

### 3.2.2. Eap als Immunmodulator

Eine wesentliche Erkenntnis über Eap konnten Lee und Kollegen anhand der Auswirkung von Eap-defiziten *S. aureus* Stämmen im Mausmodell zeigen. Im Vergleich zu Eap-bildenden Stämmen verursachten diese signifikant seltener Arthritis, Osteomyelitis und Abszesse (Lee et al. 2002). Als ursächliche Komponente wies diese Forschungsgruppe eine signifikant geringere Aktivität von T-Helferzellen vom Typ 1 nach. So konnte in Wunden, in denen Eap exprimiert wurde, ein reduziertes Rekrutment von antigenpräsentierenden Makrophagen und einer daraus resultierenden herabgesetzten Phagozytose von extrazellulären Erregern bei Eap-bildenden Stämmen beobachtet werden. Dies bewies, dass Eap die Aktivität der lokal agierenden Immunzellen verändert und eine weitere Aktivierung des Immunsystems bereits lokal inhibiert (Lee et al. 2002). Hieran konnte erstmals die Wechselwirkungen von Eap mit dem Immunsystem beschrieben werden, welche den Grundstein für weitere Forschungen an

Eap als Immunmodulator legte. Im gleichen Jahr wurde gezeigt, dass Eap die Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel herabsetzte. Damit kann *S. aureus* über die Sekretion von Eap die Leukozytendiapedese in infiziertes Gewebe vermindern und den Eingriff des zellulären Immunsystems am Infektionsort modulieren (Chavakis et al. 2002). Im Rahmen dieser Studie konnte eine Bindungsstelle von Eap für Lymphozyten identifiziert werden. Eap blockiert das Interzelluläre Zelladhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und inhibiert damit direkt die Immunzellen des Wirts (Chavakis et al. 2002). Darauf aufbauend konnten von Hagggar und Kollegen (Hagggar et al. 2005) weitere direkte Wirkungen von Eap auf die Proliferation von T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Dafür wurden mit einem Superantigen stimulierte T-Lymphozyten mit unterschiedlichen Eap-Konzentrationen inkubiert. Bei Konzentrationen von 9 Mikrogramm/Milliliter ( $\mu\text{g/ml}$ ) wirkte Eap proliferationshemmend auf T-Lymphozyten, was bei steigender Eap-Konzentration umso deutlicher wurde. Nach der Hinzugabe eines Eap-Antikörpers begannen die T-Lymphozyten wiederum zu proliferieren, sodass die zuvor beschriebene Wachstumshemmung definitiv auf Eap zurückzuführen war. Eap-Konzentrationen  $\leq 9 \mu\text{g/ml}$  hingegen zeigten einen gegenläufigen Effekt. Denn auf diese Weise behandelte T-Lymphozyten proliferierten sogar stärker als die Kontrolle (Hagggar et al. 2005). Demnach zeigten Hagggar und Kollegen die Wichtigkeit von Eap für *S. aureus* als potenten Virulenzfaktor gegen das spezifische Immunsystem. Ferner wird auch die Bindung von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen Eap-induziert vermindert, sodass auch die Infiltration von unspezifischen Immunzellen zur Erregerabwehr in infiziertes Gewebe erschwert wird (Hagggar et al. 2004).

Ein weiterer Mechanismus, durch den die Ausbreitung von *S. aureus* im Wirt gefördert wird, besteht in der Inhibition des klassischen Aktivierungsweges des Komplementsystems. Eap bindet den Komplementfaktor C4b und verhindert damit die Bildung des lytischen Komplexes, der zur Lyse des Pathogens führen soll (Woehl et al. 2017). Eine erst kürzlich erschienene Studie (Eisenbeis et al. 2018) über die Wirkungen auf die „neutrophil extracellular trap formation“ (engl., kurz NET) gab eine weitere Erklärung für die aggravierten Krankheitsverläufe bei Eap-bildenden *S. aureus* Stämmen, die eingangs von Lee und Kollegen (Lee et al. 2002) beschrieben wurden. Die NET wird von neutrophilen Granulozyten ausgebildet, um Bakterien und Pilze in einem Chromatin- und Granulaprotein-haltigen Netz zu fangen und anschließend abzutöten. Dabei geht auch der neutrophile Granulozyt zu Grunde (Pape et al. 2014). In der Studie von Eisenbeis und Kollegen (Eisenbeis et al. 2018) wurden zunächst die Bindung von Eap an Desoxyribonukleinsäuren (DNA), die bekanntermaßen Grundbestandteil des Chromatins darstellt, und die anschließende Bildung von DNA-Eap-Aggregaten unter einem „Atomic Force Microscope“ (engl.) untersucht. Darauf aufbauend wurden Versuche zu dem Einfluss von Eap auf die Bildung von Chromatin-haltigen NETs durchgeführt. Trotz Stimulation

von neutrophilen Granulozyten wurde die Bildung von NET durch Eap dosisabhängig verhindert. Stattdessen aggregierte die DNA der neutrophilen Granulozyten im Kern und an der Zelloberfläche. Außerdem nahmen bereits bestehende NET durch Inkubation mit Eap an Größe ab (Eisenbeis et al. 2018). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Eap das Abfangen und Abtöten von *S. aureus* durch NETs verhindert und somit die systemische Ausbreitung von *S. aureus* erleichtert. Zudem wurden DNA-bindende und aggregierende Eigenschaften von Eap bewiesen. Die Inhibition der NET-Bildung und des Komplementsystems sind beispielhaft für den Einfluss, den Eap auf das unspezifische zelluläre sowie humorale Immunsystem ausübt. Die bislang beschriebenen Erkenntnisse deuten auf weitgreifende Wirkungen von Eap auf die Immunabwehr im Rahmen einer *S. aureus*-Infektion hin und veranschaulichen die Relevanz des Proteins für eine bakterielle Infektion.

### 3.2.3. Eap hemmt die Wundheilung

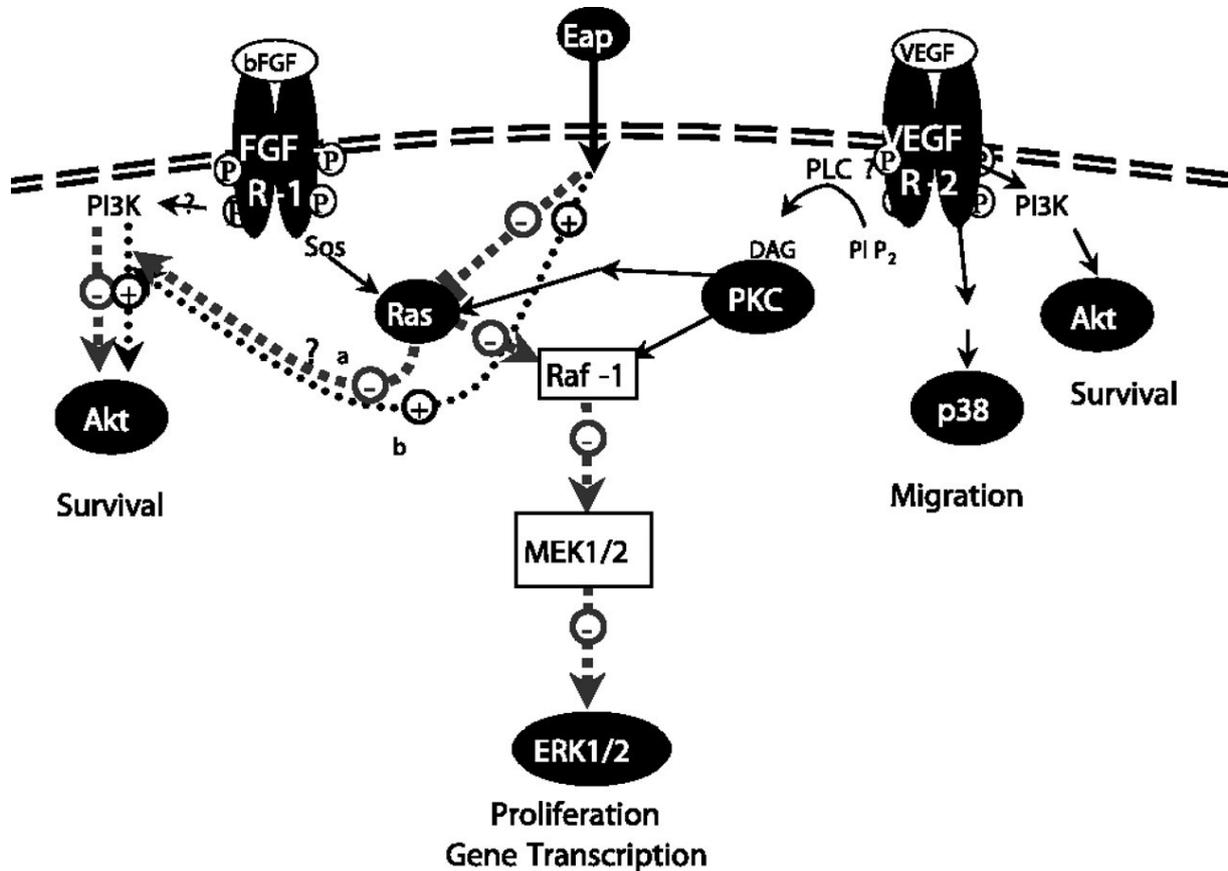
Ein weiterer Aspekt, der zeigt, dass Eap als potenter Virulenzfaktor bei *S. aureus*-Infektionen fungiert, wird durch die verlangsamte Wundheilung von *S. aureus*-infizierten Haut- und Weichteilen deutlich. Ein Zusammenhang zwischen Eap und der verlangsamten Wundheilung *S. aureus*-infizierter Wunden wurde erstmals von Athanasopoulos und Kollegen (Athanasopoulos et al. 2006) im Jahr 2006 aufgezeigt. Neben der Interaktion von Eap mit dem Immunsystem, woraus eine verlangsamte Erregerabwehr resultierte, wurde ebenfalls eine direkte Wirkung von Eap auf die Reparatursysteme der Haut nachgewiesen. Ein wichtiger Angriffspunkt stellte dabei die Neovaskularisierung im Wundgewebe dar. Eap-produzierende *S. aureus* Kolonien zeigten im Mausmodell signifikant weniger Gefäßneubildungen als die Eap-freien Kolonien. Folglich wurde ermittelt, dass unter Anwesenheit von Eap etwa 45% weniger Blut durch das infizierte Wundgewebe floss. Dies hatte fatale Auswirkungen auf die Wundheilung, denn unter Einfluss von Eap war der Wundschluss signifikant langsamer als in der Eap-freien Kontrollsituation. Dieser Effekt wurde dosisabhängig verstärkt (Athanasopoulos et al. 2006). Kausal wird angenommen, dass neben der bereits direkt inhibierten Leukozytendiapedese auch durch die schlechtere Perfusion des Gewebes unter Eap vermindert Immunzellen in das Gewebe gelangen können. Andererseits erhalten lokale Keratinozyten und Immunzellen weniger Nährstoffe und Wachstumsfaktoren, ihre Abbauprodukte werden weniger abtransportiert und das Milieu im betroffenen Gewebe verschlechtert sich (Athanasopoulos et al. 2006; Sobke et al. 2006). Letztendlich resultieren alle genannten Faktoren in einer verringerten Migration von Immunzellen in das Gewebe, einer mangelhaften lokalen Immunabwehr und dadurch einer unkontrollierten Ausbreitung von *S. aureus* im Gewebe (Joost et al. 2009). Begründet werden könnten die fulminanteren Verläufe bei steigender Eap-Konzentration durch die konzentrationsabhängige Adhäsion von *S. aureus*

an die Wirtszelle, der die Internalisierung des Bakteriums angeschlossen ist (Bur et al. 2013). Durch den Einschluss des Bakteriums in körpereigene Zellen kann die lokale Immunabwehr den Erreger nicht mehr erreichen. Dies führt, neben einer steigenden Anzahl infizierter Keratinozyten, zu einer erhöhten Erregerlast pro Zelle (Bur et al. 2013). Neben den direkten inhibitorischen Effekten auf das Immunsystem stellt die gesteigerte Internalisierung der Erreger in die Wirtszellen einen weiteren Mechanismus von Eap dar, diese vor einer Elimination durch das Immunsystem zu schützen (Bur et al. 2013).

Darüber hinaus werden Keratinozyten *in vitro* hinsichtlich ihrer Morphologie, Proliferation und Migration von Eap beeinflusst (Eisenbeis et al. 2017). Morphologisch ändert sich unter Einfluss von Eap die Zellhöhe der Keratinozyten, wobei gleichzeitig die Gesamtfläche zunimmt (Eisenbeis et al. 2017). Die Keratinozyten sind dadurch flacher und zeigen eine geringere Steifigkeit bei einer signifikant verstärkten Adhäsion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Eisenbeis et al. 2017). Funktionell unterscheiden sich die mit Eap inkubierten Keratinozyten durch eine dosisabhängig verminderte Proliferationsleistung sowie einer reduzierten Migrationsfähigkeit (Eisenbeis et al. 2017). Diese Erkenntnisse könnten ebenfalls die verlangsamte Wundheilung von *S. aureus*-besiedelten Wunden erklären.

Untersuchungen von Sobke und Kollegen (Sobke et al. 2006) weisen darauf hin, dass Eap auf molekularer Ebene unter anderem die „mitogen-activated protein kinase“-Kaskade (engl., kurz MAPK) beeinflusst. Die MAPK-Signalkaskade bestimmt durch unterschiedliche zellwandgebundene Rezeptoren, an die zum Beispiel Wachstumsfaktoren binden, die Expression von Transkriptionsfaktoren und damit die Regulation des Zellstoffwechsels (Dhillon et al. 2007). Beispiele für Wachstumsfaktoren, die die MAPK-Signalkaskade aktivieren, sind der „vascular endothelial growth factor“ (engl., kurz VEGF) oder der „tissue factor“ (engl., kurz TF) (Dhillon et al. 2007). Die Faktoren vermitteln eine Aktivierung des G-Proteins „rat sarcoma“ (engl., kurz Ras), der Proteinkinase „rapidly accelerated fibrosarcoma“ (engl., kurz Raf) und der „extracellular signal-regulated kinase“ (engl., kurz ERK1/2), was insgesamt eine Aktivierung der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade darstellt, die in zu einer Proliferationssteigerung und Zellwachstum führt (Sobke et al. 2006). Aufmerksam auf diesen Angriffspunkt von Eap wurden Sobke und Kollegen (Sobke et al. 2006), als sie im Zellkulturmodell mit humanen Endothelzellen zunächst feststellten, dass mRNA von endothelialen Aktivierungsfaktoren wie TF nach Eap-Inkubation, verglichen mit dem Basalwert, nur noch vermindert exprimiert wurden. Außerdem wurde der Transkriptionsfaktor „early growth response protein-1“ (engl., kurz Egr-1), der durch die MAPK-Signalkaskade aktiviert wird, trotz Stimulation mittels VEGF von den Endothelzellen unter Einfluss von Eap vermindert gebildet. Nachdem verschiedene Proteine der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade auf einen Aktivitätsverlust durch Vorinkubation mit Eap getestet wurden, fiel auf, dass die wachstumsfaktorstimulierte Phosphorylierung von ERK1/2 durch Eap dosisabhängig inhibiert wurde. Diskutiert wurde in jener Arbeit, dass Eap

das G-Protein Ras in seiner Funktion verändert und dadurch Auswirkungen auf die nachfolgenden Proteine der MAPK-Signalkaskade nimmt (Abbildung (Abb.) 1) (Sobke et al. 2006).



**Abbildung 1: Ras-Raf Aktivierung des ERK1/2 MAPK-Signalweges unter Einfluss von Eap.** Nach Aktivierung der Wachstumsfaktorrezeptoren „epidermal growth factor receptor“ (engl., kurz: EGFR) und „fibroblast growth factor receptor“ (engl., kurz FGFR) wird im Verlauf Ras aktiviert, um über eine Signalkaskade zur Aktivierung von intranukleären Transkriptionsfaktoren die Proliferation der Zelle zu bewirken. Eap interagiert nach der Vermutung von Sobke und Kollegen mit Ras und inhiert darüber die Transduktionskette. Nachgewiesen ist zudem, dass ERK1/2 unter Einfluss von Eap seltener phosphoryliert wird (Sobke et al. 2006; Thompson et al. 2010).

Bislang ist der exakte molekulare Mechanismus, über den Eap mit den Faktoren der MAPK-Kaskade interagiert, unbekannt, jedoch könnte dieser die molekulare Basis der proliferationshemmenden Eigenschaften von Eap auf Endothelzellen, Keratinozyten und T-Lymphozyten darstellen. Die Ras/Raf-Kaskade erlangte in der Onkologie große Aufmerksamkeit, als festgestellt wurde, dass etwa 30% aller Tumoren eine Mutation innerhalb dieser Kaskade aufwiesen und in etwa 15-30% der Fälle eine Fehlfunktion von Ras beobachtet wurde (Garnett und Marais 2004).

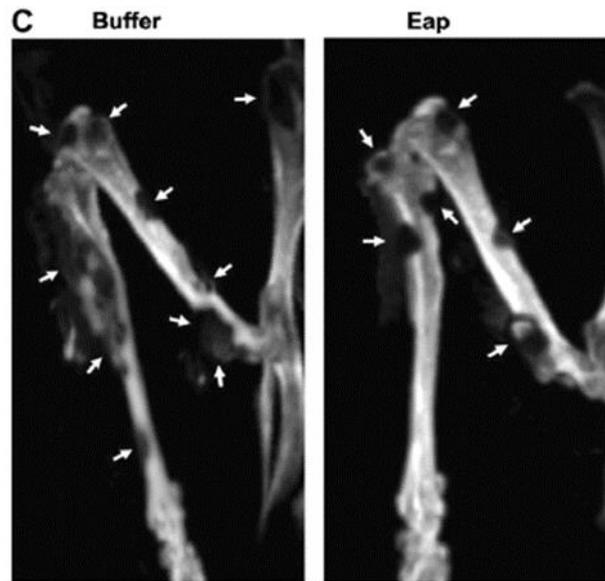
In einer weiteren Untersuchung von Athanasopoulos und Kollegen (Athanasopoulos et al. 2006) an einem dreidimensionalen (3D)- *in vitro* -Modell, in dem Endothelzellen sich unter

Standardbedingungen zu einer kapillarähnlichen Struktur formierten, wurden die Auswirkungen von Eap auf die Neovaskularisierung betrachtet. Mit Eap-vorbehandelte Zellen unterschieden sich von den unbehandelten Zellen, da sie sich nicht mehr zu einem Kapillargefäß formierten. Ursächlich dafür könnte die reduzierte Genexpression und Proliferation, ausgelöst durch die Inhibition der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade sein (Athanasopoulos et al. 2006). *In vivo* würde diese Beobachtung mit einer verminderten Neovaskularisierung gleichzusetzen sein, die folglich die Reparatur von geschädigtem Gewebe verzögern würde. Dies stellt einen weiteren wichtigen Angriffspunkt der verlangsamten Wundheilung durch Eap dar.

Eap als Antagonist der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade wäre damit ein vielversprechender Ansatzpunkt in der Onkologie, der über diesen oder weitere bislang unbekannte Mechanismen zu einer reduzierten Proliferation, Migration, Neovaskularisierung und morphologischen Veränderungen zu einer Reduktion der Tumormasse beitragen könnte.

### 3.2.4. Eap als onkologisches Therapeutikum

Dieser Idee folgend wurde von Schneider und Kollegen (Schneider et al. 2007) im Jahr 2007 erstmalig die Auswirkung von Eap auf die Metastasenbildung in einem murinen Brusttumormodell untersucht. Die Basis dieser Untersuchungen bildeten die bindenden Eigenschaften von Eap an Proteine der extrazellulären Matrix. Zu jenen gehört auch Osteopontin, welches eine entscheidende Rolle bei der Absiedelung von Brustkrebsmetastasen in den Knochen einnimmt. Metastasen von Brusttumoren adhäreren durch die Interaktion von  $\alpha 5\beta 3$ -Integrin, welches von osseären Tumoren sezerniert wird, und Osteopontin an den Knochen (Schneider et al. 2007). Von dort erfolgt die Invasion der neoplastischen Zellen in das Knochengewebe. In einem Zellkulturmodell mit Brustkrebszellen inhibierte Eap signifikant die Adhäsion der Zellen an Osteopontin. Zudem wurde die Migration der Brustkrebszellen zu Osteopontin unter Einfluss von Eap geringer. Auch die von Schneider und Kollegen (Schneider et al. 2007) durchgeführten *in vivo* Versuche ließen durch computertomographisches Monitoring einen inhibitorischen Effekt von Eap auf die Metastasenbildung eines Brusttumors im Mausmodell erkennen (siehe Abb. 2).



**Abbildung 2: Vergleich einer osseären Metastasierung mit und ohne Eap-Therapie.** Dargestellt ist die metastatische Absiedelung von murinen Brustkarzinomzellen nach mehrfach wiederholter Eap- und Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)-Therapie. Hier wurde 35 Tage nach arterieller Injektion der Brusttumorzellen eine computertomographische Darstellung der unteren Extremität angefertigt. Links: Extremität einer mit PBS-behandelten Maus als Kontrolle. Rechts: Extremität einer mit an Tag 0,1,3,5,7,10 via intraperitonealer Injektion von Eap-behandelten Maus. Die Eap-therapierte Maus zeigte signifikant weniger Metastasen, die zudem kleiner als die Kontrolle waren (Schneider et al. 2007).

Nach intraperitonealer Injektion von Eap konnte eine signifikante Abnahme der Metastasengröße- und Anzahl in Röhrenknochen der unteren Extremität und der Wirbelsäule der Mäuse verzeichnet werden, was vermutlich auf die Eap-Bindung an Osteopontin und damit die verminderte Interaktion von  $\alpha 5\beta 3$ -Integrin und Osteopontin zurückzuführen ist (Schneider et al. 2007). Auch Eisenbeis (Eisenbeis 2019) veröffentlichte im Rahmen ihrer Dissertation vielversprechende Ergebnisse zu Eap als Inhibitor der Proliferation und Migration von nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomzelllinien. Dabei wurde ein von Eap ausgehender, signifikant proliferationshemmender Effekt auf die nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinomzelllinien RT-112 und 5637 bei einer dauerhaften Inkubation mit 40  $\mu\text{g/ml}$  Eap im Vergleich zu den unbehandelten Zellsuspensionen beobachtet. Außerdem zeigten sich diese Zelllinien in ihrer Migration nach Eap-Therapie gehemmt. Die Morphologie der Zelllinie RT-112 veränderte sich in ähnlicher Weise, wie auch von Eisenbeis bei Keratinozyten beschrieben (Eisenbeis et al. 2017). Darüber hinaus lag bei der Urothelkarzinomzelllinie RT-112 eine verringerte ERK1/2-Phosphorylierung unter Einfluss von Eap vor, woran wiederholt die Interaktion von Eap mit der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade erkennbar ist. Bei der Zelllinie 5637 konnte ebenfalls eine tendenziell reduzierte Phosphorylierung ERK1/2 beobachtet werden (Eisenbeis 2019). Weitere anwendungsorientierte Studien zu Eap als onkologisches Therapeutikum wurden seither nicht veröffentlicht.

### 3.3. Harnblasenkarzinome

#### 3.3.1. Epidemiologie und Risikofaktoren

Weltweit wird jährlich bei etwa 549.000 Patienten eine bösartige Neubildung der Harnblase diagnostiziert, womit das Harnblasenkarzinom den zehnhäufigsten Tumor darstellt (Bray et al. 2018). In über 70% der Fälle erstmanifestiert sich das Harnblasenkarzinom in einem nicht-muskelinvasiven Stadium (Brausi et al. 2011). Dennoch bemisst die globale Mortalität circa 200.000 Todesfälle jährlich, wobei viermal mehr Männer als Frauen betroffen sind (Bray et al. 2018). Auch in Deutschland ist das Harnblasenkarzinom unter allen Tumorarten eine häufige Diagnose. Mit einer absoluten Neuerkrankungsrate im Jahre 2016 von 12.220 verzeichneten Fällen stellt das invasive Harnblasenkarzinom die vierthäufigste Tumorerkrankung des Mannes dar (Robert-Koch-Institut 2019). Durch die aufwändige Diagnostik und die engmaschige Nachsorge verursacht die Behandlung eines Harnblasenkarzinoms hohe Kosten für das Gesundheitssystem, die vor allem im Verlauf der Erkrankung hervorgerufen werden (Svatek et al. 2014). Im Jahr 2015 lagen die Ausgaben in Deutschland für die ICD-10 Codierungen C67, welche nahezu alle bösartigen Neubildungen der Harnblase umfasst, bei 760 Milliarden Euro, was circa 2% der Gesamtausgaben für bösartige Neubildungen ausmachte (Statistisches Bundesamt DESTATIS).

Die Ätiologie des Harnblasenkarzinoms ist bis heute nicht gänzlich verstanden. Einer der Hauptrisikofaktoren an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken, ist für Männer wie für Frauen der langanhaltende Tabakkonsum (Brennan et al. 2000; Brennan et al. 2001). Infektionen spielen in der Pathogenese des Harnblasenkarzinoms ebenfalls eine gesicherte Rolle (Vermeulen et al. 2015). Auch das Auftreten von Blasensteinen ist vor allem bei Frauen mit einem signifikanten Anstieg des Risikos der Entwicklung eines Blasentumors assoziiert (Chow et al. 1997). Darüber hinaus besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen der Exposition mit aromatischen Aminen wie  $\beta$ -Naphthylamin, welches in der Farbindustrie und bei der Herstellung von Gummi anfällt, und der Entwicklungen von urothelialen Neoplasien, weshalb das Harnblasenkarzinom auch in gesonderten Fällen als Berufskrankheit anerkannt wird (The MAK-Collection for Occupational Health and Safety 2002). Auch iatrogene Faktoren, wie die therapeutische Bestrahlung des kleinen Beckens im Rahmen eines Zervixkarzinoms, stellen einen Risikofaktor dar (Chaturvedi et al. 2007). Daneben bedingen auch Medikamente, zum Beispiel Cyclophosphamid, eine dosisabhängige Steigerung des relativen Risikos zur Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms (Travis et al. 1995). Demzufolge ist ein Teil der Bevölkerung noch heute Risikofaktoren, die zu einer Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms beitragen können, ausgesetzt, wodurch in Zukunft kein wesentlicher Rückgang der Inzidenz dieser Tumorentität zu erwarten ist.

### 3.3.2. Molekulargenetische Veränderungen von Harnblasenkarzinomen

Die Untersuchung molekulargenetischer Veränderungen steht seit einigen Jahren im Fokus der urologischen Forschung. Da die Diversität der Krankheitsverläufe eines Harnblasenkarzinoms enorm ist und es bislang noch nicht ausreichend gelingt anhand der bislang bekannten Parameter eine sichere, individuelle Prognose des Patienten vorherzusagen, wird weiterhin ein Schwerpunkt auf die Charakterisierung molekulargenetischer Profile zur Unterscheidung nicht-muskelinvasiver und muskelinvasiver Formen gelegt. Die aktuelle Datenlage bietet dabei eine Vielzahl von Untersuchungen an diversen Signalkaskaden, wobei dieser Abschnitt einen kurzen Einblick über die Besonderheiten der MAPK-Signalwege in Harnblasenkarzinomen geben soll.

Bei oberflächlich wachsenden Harnblasenkarzinomen liegt in etwa 80% der Fälle eine Überexpression des „fibroblast growth factor receptor-3“ (engl., kurz FGFR-3) vor, was auf Punktmutationen im entsprechenden Gen zurückgeführt werden konnte (Knowles 2015). Die vermehrte Expression von FGFR-3 findet sich vor allem in nicht-muskelinvasiven Karzinomen der Harnblase (NMIBC) und spricht für einen Tumor mit einer geringen Progressionsrate (Di Martino et al. 2012). Bei muskelinvasiven Karzinomen der Harnblase (MIBC) ist hingegen nur selten eine vermehrte Expression von FGFR-3 zu beobachten, sodass das Fehlen von einer Überexpression dieses Proteins mit einer hohen Rezidiv- und Progressionsrate assoziiert ist (Di Martino et al. 2012). FGFR-3 agiert unter anderem über die ERK1/2 MAPK-Signalkaskade und steigert darüber das Zellwachstum (Vergleiche (vgl.) Abb. 1) (Klint 1999). Deshalb wurde vermutet, dass die bei Harnblasenkarzinomen verstärkt phosphoryliert vorliegende ERK1/2 ein Resultat dessen ist. Jedoch konnte bei einer Überexpression von FGFR-3 keine stark vermehrte Aktivierung der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade beobachtet werden, sodass nicht allein diese Kaskade für das erhöhte Zellwachstum verantwortlich sein kann (Juanpere et al. 2012). In 13% der Blasenkarzinome konnte außerdem eine Mutation von Ras-Proteinen festgestellt werden (Juanpere et al. 2012). Damit ist diese jedoch weitaus seltener als eine FGFR-3 Mutation und kann sowohl bei NMIBC als auch bei MIBC vorliegen (Knowles 2015). Darüber hinaus ist in etwa 40% der Harnblasenkarzinome das Tumorsuppressorgen NOTCH inaktiviert, welches auch isoliert nachweislich zu einer gesteigerten ERK1/2 Phosphorylierung und, daraus abgeleitet, zu einer verstärkten ERK1/2 MAPK-Signalkaskaden-Aktivierung führt (Rampias et al. 2014). Die Erkenntnisse über molekulargenetische Veränderungen des Harnblasenkarzinoms zu normalem Urothel sollen vor allem in der Früherkennung, Nachsorge und Progressionseinschätzung genutzt werden, um eine optimale Auswahl des Therapiekonzeptes zu treffen.

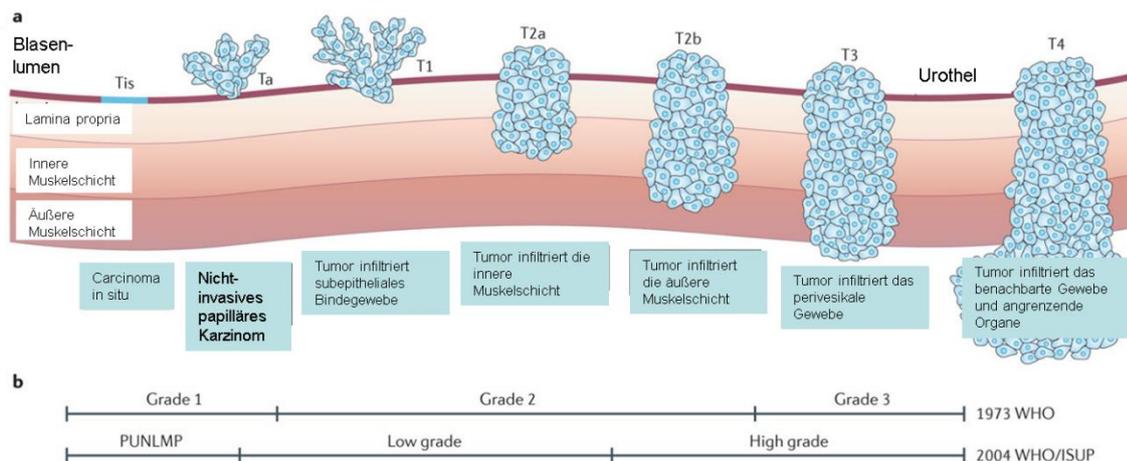
### 3.3.3. Klinik, Diagnose und Risikobewertung

Neben den asymptomatischen Verläufen gilt eine schmerzlose Makrohämaturie, welche eine mit bloßem Auge sichtbare Blutbeimengung im Urin beschreibt, als Leitsymptom des Harnblasenkarzinoms und ist bis zum Beweis einer anderen Ursache dringlichst als solches diagnostisch abzuklären (Shephard et al. 2012). Eine Mikrohämaturie, also ein mikroskopischer Nachweis von Erythrozyten im Urin, wird, neben den häufigeren Ursachen einer bakterielle Zystitis oder einer benignen Prostatahyperplasie, in 12% der Fälle durch ein Harnblasenkarzinom verursacht (Golin und Howard 1980). Zusätzlich können Symptome wie eine Dysurie, Pollakisurie oder eine intermittierende Drangsymptomatik vorliegen (Turner et al. 1977; Keller et al. 2013). Liegt der Verdacht auf eine Neoplasie der Harnblase vor, sollte umgehend eine weiterführende Diagnostik erfolgen.

Zunächst gibt die aktuelle S3-Leitlinie (AWMF 2020) vor, eine Urinzytologie zu gewinnen, die nach dem Pariser System histologisch klassifiziert wird. Bei diesem Verfahren können vor allem Tumore identifiziert werden, die kaum noch Merkmale des Urothels aufweisen, was sich in vielen Kernatypien und einem beschleunigten Zellzyklus äußert (AWMF 2020). Diese als „High-grade-Tumore“ bezeichneten Entitäten werden hoch sensitiv in der Urinzytologie erkannt (Vom Dorp et al. 2011). Bei differenzierten Tumoren, die auch als „Low-grade-Tumor“ bezeichnet werden, da sie nur eine geringe Dysplasie des Urothels aufweisen, ist aufgrund von vielen falsch positiven Ergebnissen durch reaktive Veränderungen, wie einer banalen Harnwegsinfektion, die Zytologie nicht verlässlich genug (Vom Dorp et al. 2011). Erhärtet sich der Verdacht auf eine Neoplasie sollte eine Zystoskopie durchgeführt werden (AWMF 2020). Der Eingriff besteht aus dem Vorschub des Endoskops durch die Urethra in die Harnblase und beinhaltet eine umfassende Inspektion des Urothels. Stellt sich ein suspektes Areal innerhalb des Urothels während der Zystoskopie dar, sollte eine Probiopsie, die auch als transurethrale Resektion der Harnblase (TURB) bezeichnet wird, entnommen oder der Tumor nach Möglichkeit vollständig entfernt werden (AWMF 2020).

Anhand der Histologie des Biopsats werden die Tumore zunächst nach ihrer zellulären Morphologie eingeteilt. Etwa 93% der Neoplasien der Harnblase sind Urothelkarzinome und gehen von der Schleimhaut der Blase aus (Billis et al. 2001). Die Größenausdehnung des Karzinoms der Harnblase wird anhand der TNM- (Tumor, Nodus, Metastasen)-Klassifikation beschrieben, welche die Grundlage für die Therapiewahl und die Prognose des Patienten bildet (Humphrey et al. 2016). „T“ beschreibt die Tumorgröße und Invasionstiefe (siehe Abb. 3a). Während ein Ta-Tumor exophytisch in das Blasenlumen wächst, dehnt sich ein T1-Tumor in die Blasenwand aus, bleibt jedoch auf das Urothel und das darunter liegende Bindegewebe begrenzt. Diese beiden Wachstumsmuster werden als nicht-muskelinvasiv bezeichnet. Greifen Urothelkarzinome auf die Muskelschicht der Harnblase über, werden sie als

muskelinvasiv bezeichnet und entsprechen dem Stadium T2. Ab Stadium T3 wird umliegendes Gewebe der Harnblase von den Tumorzellen befallen, bei Stadium T4 sind außerdem Nachbarorgane betroffen. Von dort aus können auch die umliegenden Lymphknoten durch den Tumor infiltriert werden, was durch Angabe des „N“ beschrieben wird. Die Anzahl und der Lokus von Metastasen wird mit „M“ angegeben (Humphrey et al. 2016). Für die Beschreibung des Malignitätsgrades wird das histologische Schema der Weltgesundheitsorganisation von 1973 herangezogen, das Harnblasenkarzinome in Grad eins, zwei und drei (G1, G2, G3) einteilt (siehe Abb. 3b).



**Abbildung 3: T-Klassifikation und Grading des Harnblasenkarzinoms** (modifiziert nach Knowles 2015)

G1-Tumore haben eine ähnliche Differenzierung wie das Ursprungsgewebe, von dem der Tumor ausgeht und sind damit gering maligne. G3 bedeutet, dass nur noch wenig Differenzierung des Ausgangsgewebes zu finden ist, wodurch eine schnellere Zellteilungsrate und damit eine höhere Invasionsneigung von dem Tumor ausgeht. Intermediäre G2-Tumoren sind mäßig differenziert (Mostofi et al. 1973). Weiterführend wird der Tumor anhand von nukleären Merkmalen in High- und Low-grade unterteilt, um das Entartungs- und Invasionsrisiko einzuschätzen. Bei einem High-grade-Tumor ist prinzipiell von einem invasiven Wachstum auszugehen (Epstein et al. 1998). Nach der Union International Contre Le Cancer-Klassifikation (UICC) wird darauf aufbauend eine Stadieneinteilung durchgeführt (Wittekind 2017). Zur Abschätzung der Prognose des Patienten können die Risikotabellen der European Organisation for Research and Treatment on Cancer (EORTC) verwendet werden. Diese berücksichtigt die Anzahl der Tumoren sowie deren Größe, die Anzahl an Rezidiven, T nach TNM, das Grading und, ob ein Carcinoma in situ nach klinischen und pathologischen Gesichtspunkten vorliegt. Anhand dessen kann die Rezidiv- und Progressionswahrscheinlichkeit angegeben werden (Sylvester et al. 2006). Da diese Tabelle das Risiko für Patienten oftmals als zu hoch eingestuft hat, wurde von der International Bladder Cancer Group eine neuere Einstufung veröffentlicht (Brausi et al. 2011). Diese unterteilt das Rezidiv-

und Progressionsrisiko der Tumore in niedrig, intermediär und hoch. NMIBC mit niedrigem Risiko liegen als solitärer Ta-Tumor vor. Ein intermediäres Risiko weisen Ta-Tumore auf, die multiple vorliegen oder bereits als Rezidiv erscheinen. Als hoch risikoreich werden alle weiteren Tumore bezeichnet, die >T1-klassifiziert, als G3 eingestuft oder als Carcinoma in situ (CIS) charakterisiert werden (Brausi et al. 2011). Nach der Klassifikation und dem Grading wird dann ein Therapieplan aufgestellt und die Häufigkeit der Nachsorgeuntersuchungen festgelegt.

### 3.3.4. Nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinome (NMIBC)

Bei etwa 75% der Erstdiagnosen eines Harnblasenkarzinoms befindet sich der Tumor in einem nicht-muskelinvasiven Stadium (Burger et al. 2013). Nicht-muskelinvasive Tumore werden anhand ihrer Morphologie in papillär oder flach eingeteilt. Papilläre Neoplasien wachsen meist exophytisch, können aber auch die Lamina propria infiltrieren. Dazu zählen benigne Papillome, papilläre urotheliale Proliferationen mit gering malignem Potential (PUNLMP, siehe Abb.3) und High- und Low-grade-Formen eines Ta- oder T1-Tumors. Flache Tumore wachsen innerhalb des Urothels und können als Dysplasie, urotheliale Proliferation mit unklarer Malignität oder CIS erscheinen, wobei ein CIS immer als High-grade-Tumor klassifiziert wird (Humphrey et al. 2016). Da bislang keine routinemäßigen molekulargenetischen Untersuchungen des NMIBC durchgeführt werden, erfolgt die Therapieplanung anhand der TNM-Klassifikation und des Tumorgradings. Im Folgenden sollen die Therapiemöglichkeiten des NMIBC näher beschrieben werden (AWMF 2020).

#### 3.3.4.1. Therapie

Die transurethrale Resektion stellt meist den ersten Schritt der Therapie bei NMIBCs dar. Sie wird einer diagnostischen Zystoskopie angeschlossen (Cao et al. 2015). Weil nach alleiniger TURB in circa 56% ein Rezidiv auftritt (Sylvester et al. 2016), sollte evidenzbasiert innerhalb von 24 Stunden (h) nach jeder Resektion eine Instillationstherapie durchgeführt werden, die das Rezidivrisiko im Schnitt um 13% reduzieren kann (Abern et al. 2013).

#### 3.3.4.2. Instillationstherapie

Bei der Instillationstherapie der Harnblase wird durch ein Endoskop, das durch die Harnröhre in die Harnblase vorgeschoben wurde, ein Therapeutikum in die Blase gegeben. Das Ziel der Instillation ist es, etwaige nach der Resektion frei flotierenden Tumorzellen an der

Reimplantation in das Urothel zu hemmen (Pan et al. 1989). Außerdem greift das Therapeutikum Residualtumorzellen in der Blasenwand an und hemmt diese in ihrem Wachstum (Sylvester et al. 2004). Die Einbringung des Therapeutikums sollte so früh wie möglich nach Resektion erfolgen, da Tumorzellen signifikant früher an beschädigtes Urothel als an intaktes Urothel readhärieren können (Soloway und Masters 1980). Über die Einwirkzeit des Therapeutikums in der Blase wird noch immer diskutiert. Eine Studie zeigte, dass 60 Minuten (min) einer Dauer von 30 min überlegen sind, wobei die von der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) herausgegebene S3-Leitlinie aktuell Einwirkzeiten von 30 min bis zwei Stunden empfiehlt (Bruijn et al. 1992; Deutsche Krebsgesellschaft 2016). Zwei Wirkstoffklassen sind zurzeit für die Instillation zugelassen. Einerseits die Chemotherapeutika Mitomycin C, Thiotepa, Epirubicin, Pirarubicin oder Doxorubicin und andererseits der ehemalige, auf dem *Mycobacterium bovis* beruhende, Tuberkulose Impfstoff Bacille Calmette-Guérin (BCG) (Deutsche Krebsgesellschaft 2016). Bei Tumoren mit einem niedrigem Risiko erzielt eine einmalige Instillationstherapie nach TURB eine Reduktion der Rezidivrate um 14% innerhalb von fünf Jahren, verglichen mit einer alleinigen TURB (Sylvester et al. 2004). Dennoch erleiden 42,5% der Patienten, die eine solche Instillationstherapie erhalten haben, ein Rezidiv, welches sich in seiner Progressionswahrscheinlichkeit nicht von derer ohne Instillationstherapie unterscheidet (Sylvester et al. 2016). Eine alleinige Frühinstillation hat bei Patienten, die innerhalb eines Jahres bereits mehrere Rezidive erlitten und solchen, die einen Risikoscore von mehr als fünf nach EORTC aufweisen, zudem keinen nachweisbaren Effekt (Sylvester et al. 2016). Die einmalige Instillation ist deshalb nur für Tumore mit einem nach EORTC-Risikotabelle kleiner fünf eingestuftem Score die alleinige Therapie der Wahl (Sylvester et al. 2004). Die Instillation sollte dementsprechend je nach Risikograd des Patienten adjuvant fortgeführt werden.

Für die Therapie von Patienten mit einem intermediären oder hohen Risiko nach EORTC Risikotabelle, gibt es innerhalb der internationalen Leitlinienkommissionen verschiedene Vorschläge. Als gesichert gilt jedoch, dass eine Erhaltungstherapie der alleinigen Induktionstherapie bezüglich des Auftretens von Rezidiven überlegen ist (Oddens et al. 2013). Auch Malmström und Kollegen erwiesen in einer Metaanalyse, dass eine wiederholte Spülung mit BCG im Vergleich zu einem Chemotherapeutikum die Rezidivrate um 32% verringert (Malmström et al. 2009). Deshalb ist die Instillationstherapie mit BCG vor allem für NMIBC mit einem höheren Risikograd die Therapie der Wahl (Deutsche Krebsgesellschaft 2016; AWMF 2020). Jedoch kann BCG im Verlauf der Erkrankung, vor allem bei Hochrisikotumoren, an Wirkung verlieren und es treten vermehrt Rezidive auf (Lightfoot et al. 2011). Bei einer einmaligen Instillation hingegen konnte kein Unterschied zwischen den Therapeutika erkannt werden (Malmström et al. 2009). Betrachtet man die Nebenwirkungen unter den verschiedenen Wirkstoffklassen, so beschrieb ein Review nach BCG-Instillationen, im

Vergleich zu Epirubicin, vermehrte Nebenwirkungen wie Zystitis oder Hämaturie (Shang et al. 2011). In den seltensten Fällen kann BCG durch akzidentelles Übertreten in die Blutbahn Symptome auslösen, die ähnlich einer Sepsis sind und eine hohe Mortalität aufweisen (Saluja und Gilling 2018). Eine Zystektomie, vor allem bei Hochrisikotumoren, gilt bei BCG Therapieversagen letztendlich als Methode der Wahl, um die Progression des Tumors aufzuhalten (Kamat et al. 2015). Auch für sehr große T1 G3 Tumore, große CIS-Anteile innerhalb des Tumors oder ein Vordringen bis in die prostatistische Harnröhre, sollte frühzeitig eine Zystektomie in Betracht gezogen werden (Babjuk et al. 2017).

Bei der Erkrankung an einem NMIBC ist der Behandlungserfolg generell variabel und die Ursache für die häufig auftretenden Rezidive nicht eindeutig geklärt. Die Vielfältigkeit der NMIBC in ihrem Wachstumsmuster, ihrer Progressionswahrscheinlichkeit und ihrem molekularen Profil erschwert die Abschätzung der Prognose und damit die Auswahl des Therapieregimes. Trotz vieler Studien, die sich mit der Identifizierung von weiteren Risikofaktoren, wie beispielsweise den bereits vorgestellten molekulargenetischen Grundlagen des Tumors beschäftigen, führten in den letzten Jahren kaum neue Erkenntnisse zu einem weitgreifenden Einzug in die Klinik. Weiterhin bleibt die Rezidivrate bei NMIBC hoch und der Einfluss der Therapie auf die Progression und das krankheitsspezifische Überleben schlecht vorhersehbar (Saika et al. 2010).

### 3.3.4.3. Progress zu einem muskelinvasiven Tumor

Unterbleibt oder versagt die Therapie eines NMIBC, kann dieser im Verlauf fortschreiten und ein invasives Wachstum entwickeln. Bei einer Infiltration der Muskelschicht der Harnblase ist eine radikale Zystektomie angezeigt und damit oftmals ein radikales Vorgehen unumgänglich, welches oftmals mit umfassenden postoperativen Komplikationen einhergeht (AWMF 2020). Folglich ist eine alternative Harnableitung notwendig (Hernández et al. 2017). Eine bislang gleichwertige Therapiestrategie stellt das organerhaltene Verfahren mittels TURB und Radiochemotherapie dar (Ploussard et al. 2014). Bei fortgeschrittenem Stadium ( $\geq T2$ ) oder metastasiertem Zustand ist nach individueller Nutzen-Risiko-Abwägung mit dem Patienten eine adjuvante oder neoadjuvante Kombinationschemotherapie mit Cisplatin ebenfalls Teil des Therapiekonzeptes (Donin et al. 2017; AWMF 2020). Insgesamt ist der Übergang von einem nicht-muskelinvasiven zu einem muskelinvasiven Blasenkarzinom mit einer dramatischen Verschlechterung der Prognose und der Lebensqualität verbunden (Babjuk et al. 2017). Unter den für MIBC genannten Therapieverfahren leidet die Lebensqualität des einzelnen Patienten sehr (Benner et al. 2014). Die Zystektomie hat weitgreifende Folgen, die neben Schmerzen, die Umstellung auf ein eventuell alternatives Harnableitungsverfahren sowie die Einschränkungen der Sexualität und Potenz, das Leben des Erkrankten grundsätzlich ändern

(Benner et al. 2014). Deshalb ist eine effektive Therapie neben der frühzeitigen Diagnostik bei NMIBC essenziell, um das Fortschreiten der Erkrankungen zu verhindern.

### 3.4. Fragestellung

Das Extrazelluläre Adhärenzprotein aus dem Bakterium *S. aureus* zeigte bei verschiedenen Zelllinien proliferations- und migrationshemmende Eigenschaften. Schneider und Kollegen (Schneider et al. 2007) konnten bereits 2007 unter Eap eine verminderte Bildung von osseären Brustkrebsmetastasen in Mäusen beobachten. Janina Eisenbeis (Eisenbeis 2019) beschrieb erstmals eine signifikante Hemmung der Proliferation und Migration sowie eine reduzierte Aktivität der MAPK-Signalkaskade nach einer dauerhaften Therapie von Eap mit zwei NMIBC-Zelllinien. Basierend auf diesen Erkenntnissen entwickelte sich die Hypothese, Eap könnte sich als Therapeutikum für NMIBC gerade im Rahmen der als Erstlinientherapie durchgeführten Instillationstherapie der Harnblase eignen. Das Harnblasenkarzinom stand einerseits im Fokus der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen von Eap als onkologisches Therapeutikum, da dieser Tumor vor allem bei Männern in der westlichen Welt eine hohe Prävalenz hat, wobei trotz einer etablierten Standardtherapie die Rezidiv- und Progressionsneigung von NMIBC bislang noch nicht in adäquatem Maße kontrolliert reduziert werden kann. Andererseits eignet sich die Harnblase als halb-offenes System besonders, weil die externe Erreichbarkeit dieses Organs genutzt werden kann, um Eap kurzzeitig lokal einzusetzen und dadurch systemische Nebenwirkungen zu mindern. Darüber hinaus verfügt Eap über die Fähigkeit Signalwege zu beeinflussen, in denen Harnblasenkarzinome oftmals Veränderungen aufweisen, die relevant für das Wachstum und die Entdifferenzierung des Harnblasenkarzinoms sind. Dazu zählt unter anderem die MAPK-Signalkaskade, die in Harnblasenkarzinomen oftmals durch eine Mutation von Ras-Proteinen oder dem die MAPK-Kaskade aktivierenden Rezeptor FGFR-3 verändert vorliegt (Knowles 2015). Bereits für mehrere Zelltypen wurde nachgewiesen, dass unter Einfluss von Eap die Signalweiterleitungskomponente ERK1/2 im ERK1/2 MAPK-Signalweg weniger phosphoryliert vorlag und es wurde vermutet, dass Eap diesen Signalweg auf der Höhe des Proteins Ras beeinflussen könnte (Sobke et al. 2006; Eisenbeis 2019). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden deshalb gezielt Primärzellen nicht-muskelinvasiver Harnblasenkarzinome kultiviert und auf ihre Beeinflussbarkeit durch Eap untersucht. Um die Versuchssituation kliniknah zu gestalten, wurde ein *in vitro* Instillationsmodell entwickelt. In diesem Modell wurden die Zellen mit aufsteigenden Eap-Konzentrationen für zwei Stunden inkubiert. Die Inkubationszeit wurde in Anlehnung an die bisherige Dauer der Instillationstherapie anderer Chemotherapeutika zum Schutz des gesunden Urothels entsprechend kurz gewählt (AWMF 2020). Nachdem die *in vitro* Instillationstherapie vollzogen

wurde, wurde die Proliferation der Zellen mit zwei Assays verfolgt. Um die Struktur und Morphologie des Residualtumors nach einer transurethralen Resektion darzustellen, wurden 3D-Modelle in Form von Sphäroiden angezüchtet. Eap sollte in dieser Arbeit als potenzielles Therapeutikum, das zu einer Verminderung der Residualtumorzellen führt, evaluiert werden. Zusätzlich wurden Zellen innerhalb eines Sphäroids hinsichtlich ihrer intrazellulären Konzentration von ATP analysiert. Dies diente der Untersuchung Eap-induzierten Änderungen des Stoffwechsels von Zellen eines Sphäroids. Zuletzt wurde das Wiederauswachsen der Zellen aus der Sphäroidformation an eine Oberfläche, die die Blasenwand simulierte, unter Einfluss von verschiedenen Eap-Konzentrationen betrachtet. Der Versuchsaufbau stellte das Readhären von frei flotierenden Residualtumorzellen im Lumen der Harnblase und den Einfluss von Eap auf diesen Prozess, der nach einer transurethralen Tumorresektion stattfindet, nach.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Extrazelluläre Adhärenzprotein als proliferationshemmendes Tumorthapeutikum adaptiert an das Standardtherapieverfahren des NMIBC im Zellkulturmodell zu evaluieren und weitere Auswirkungen auf NMIBC zu untersuchen.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1. Material**

#### **4.1.1. Zelllinien und Wachstumsbedingungen**

Die humanen Harnblasenkarzinomzelllinien RT-4, RT-112 und 5637 wurden über die medizinische Klinik für Urologie der Universität des Saarlandes von der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) erworben. Zusammen mit der Zelllinie UMUC-3, die 2007 von Dr. Süttmann für die Klinik für Urologie bezogen wurde, wurden diese

vier Zelllinien für die folgenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Einen Überblick über weitere Eigenschaften der Zelllinien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Überblick der verwendeten Zelllinien.**

FKS= Fötale Kälberserum; Alter ? = Alter unbekannt, ATCC= American Type Culture Collection

	<u>RT-4</u>	<u>RT-112</u>	<u>5637</u>	<u>UMUC-3</u>
<b>Patientendaten</b>	♂, 63 J.	♀, Alter ?	♂, 68 J.	♂, Alter ?
<b>Tumor</b>	TCC, T2 G1	TCC, Ta G2	TCC, G2	TCC, G3
	Rezidiv	Primärtumor	Primärtumor	
<b>Morphologie</b>	epithelial	epithelial	epithelial	epithelial
<b>Wachstum</b>	Monolayer	Monolayer	Monolayer	Monolayer
<b>Verdopplungszeit</b>	80h	35h	24h	24h
<b>Medium</b>	RPMI	RPMI	RPMI	DMEM
<b>Zusätze</b>	10% FKS	10% FKS	10% FKS	10% FKS
<b>Invasivität</b>	nicht-invasiv	nicht-invasiv	nicht-invasiv	nicht-invasiv
<b>Migration</b>	gering	gering	gering	gering
<b>Quelle</b>	DSMZ Nr. ACC 412	DSMZ Nr. ACC 418	DSMZ Nr. ACC 35	ATCC Nr. CRL-1749

#### 4.1.1.1. Inkulturnahme der Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden vorsichtig in einem Wasserbad aufgewärmt, bis das Medium begann flüssig zu werden. Anschließend wurden die Zellen in ein Falcon mit je fünf Milliliter (ml) des jeweiligen, auf Raumtemperatur erwärmten Zellkulturmediums, das mit 10% Fötalem Kälberserum (FKS) versetzt wurde, überführt. Danach wurden die Falcons für zwei min bei 1200 Runden pro Minute (rpm) zentrifugiert (Eppendorf centrifuge 5810R), um das Kryomedium von den Zellen zu trennen. Dann wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in einem Milliliter frischem Zellkulturmedium vorsichtig resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen auf eine 6-Well-Platte ausgesät und über die nächsten Tage beobachtet. Sobald die Zellen das Well konfluent bewachsen hatten, wurden sie gesplittet. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Wells mit phosphatgepufferter Salzlösung („phosphate-buffered saline“, engl. kurz PBS) gespült. Um die adhären wachsenden Zellen vom Wellboden zu lösen, wurden die Zellen für 5-15 min im Inkubator mit Trypsin behandelt (TrypLE Express, Gibco). Die Reaktion von Trypsin wurde mit der vierfachen Menge an Zellkulturmedium abgestoppt, wonach die Zellsuspension auf eine Zellkulturplatte (60 cm<sup>2</sup>, TPP) mit 10 ml vorgewärmten Medium überführt werden konnte. RT-4, RT-112 und 5637 wurden in Roswell Park Memorial Institute-Medium (kurz: RPMI, Gibco) kultiviert, das mit 10% FKS (PAA, Pasching, Austria) versetzt wurde. Die Linie UMUC-3 wuchs in Dulbecco's Modified Eagle's-Medium (kurz: DMEM, Gibco), ebenfalls versetzt mit 10% FKS, an. Kultiviert wurden die Zellen mit Hilfe des Thermo Scientific Inkubators von HERA Cell 150i bei 37 Grad Celsius und 5%

CO<sub>2</sub>-Begasung. Alle zwei bis vier Tage wurden die Zellen nach einer mikroskopischen Begutachtung gesplittet und auf eine neue Zellkulturplatte überführt. Dabei wurde regelmäßig eine Trypanblau (Sigma) gestützte Zellzahlanalyse mit Hilfe des Cell Counter (BioRad) durchgeführt.

Vor der Durchführung der Versuche wurden die Zellen auf Mykobakterien getestet. Dafür wurden von jeder Zellreihe 1,5 ml des Kulturmediums aus der Zellkulturplatte mit heranwachsenden Zellen entnommen und bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, um größere Zellbestandteile zu entfernen. Von dem flüssigen Überstand wurden je 100 Mikroliter (µl) in ein Well einer 96-Well Platte (Thermo Scientific) pipettiert. Außerdem wurden noch je drei Wells mit einer Negativkontrolle (MycoAlert™ Assay Buffer, Lonza) und drei weitere mit einer laboreigenen Positivkontrolle befüllt. Die Auswertung erfolgte mit dem MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit von Lonza und die Messung mit dem EnSight Multiplaterreader (96-Well Platten Lesegerät von PerkinElmer). Keine der Zelllinien wurde positiv auf Mykoplasmen getestet.

#### 4.1.1.2. Kryokonservierung

Um zu gewährleisten, dass die Zellen nur bis zu maximal 27 Mal gesplittet wurden, wurde ein Teil der Zellen zur Konservierung eingefroren. Dafür wurden die Zellen gesplittet und nach der Bestimmung der Zellzahl eine Zellsuspension mit minimal 10<sup>5</sup> Zellen/ml angesetzt. Die Suspension wurde folgend bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, woraufhin der flüssige Überstand abgesaugt wurde. Das Zellpellet wurde in einem Milliliter Kryoreagenz bestehend aus 60% des jeweiligen Zellkulturmediums inklusive 10% FKS, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) und zusätzlich 30% FKS resuspendiert und in ein Cryotube (Nunc® CryoTubes® 2ml, Sigma Aldrich) überführt. Die Cryotubes wurden für 24 h in einem Gefrierbehälter (ThermoScientific, „Mr. Frosty“) in der Kühltruhe bei -80 Grad Celsius (°C) herabgekühlt und anschließend in einem Stickstofftank dauerhaft konserviert.

#### 4.1.2. Extrazelluläres Adhärenz Protein

Das Extrazelluläre Adhärenzprotein stammt aus dem *S. aureus* Stamm Newman (Duthie und Lorenz 1952). Nach einem laborinternen Protokoll, das nach der Beschreibung von Athanasopoulos modifiziert wurde, wurde Eap von Karin Hilgert (Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg (Saar)) aufgereinigt und isoliert (Athanasopoulos et al. 2006).

Die Denaturierung des Proteins für die zweite Negativkontrolle wurde mit aufgereinigter Proteinase K (1:10 in PBS verdünnt) durchgeführt. Dafür wurden jeweils 50 µl Eap mit 1,25 µl

Proteinase K für 15 min bei 55°C und anschließend 15 min bei 94°C auf dem Heizblock inkubiert.

#### 4.1.3. Zellkulturmedien

DMEM	Gibco®, Invitrogen, Darmstadt
RPMI 1640	Gibco®, Invitrogen, Darmstadt

#### 4.1.4. Lösungen, Puffer, Enzyme

Fötales Kälberserum	PAA, Pasching, Österreich
N,N-Dimethylformamid	VWR Chemicals, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Applichem, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat	Serva Feinbiochemie GmbH & Co, Heidelberg
PBS (10x)	81,8 g NaCl; 2 g KCl; 16 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O; 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4; ad 1 l H <sub>2</sub> O
Proteinase K	Quiagen, Hilden
Thiazolyl-Blau-	
Tetrazolium bromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	BioRad, München
Trypsin	Tryp-LE® Express, Invitrogen, Darmstadt

#### 4.1.5. Reaktionssysteme (Kits)

ATPLite 3D-Assay	Perkin Elmer, Rodgau
BrdU-ELISA	Roche, Mannheim

#### 4.1.6. Laborgeräte

Cell CounterTC20	Bio Rad, München
EnSight	PerkinElmer, Rodgau Jügesheim
Feinwaage	Mettler AE 100, Gießen
Gefrierbehälter	„Mr. Frosty“, ThermoScientific, Schwerte
Inkubator	HeraCell150i, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Mehrkanalpipette 200 µl	Brandt, Transferpipette S8, Wertheim
Mikroskop	Cell observer, Zeiss, Wetzlar
Pipettierhilfe	Pipettboy, Integrad Bioscience, Zizers, Schweiz

Pipettensatz	Eppendorf Research Fix®, Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank	Hereaus, Typ HS12, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Standard analog shaker	VWR International GmbH, Darmstadt
Thermomixer	HTA Biotech, Bovenden Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg
Vortex	Janke& Kunkel, IKA- Werk, Typ VF, Staufen
Wasserbad	GFL, Typ 1002, Burgwedel
Zentrifugen	Eppendorf centrifuge 5810R, Hamburg Eppendorf centrifuge 5418, Hamburg

#### 4.1.7. Verbrauchsgegenstände

6-Well-Platte	TTP-AG, Trasadingen, Schweiz
96-Well-Platte (flach)	Nunclon Delta Surface, Thermo Scientific, Schwerte
96-Well-Platte (rund)	Ultra-low attachment, 7007, Corning®, Kaiserslautern
Cell Counting Slides	BioRad, München
Cryotubes 2 ml	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Falcon 15 ml, 50 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Glaspipetten 5, 10, 25 ml	Corning®, Kaiserslautern
Pipettenspitzen:	
0,5-10 µl	Sarstedt, Nümbrecht
20 µl	Greiner, Frickenhausen
10-100 µl	Sarstedt, Nümbrecht
10-200 µl	Greiner, Frickenhausen
1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	TTP-AG, Trasadingen, Schweiz

#### 4.1.8. Software

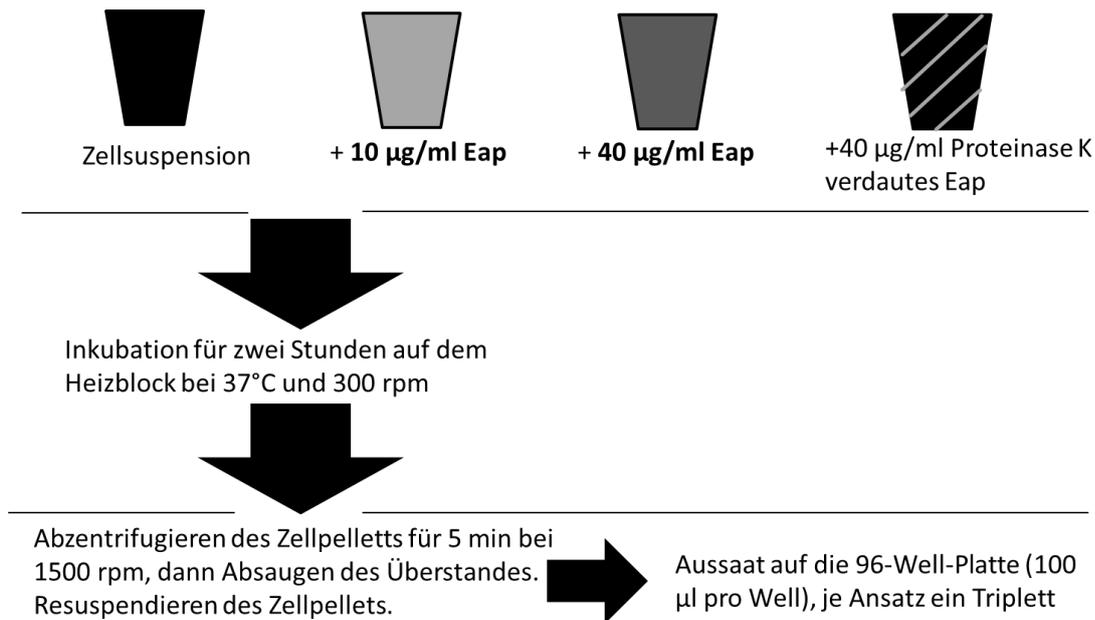
Excel	Microsoft Excel 2007
ImageJ	Version 1.51f (Open source: <a href="https://imagej.net/Downloads">https://imagej.net/Downloads</a> )
Kaleido	Perkin Elmer, Rodgau Jügesheim, Version 2.03058.126
GraphPad Prism 6	Version 6.04, GraphPad Software Inc., San Diego, USA

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. *In vitro* Instillationsmodell

Um möglichst ähnliche Bedingungen wie in der Harnblase zu schaffen, wurde für diese Arbeit ein modifiziertes Instillationsmodell entworfen (siehe Abb. 4).

Zunächst wurden für jeden Versuch pro Zellreihe vier Ansätze angefertigt. Dafür wurde die Zellzahl mit Hilfe des Cell Counter TC20 (Bio Rad, München) bestimmt und anschließend durch Verdünnung der Zellsuspension die für den Versuch benötigte Zellzahl eingestellt. Zwei dieser Ansätze dienten als Kontrollen. Ein Kontrollansatz blieb dabei unbehandelt, ein weiterer wurde mit 40 µg/ml Eap, das zuvor mit Hilfe von Proteinase K (PK)- und Hitze denaturiert wurde, versetzt. Die anderen beiden Ansätze wurden mit aufsteigenden Eap-Konzentrationen (10, 40 µg/ml Eap) behandelt. Diese Konzentrationen wurden ausgewählt, da in Vorversuchen bei einer dauerhaften Inkubation mit Eap wachstumshemmende Effekte nachgewiesen werden konnten. Jeder Ansatz wurde in einem Eppendorfgefäß für zwei Stunden (h) auf dem Heizblock bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert und die jeweilige Versuchslösung abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 300 µl Kulturmedium mit 10% FKS resuspendiert. Für die Versuche der 2D-Zellkultur wurde je Ansatz ein Triplet á 100 µl in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die Ansätze für jene Versuche der 3D-Zellkultur waren Einzelwertungen. Die Platte wurde dann im Inkubator HeraCell150i, (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Es wurden in den Proliferationsassays regelmäßig Kontrollen von unbehandelten Zellsuspensionen, die nicht auf dem Heizblock waren, mitgeführt, um die Effekte der Inkubation bei 300 rpm abschätzen zu können. Da diese marginal ausfielen und unabhängig von der Vorbehandlung waren, werden sie nicht weiter erwähnt.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der *in vitro* Instillationstherapie.**

## 4.2.2. Proliferationsassays

### 4.2.2.1. BrdU-Assay

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde mit dem kolorimetrischen Bromodesoxyuridin-Assay, kurz BrdU-Assay (Roche, Basel, Switzerland), gearbeitet. Dieser spiegelt durch den Nachweis des Einbaus von dem Thymidinanalogons Bromodesoxyuridins (BrdU) die DNA-Replikation der Zellkultur über einen ELISA-Assay wider. Durchgeführt wurde der Assay nach der *in vitro* Instillationstherapie. Dafür wurde im Anschluss an die Aussaat von je 100 µl Zellsuspension pro Well in eine 96-Well-Platte (Thermo Scientific, Nunclon Delta Surface) und nach dem Anwachsen der Zellen über zwei Zeitperioden, 10 µl BrdU pro Well hinzugegeben. 24 h später wurde dann das Versuchsmedium abgesaugt und eine Lösung zur Denaturierung der Zelle hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation und dem Absaugen der Lösung wurden die denaturierten und fixierten Zellen für 90 min mit einem Peroxidase-gekoppelten BrdU-Antikörper versetzt. Diese sollten sich mit dem in die DNA eingebauten BrdU verbinden. Damit nur die an die DNA gebundenen Antikörper in der späteren kolorimetrischen Reaktion gemessen werden, wurden die Zellen mehrfach gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Zuletzt erfolgte die Hinzugabe der Substratlösung mit anti-BrdU-Antikörpern, die durch die Bindung an BrdU-Antikörper zu einem Farbumschlag des Mediums führten. Dieser Farbumschlag wurde nach 30 min anhand des EnSight Multiplatereader bei 370 Nanometer (nm) gegen 492 nm gemessen werden. Die ermittelte Extinktion diente als Korrelat für den Einbau von BrdU in die DNA der NMIBC-Zellen und stellte einen Anhalt für die zelluläre Replikation dar.

Für die Auswertung der Proliferation wurden zwei Zeitpunkte nach Aussaat für die Hinzugabe des BrdU gewählt. Einerseits wurde direkt nach der Aussaat der Zellen in die Wells BrdU zu den Zellen gegeben, um nach 24 h die Proliferationsrate messen zu können. Für dieses Kurzzeitprotokoll wurde eine Zellzahl von  $1 \cdot 10^4$  Zellen/ml voreingestellt. Andererseits wurde in einem Langzeit-Versuchsprotokoll drei Tage nach der Aussaat BrdU zu den Zellen gegeben und ebenfalls nach 24-stündiger Inkubation die beschriebene Auswertung durchgeführt. Die verwendete Zellzahl betrug in diesem Fall  $1 \cdot 10^3$  Zellen/ml. Dieses Zeitintervall wurde als Maximum gewählt, da davon ausgegangen werden kann, dass dann die Nährstoffe im Kulturmedium nahezu aufgebraucht sind und ein Tausch des Mediums das normale Wachstum der Zellen beeinflussen könnte. Die Versuchsreihe im jeweiligen Zeitintervall wurde im Kurzzeitintervall sieben Mal und im Langzeitintervall sechs Mal wiederholt.

#### 4.2.2.2. MTT-Assay

Anschließend wurde ein MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Test durchgeführt, der indirekt die Stoffwechsellistung über die Messung der mitochondrialen Aktivität widerspiegelt. Die zuvor beschriebenen vier Ansätze bestehend aus zwei Negativkontrollen und zwei Eap-behandelten Zellsuspensionen wurden auch hier dem *in vitro* Instillationsmodells (Abb. 2) unterzogen. Darauffolgend wurden die behandelten NMIBC-Zellen, wie bereits im BrdU-Assay beschrieben, ausgesät. Nachdem die Zellen auf der Platte angewachsen waren, wurden 100 µl des gelben MTT-Reagenzes (2,5 Milligramm/ml Thiazolyl-Blau Tetrazolium-Bromid in PBS, pH 7,2) pro Well für zwei Stunden hinzugegeben. Während der Inkubation wurde das MTT von mitochondrialen Enzymen, wie zum Beispiel der Succinatdehydrogenase, zu einem violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert. Anschließend wurde die MTT-Reagenzlösung abgesaugt. Um das noch intrazellulär gelegene Formazan freizusetzen, wurden die Zellen mittels Lyse-Reagenz, bestehend aus 20% Natriumlaurylsulfat (SDS), 30% Dimethylformamid (DMF) und 2% Essigsäure (pH 4,7), lysiert. Der violette Farbumschlag wurde nach 30-minütiger Inkubation bei 570 nm gegen 630 nm gemessen. Auch in dieser Versuchsreihe wurden zwei Zeitintervalle betrachtet. Der Kurzzeitversuch wurde bei einer Zellzahl von  $2 \cdot 10^5$ /ml nach 24 Stunden ausgewertet. Für den Langzeitversuch, bei dem eine Auswertung vier Tage nach Aussaat vorgenommen wurde, wurde nach Untersuchung der optimalen Wachstumsdichte auf dem Well eine Zellzahl von  $3 \cdot 10^4$ /ml für RT-4 und 5637,  $2 \cdot 10^4$ /ml für RT-112 und  $1,5 \cdot 10^4$ /ml für UMUC-3 verwendet. Es wurden pro Versuch sechs Wiederholungen durchgeführt.

### 4.2.3. Sphäroide

Neben den beschriebenen Proliferationsanalysen der adhärent wachsenden NMIBC-Zellkulturen, wurden auch Analysen an Sphäroiden, welche als 3D-Modelle einer Zellkultur fungieren, durchgeführt. Zur Erstellung der Sphäroide wurden 96-Well-Platten mit Rundenboden (Costar, ultra low cluster), die antiadhäsiv beschichtet waren, verwendet. Unter diesen Bedingungen adhären die Zellen nicht am Well-Boden, sondern nutzen interzelluläre Adhäsionskräfte, um eine rundliche Formation ohne Kontakt zum Well anzunehmen.

Eine Zellzahl von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml wurde in Vorversuchen für die Erstellung von NMIBC-Sphäroiden als optimal getestet und der Vergleichbarkeit halber für alle Zelllinien festgelegt. Bei dieser Zellzahl werden nach bisherigen Erkenntnissen Sphäroide mit einem nekrotischen Kern gebildet, was das Wachstums eines Tumors *in vivo*, der ebenfalls zum Teil aus nekrotischen Arealen besteht, weitestgehend simuliert (Mueller-Klieser 2000).

#### 4.2.3.1. Analyse der Querschnittsfläche

Zur Größenbestimmung der Sphäroide wurden wieder vier Ansätze pro Zelllinie im Instillationsmodell behandelt (Abb. 2). Es wurde je Ansatz ein Triplet auf eine Rundbodenplatte mit je 100  $\mu$ l pro Well ausgesät und für vier Tage im Brutschrank inkubiert. Täglich erfolgte die Aufnahme jedes Wells mit Hilfe des EnSight Multiplatereaders im Transmissionsmodus. Dabei wurden neben einer Übersichtsaufnahme der Platte, auch eine Nahaufnahme jedes Wells angefertigt, indem die Entwicklung des Sphäroids begutachtet werden konnte. Die Tiefenschärfe des Bildes konnte über die Einstellung der Aufnahmehöhe in Kaleido in Abhängigkeit von der Sphäroidgröße eingestellt werden. Um die Querschnittsflächen der Sphäroide zu bestimmen, wurde das Bildbearbeitungsprogramm Image J 8 (Version 1.51f) verwendet (Schneider et al. 2012). Nachdem die Skalierung der Aufnahme in Image J voreingestellt wurde, wurde unter „Tools“ der „Region of Interest Manager“ (kurz: „ROI Manager“) geöffnet. Mithilfe des Werkzeugs „Freehand Selection“ wurde anschließend der Rand des Sphäroids manuell nachgefahren. Als Begrenzung wurde der äußerste Rand des Sphäroids gewählt, der optisch am stärksten abzugrenzen war. Durch dieses manuelle Nachzeichnen des Sphäroidrandes wurde eine Region vorgegeben werden, deren Inhalt von Image J im ROI Manager erfasst und durch die Funktion „Measurement“ ausgemessen wurde. Die gemessenen Querschnittsflächen wurden in eine Excel Tabelle überführt. Der Versuch wurde pro Zelllinie an fünf verschiedenen Tagen wiederholt, es wurden 12 Einzelwerte pro Ansatz erhoben.

#### 4.2.3.2. ATPLite 3D-Assay

Darüber hinaus wurden die Sphäroide mit dem ATPLite 3D-Assay (Perkin Elmer) analysiert, um die Stoffwechselaktivität der unterschiedlich vorbehandelten Zellen innerhalb des Sphäroids zu untersuchen. Für diesen Assay mussten Sphäroide mit einer geringeren Zellzahl angelegt werden, da die Messwerte der Lumineszenz bei steigender Zellzahl laut Hersteller an Sensitivität verlieren. Deshalb wurden die Zellzahl auf  $5 \times 10^4$  Zellen/ml angepasst. Die Sphäroidbildung wurde wie bereits beschrieben induziert. Nachdem diese 24 h angewachsen waren, wurden die Zellen des Sphäroids mit 50  $\mu$ l Mammalian Cell Lysis Buffer (MCLB) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 700 rpm für zehn Minuten lysiert. Daraufhin wurde mikroskopisch kontrolliert, ob die Sphäroide lysiert waren. Anschließend wurde zu der entstandenen Lösung aus lysierten Zellen und frei vorliegendem ATP 50  $\mu$ l einer Substrat Lösung hinzugegeben, die durch Auf- und Abpipettieren mit dem Zellysat vermischt wurde. Diese enthielt das Substrat D-Luciferin, welches unter Verbrauch von ATP, katalysiert durch das ebenfalls in der Substratlösung enthaltene Enzym Luciferase, Lumineszenz emittiert. Die Luminezenz-Emission der einzelnen Ansätze wurde nach 15-minütiger lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur und angeschlossenem Transfer von je 50  $\mu$ l pro Well in eine graue 96-Well-Platte mit Flachboden (Perkin Elmer), die mit einem durchsichtigen Plastikstreifen abgedeckt wurde, gemessen. Die Messung der Lumineszenz erfolgte für ein Zeitintervall von 0,1 Sekunde mithilfe des EnSight Multiplatereaders, der die Messwerte als relative Lichteinheiten (engl.: „relative light units“, kurz RLU) angab. Da die Kurzzeitversuche im 2D-Modell die vielversprechendsten Effekte von Eap auf die Proliferationsrate zeigten, wurde der ATP-Assay ebenfalls 24 h nach Aussaat der Sphäroide ausgewertet. Um auszuschließen, dass das Zellkulturmedium einen Einfluss auf die Emission von Lumineszenz hatte, wurde dieses ebenfalls mit Substrat Lösung versetzt und als Kontrolle mitgeführt. Die Werte lagen für RPMI im Mittel bei 1150 RLU und für DMEM bei 1000 RLU. Aufgrund der ähnlichen Messwerte wurde die Einbeziehung des Mediums in der Auswertung nicht berücksichtigt.

#### 4.2.3.3. Wiederaussaat des Sphäroids

In einem weiteren Versuch wurde das Auswachsen der Zellen aus ihrer rundlichen Sphäroid-Formation, nach dem Umsetzen des Sphäroids aus dem Rundboden- auf eine Flachbodenplatte untersucht. Bei diesem Versuch wurde das in Kapitel 3.3 beschriebene Instillationsmodell abgewandelt. Zunächst wurden dafür je Ansatz ein Triplet pro Zellreihe mit 100  $\mu$ l unbehandelter Zellsuspension bei einer Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml in einer Rundbodenplatte ausgesät. Diese verblieben für 24 h im Inkubator, sodass ein Sphäroid

heranwachsen konnte. Nun erfolgte die modifizierte *in vitro* Instillationstherapie. Wieder wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Dabei blieb ein Triplet jeder Zelllinie unbehandelt und ein weiteres wurde mit 40 µg/ml Proteinase K- und Hitze-denaturiertem Eap versetzt. Die beiden übrigen Triplets wurden einerseits mit einer Konzentration von 10 µg/ml Eap und andererseits mit einer Konzentration von 40 µg/ml behandelt. Im Anschluss erfolgte eine zweistündige Inkubation im Brutschrank. Danach wurde das Versuchsmedium unter Schonung des Sphäroids vorsichtig abgesaugt. Dafür wurde ein langer Rand der Platte etwa 45 Grad vom Boden abgehoben, damit die Sphäroide an das untere Ende des Wells sinken. So konnte die Pipette zum Absaugen an den oberen Pol des Wells gehalten werden, damit die Sphäroide nicht beschädigt wurden. Pro Well erhielten die Sphäroide 100 µl frisches Zellkulturmedium mit 10% FKS. Darin wurden die Sphäroide einzeln mit Hilfe einer Pipette, bei der das obere Drittel der Pipettenspitze zur Minderung der Scherkräfte abgeschnitten wurde, auf eine 96-Well-Platte mit Flachboden überführt. Nach jeweils 24 h im Inkubator wurde das Auswachsen der Zellen aus dem Sphäroid an die Flachbodenplatte mit dem Transmissionsmodus des EnSight Multiplatereaders über drei Tage beobachtet. Angeschlossen an die Aufnahme des Wells wurde eine Bildanalyse mittels Kaleido durchgeführt, die die Konfluenz des Wells ermittelte. Als Konfluenz wurde der prozentuale Anteil des Wells bezeichnet, der von Zellen bewachsen wurde. Aufgrund des manuell anspruchsvollen Verfahrens, bei dem viele Sphäroide anfänglich durch zu schnelles Pipettieren zerstört wurden, wurden sechs Einzelwerte je Zelllinie und Ansatz generiert.

#### 4.2.4. Statistische Auswertungen

Die Rohdaten aus Kaleido wurden in eine Microsoft Excel 2007 Tabelle überführt und geordnet. Für die Proliferationsassays in der 2D-Zellkultur wurden für jeden Ansatz Triplets angefertigt, mit deren Mittelwert die statistische Auswertung durchgeführt wurde. Bei den Versuchen der 3D-Zellkultur wurde jedes Sphäroid individuell betrachtet und als Einzelwert für die Auswertung herangezogen. Zur statistischen Auswertung wurden die Daten in Prism Version 6.04 transferiert. Die Korrelation der behandelten Ansätze untereinander wurde für alle Versuche mit dem Mann-Whitney-U-Test für jede einzelne Kombination analysiert. Darüber hinaus wurde die Querschnittsfläche der Sphäroide auf die Fläche des nach 24 h angewachsenen Sphäroids normiert. Diese Daten wurden im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test analysiert. Der Übersicht halber sind in den dargestellten Graphiken nur die Testung von 10 µg/ml beziehungsweise (bzw.) 40 µg/ml gegen die beiden Kontrollen dargestellt. Ein  $p \leq 0,05$  (\*) und  $p \leq 0,01$  (\*\*) wurde als signifikant betrachtet, von einem statistischen Trend wird bei einem p-Wert  $< 0,1$  gesprochen.

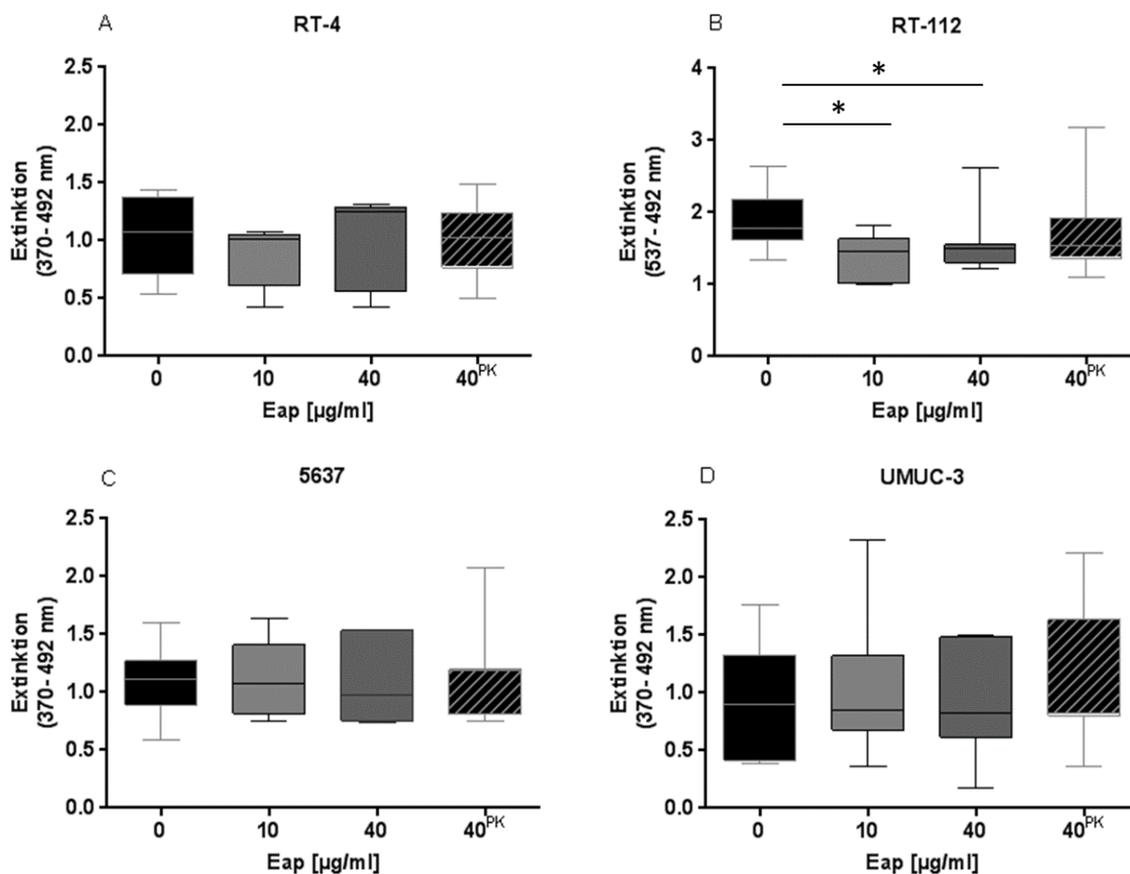
## 5. Ergebnisse

### 5.1. Proliferationsassays

Die Auswirkungen von Eap auf die Proliferation der nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinom-Zelllinien wurden nach der *in vitro* Instillationstherapie mit zwei verschiedenen Assays an zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

#### 5.1.1. BrdU-Assay

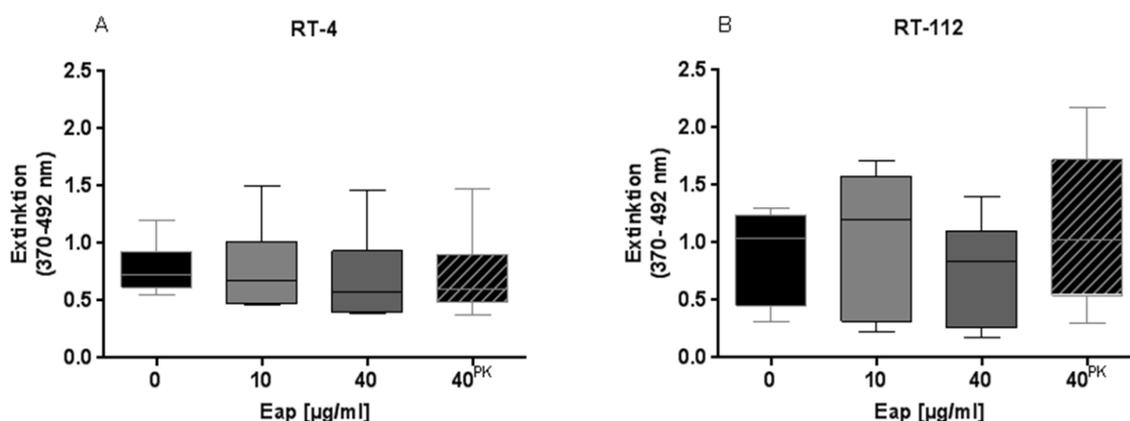
Um einen Anhaltspunkt für die Proliferation der Zellen zu erhalten, wurde die Messung der DNA-Replikationsleistung herangezogen. Dafür wurde die Einbaurrate des Thymidinanalogs Bromodesoxyuridin (BrdU) in die zelluläre DNA gemessen. Hierfür wurden Zellen der Harnblasenkarzinom-Zelllinien RT-4, RT-112, 5637 und UMUC-3 in BrdU-supplementiertem Nährmedium mit steigenden Eap-Konzentrationen (0, 10 oder 40  $\mu\text{g/ml}$  Eap, bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  Eap, das zuvor Protease-behandelt und hitzedenaturiert wurde) nach dem in Abb. 4 gezeigtem Schema inkubiert, gewaschen und in 96-Well-Platten ausgesät. Der Einbau an BrdU wurde 24 h (Abb. 5) bzw. 96 h (Abb. 6) nach Aussaat ermittelt.

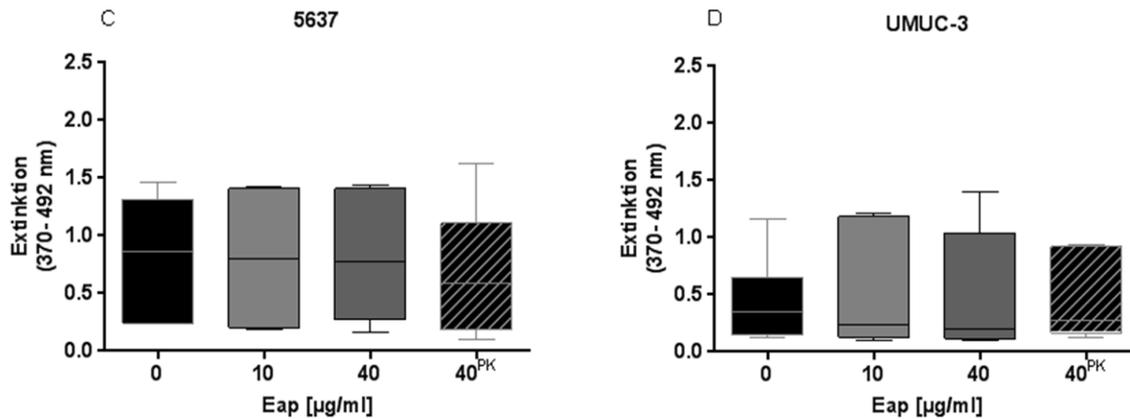


**Abbildung 5: BrdU-Assay im Kurzzeitintervall.** Die NMIBC-Zellen wurden bei einer Zellzahl von  $1 \cdot 10^4$  Zellen/ml in RPMI 1640 bzw. DMEM-Medium und 10% FKS mit steigenden Eap-Konzentrationen [0, 10, 40  $\mu\text{g/ml}$ ] im Instillationsmodell inkubiert und anschließend auf eine 96-Well-Platte ausgesät. 24 h nach der Aussaat wurden die Zellen dem BrdU-Assay unterzogen. Der Proliferationsassay wurde je sieben Mal wiederholt; wobei für jeden Ansatz Tripletten angefertigt wurden, deren Mittelwerte im Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz geprüft wurden ( $*p < 0,05$ ). Die Boxplots zeigen den Median mit Interquartilsabstand, die Verlängerung (Antennen) den kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10  $\mu\text{g/ml}$  Eap-behandelter Ansatz, „40“=40  $\mu\text{g/ml}$  Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“= mit 40  $\mu\text{g/ml}$  Eap behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

Bei der Auswertung der 24 h-Proben konnte bei der mit Eap-behandelten NMIBC-Zelllinie RT-112 bereits bei einer Eap-Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  eine signifikant verminderte Proliferation festgestellt werden, die ebenfalls bei der höheren Eap-Konzentration zu beobachten war (Abb. 5B:  $*p = 0,038$  bzw.  $0,036$ ). Da dieser Effekt bei einer Behandlung der Zellen mit Proteinase K und Hitze-behandeltem Eap nicht zu verzeichnen, darf davon ausgegangen werden, dass die verminderte BrdU Einbaurrate in RT-112 Zellen nach Eap-Instillationstherapie auf das bakterielle Protein zurückführbar ist. Zu beachten ist bei dieser Zelllinie auch, dass im Vergleich zu den anderen Zelllinien höhere Extinktionswerte vorlagen, was vermuten lässt, dass diese Zelllinie eine höher Proliferationsrate als die anderen hier getesteten NMIBC-Zelllinien aufweist. Bei den Zelllinien RT-4, 5637 und UMUC-3 (Abb. 5 A, C und D) hingegen konnte nach Eap-Kurzzeitbehandlung keine statistisch signifikante Veränderung der BrdU-Einbaurrate beobachtet werden. Diese Befunde wiesen darauf hin, dass Eap nicht bei allen NMIBC-Zelllinien dieselben Effekte hervorruft.

Bei der Untersuchung der Proliferation vier Tage nach der *in vitro* Instillationstherapie, bei der die Zellen ebenfalls 24 h vor der Fixierung, Denaturierung und Behandlung mit den anti-BrdU Antikörpern mit BrdU inkubiert wurden, unterschieden sich die Eap-behandelten Ansätze und die Kontrollen in Hinblick auf die Peroxidase-induzierte Farbveränderung des chromogenen Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin nicht signifikant (Abb. 6).



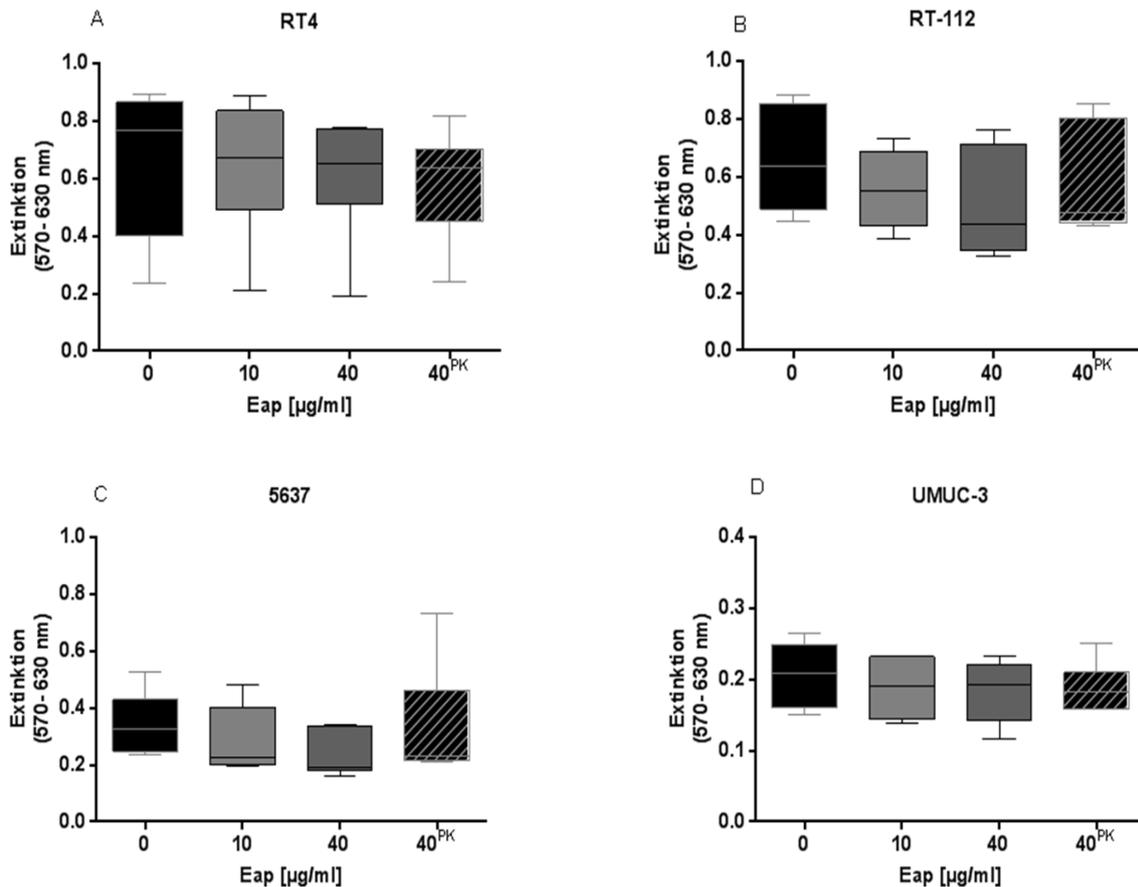


**Abbildung 6: Der BrdU-Assay im Langzeitintervall.** Der Versuchsaufbau war gleich dem des Kurzzeitversuchs, jedoch wurde hier eine Zellzahl von  $1 \cdot 10^3$  Zellen/ml verwendet und die Hinzugabe des BrdU bzw. die Auswertung erfolgte erst drei bzw. vier Tage nach der *in vitro* Instillationstherapie. Die Darstellung basiert auf der sechsfachen Wiederholung der Versuche. Die statistischen Daten wurden aus den Mittelwerten der drei technischen Replikate im Mann-Whitney-U-Test erhoben. Die Boxplots zeigen den Median mit Interquartilsabstand, die Verlängerung (Antennen) den kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40“=40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“= mit 40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

Keine der hier getesteten NMIBC-Zelllinien wies vier Tage nach der Eap-Instillationstherapie eine im Vergleich zur Kontrolle verringerte Extinktion auf. Schlussfolgernd wurde durch die Behandlung mit Eap keine über einen längeren Zeitraum wirkende Verminderung der Replikationsrate bei diesen NMIBC-Zelllinien induziert. Hervorzuheben ist jedoch die hohe Streuung der Messwerte zwischen den einzelnen biologischen Wiederholungen, die in diesen Versuchsreihen bei allen Zelllinien vorlag.

### 5.1.2. MTT-Assay

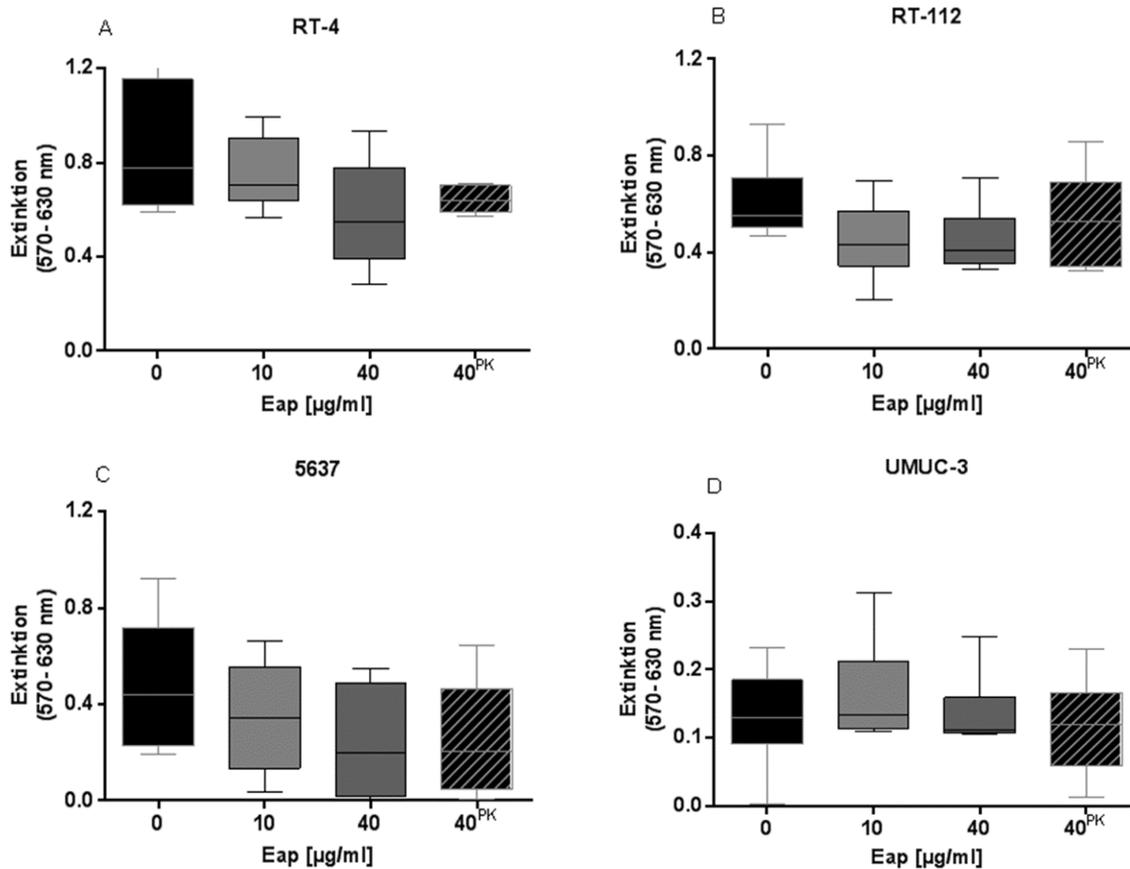
Einen weiteren Assay zur Betrachtung der inhibitorischen Effekte des Eap auf die Stoffwechselaktivität der NMIBC-Zelllinien stellte der MTT-Assay im Kurz- und Langzeitversuch dar. In diesem Assay wird die metabolische Aktivität der Zellpopulation als Indikator für die Vitalität des Zellpools bestimmt. Wie zuvor wurden hierfür die Eap-behandelten Zellen in 96-Wellplatten ausgesät und für 24 bzw. 96 h in Zellkulturmedium inkubiert, bevor die Zellpopulationen mit der MTT-haltigen Lösung behandelt wurden. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in den Abbildungen 7 (24 h) und 8 (96 h) graphisch dargestellt.



**Abbildung 7: MTT-Assay im Kurzzeitintervall.** Die in RPMI1640 bzw. DMEM-Medium und 10% FKS kultivierten Zellen wurden nach der *in vitro* Instillationstherapie bei einer Zellzahl von  $2 \cdot 10^5$ /ml in 96-Well-Platten ausgesät und für 24 h in ihrem jeweiligen Medium kultiviert. Anschließend wurde der MTT-Assay wie in Kapitel 4.2.2.2. beschrieben durchgeführt. Das Experiment wurde sechsfach wiederholt und auf Basis der Mittelwerte der technischen Replikate im Mann-Whitney-U-Test ausgewertet ( $*p < 0,05$ ). Die Boxplots zeigen den Median mit Interquartilsabstand, die Verlängerung (Antennen) den kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40“=40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“= mit 40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

Anders als im BrdU-Assay (Abb. 5) konnte im MTT-Kurzzeitversuch bei keiner Zelllinie ein signifikanter Eap-abhängiger Effekt nachgewiesen werden. Zellen, die im BrdU-Kurzzeitversuch durch Eap-beeinträchtigten Linie RT-112, wurden auch nach der Instillationstherapie mit der höheren Eap-Konzentration (40) nicht signifikant in ihrer metabolischen Aktivität beeinflusst, jedoch lag zumindest trendmäßig eine verringerte Extinktionsrate verglichen mit der Kontrolle (0) vor ( $p=0,093$ ). Auch für die Zelllinie 5637 lag in diesem Assay ein ähnlicher Trend vor ( $p=0,0649$ ). Demnach verminderte Eap in geringem Maße lediglich die metabolische Aktivität bzw. die Anzahl an stoffwechselaktiven Zellen der Urothelkarzinomzelllinie RT-112 und 5637. Bei der geringeren Eap-Konzentration von 10 µg/ml ließ sich bei dieser Zelllinie keine Signifikanz im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle feststellen. Die Zelllinien RT-4 und UMUC-3 blieben in diesem Testverfahren von einer Eap-Vorbehandlung unbeeinflusst.

Auch der MTT-Assay wurde in einem Langzeitintervall wiederholt. Dabei wurden die Zellen vier Tage nach der *in vitro* Instillationstherapie im MTT-Assay hinsichtlich ihrer Stoffwechselaktivität untersucht (Abb. 8).



**Abbildung 8: Der MTT-Assay im Langzeitintervall.** Für jede Zelllinie wurde eine individuelle Zellzahl in einem Vorversuch unter der Kultivierung in RPMI1640 bzw. DMEM-Medium und 10% FKS festgelegt ( $3 \cdot 10^4/\text{ml}$  für RT-4 und 5637,  $2 \cdot 10^4/\text{ml}$  für RT-112 und  $1,5 \cdot 10^4/\text{ml}$  für UMUC-3). Nach sechsfacher, unabhängiger Wiederholung des Experiments wurden die Mittelwerte der Tripletten im Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz geprüft. Die Boxplots zeigen den Median mit Interquartilsabstand, die Verlängerung (Antennen) den kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40“=40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“= mit 40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

Keine Zelllinie wies in diesem Versuch einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und den Eap-behandelten Ansätzen auf. Jedoch ließ sich bei den Zelllinien RT-112 und 5637 ein statistischer Trend zwischen den mit 40 µg/ml Eap behandelten Zellen (40) und den unbehandelten Kontrollen (0) erkennen ( $p=0,064$  bzw.  $p=0,093$ ). Dies deutete darauf hin, dass die Eap-Behandlung die Zellen in ihrem Stoffwechsel im Vergleich zu den unbehandelten Zellen noch immer beeinträchtigte. Bei der Zelllinie RT-112 lag für die mit 10 µg/ml Eap-behandelten Zellen ein ähnlicher Trend ( $p=0,093$ ) vor. Bei der Betrachtung der Proteinase K-denaturierten Kontrolle fiel auf, dass diese bei allen Zelllinien eine etwas geringere Extinktion

aufwies als die unbehandelte Kontrolle. Eine statistische Signifikanz lag hierbei nicht vor ( $p > 0,13$ ). Auffällig war zudem, dass UMUC-3-Zellen in diesen Versuchen eine deutlich geringere Extinktion als die drei anderen NMIBC-Zelllinien aufwiesen.

## 5.2. 3D-Zellkulturmodell

Für die weiteren Untersuchungen des Einflusses von Eap auf Harnblasenkarzinome wurden die NMIBC-Zellen in einem 3D-Zellkulturmodell beobachtet. Dafür wurden Sphäroide aus den vier Zelllinien angefertigt, die ohne Bestandteile der extrazellulären Matrix in einer anti-adhäsiv beschichteten 96-Well-Platte mit Rundböden herangezogen wurden. Die Sphäroide wurden für die nachfolgenden Versuche als einfaches 3D-Modell eines Urothelkarzinoms der Harnblase verwendet, um die Wirkung von Eap auf die Genese des Tumors sowie dessen Streuungsfähigkeit zu analysieren.

### 5.2.1. Auswertung der Querschnittsfläche des Sphäroids

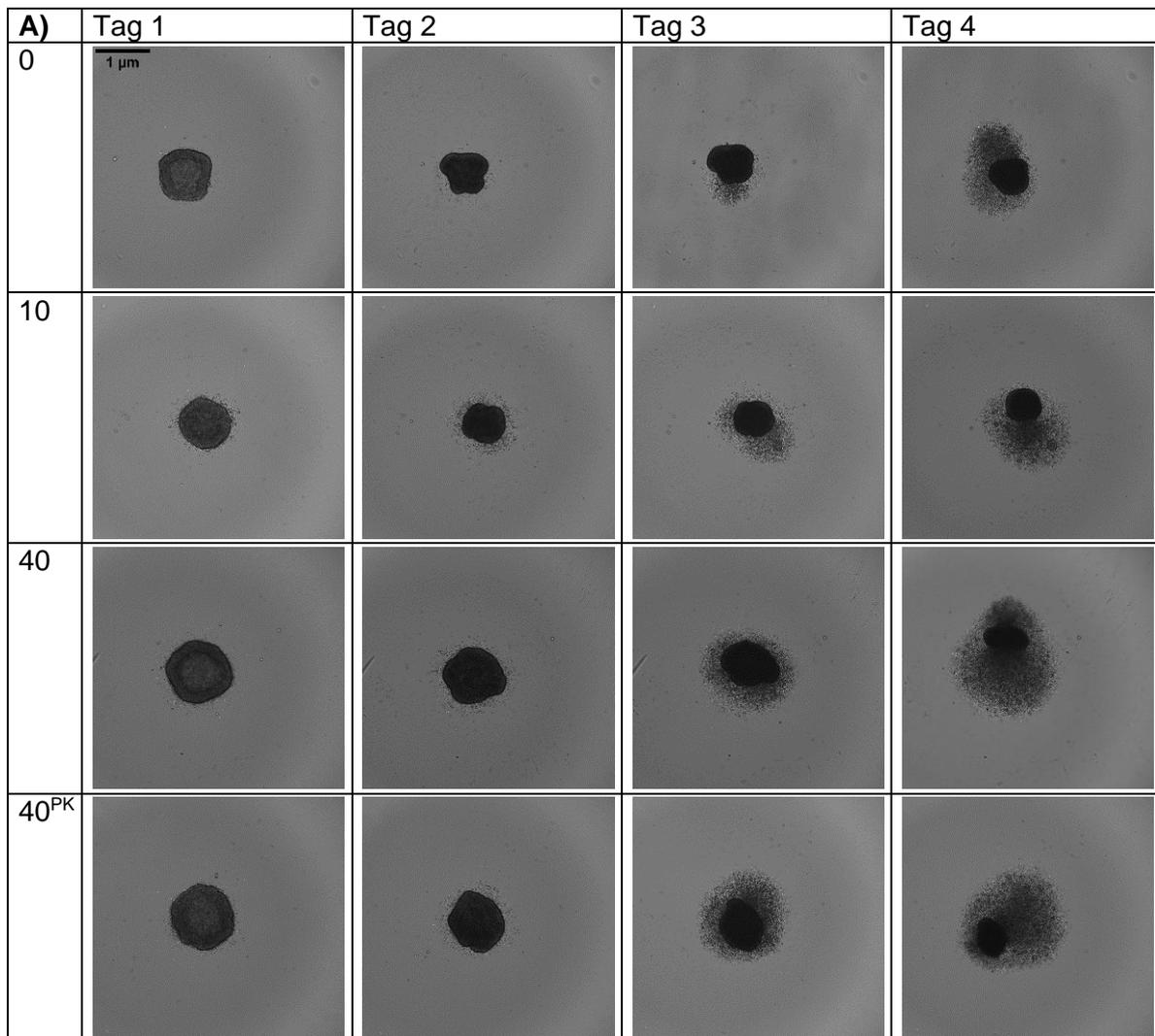
Für die Bildung einer 3D-Struktur benötigen die Zellen zunächst die Fähigkeit, aneinander zu adhären. Um dann in der Größe wachsen zu können müssen diese Zellaggregate dazu in der Lage sein zu proliferieren und Nährstoffe in das Innere des Sphäroids zu transportieren, da sonst ein Absterben der inneren Bereiche des Sphäroids droht. Dieser Versuch diente zunächst dazu die Auswirkungen von Eap auf die Bildung, die Morphologie und den Wachstumsverlauf eines 3D-Tumormodells in der Zellkultur zu untersuchen.

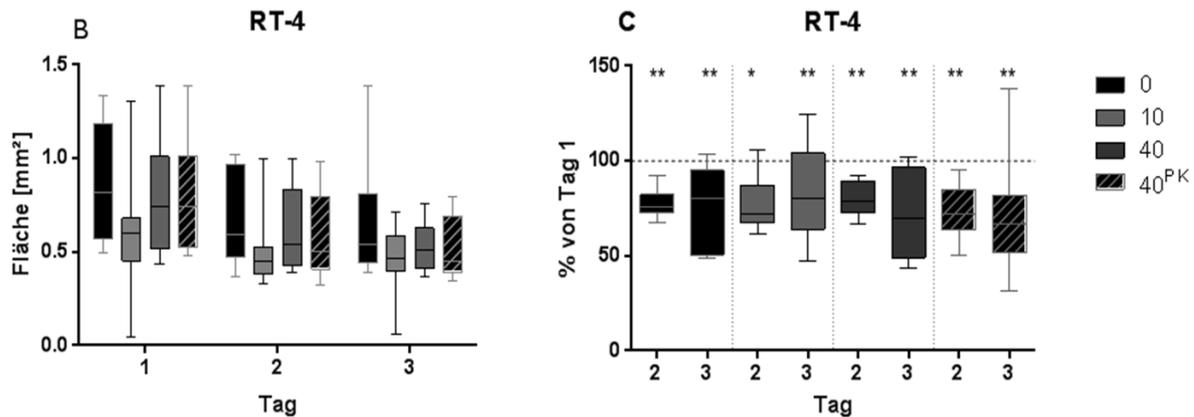
Alle hier verwendeten NMIBC-Zelllinien bildeten bei einer Zellzahl von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml etwa acht Stunden nach der Aussaat in eine anti-adhäsiv beschichtete 96-Well-Platte mit Rundboden ein Sphäroid (Daten hier nicht gezeigt). Diese wurden mit Hilfe des EnSight Multiplatereaders täglich fotografiert. Dabei wurde zuerst experimentell geprüft, dass die Fotoaufnahmen den Querschnitt des Sphäroids an der breitesten Stelle abbilden. Anhand dessen konnte mit Image J die Querschnittsfläche nachgefahren und jedes Sphäroid einzeln in Hinblick auf das jeweilige Volumen ausgewertet werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse jeder Zelllinie nacheinander vorgestellt.

#### 5.2.1.1. RT-4

Die Betrachtung des Sphäroiddurchmessers über vier Tage nach Instillationstherapie zeigte, dass die Zelllinie RT-4 im Vergleich zu den anderen hier getesteten Zelllinien große, kompakte, zu Beginn scharf abgrenzbare Sphäroide bildete, die im Zeitverlauf jedoch signifikant an

Fläche abnehmen (Abb. 9). Unbehandelte RT-4-Zellen bildeten 24 h nach Aussaat unter den gegebenen Bedingungen Sphäroide mit einem mittleren Durchmesser von etwa  $0,88 \pm 0,31$  mm<sup>2</sup> (Abb. 9B). Bei einigen RT-4-Sphäroiden konnte bereits nach drei Tagen teilweise ein Saum aus Einzelzellen um das Sphäroid herum beobachtet werden. Dieser Saum wurde am vierten Tag bei nahezu allen RT-4 Sphäroiden sichtbar, sodass das Sphäroid zum Teil aufgelöst erschien. Die Durchmesser der RT-4 Sphäroide an Tag 4 nach Aussaat wurden deshalb nicht graphisch dargestellt, da bei dem manuellen Nachfahren des Umfangs durch den randständigen Saum der eigentliche Sphäroidrand zum Teil nicht mehr klar abgrenzbar war. An Tag 3 nach Aussaat wiesen die aus den Kontrollzellen gebildeten Sphäroide einen mittleren Durchmesser von  $0,65 \pm 0,29$  mm<sup>2</sup> auf, was, wenn mit den jeweiligen Flächen der Sphäroide an Tag 1 nach Aussaat verglichen, einer prozentualen Abnahme der Fläche von ~25% entspricht (\* $p=0,0024$ , Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).



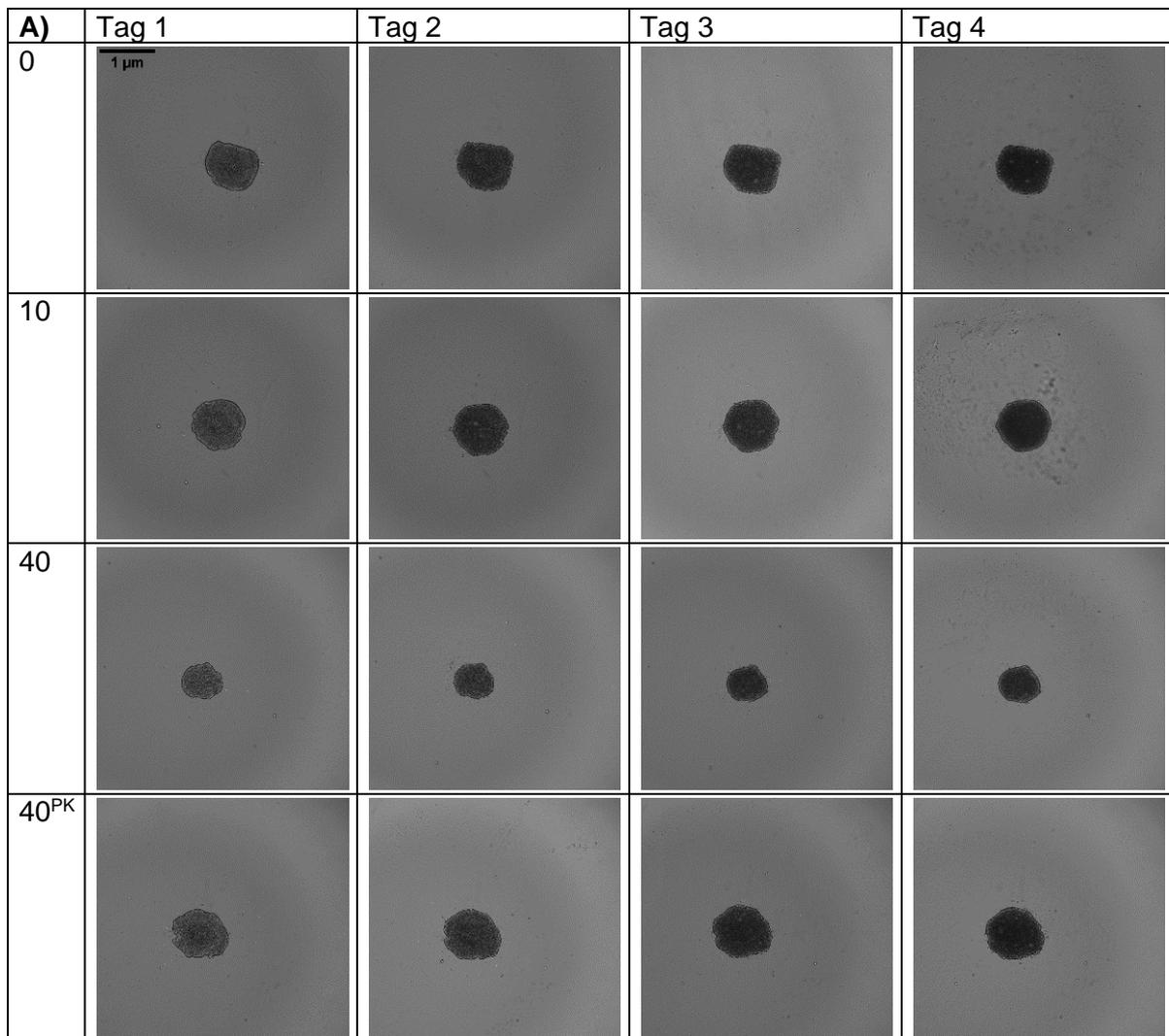


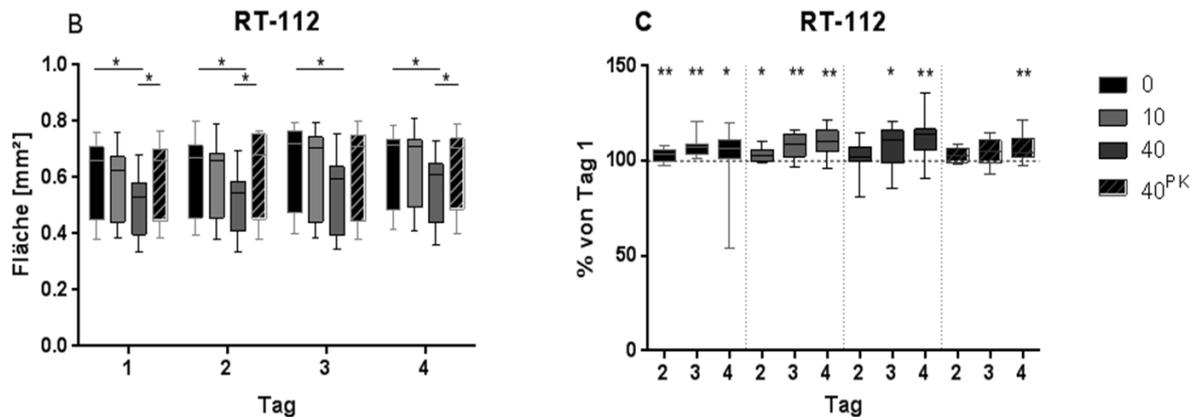
**Abbildung 9: Verlauf der Querschnittsfläche des Sphäroids der Zelllinie RT-4** Die in RPMI1640 und 10% FKS kultivierten Zellen wurden in einer Zellzahl von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml nach der zweistündigen Instillationstherapie in eine 96-Well-Platte mit Rundboden ausgesät. Nach 24, 48, 72 und 96 h wurde je eine Aufnahme pro Well angefertigt. **A:** Dargestellt sind repräsentativ je ein Sphäroid des jeweiligen Ansatzes im Zeitverlauf. **B:** Veränderung der Sphäroidquerschnitte über die Zeit. Es wurden 12 Sphäroide je Ansatz für die Auswertung herangezogen. Die statistische Auswertung der Querschnittsfläche wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests Tests zwischen den Kontrollen und den behandelten Proben durchgeführt. **C:** Relative Querschnittsfläche des Sphäroids normiert auf die Querschnittsfläche des jeweiligen Ansatzes nach 24 h. Diese Daten wurden im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test analysiert ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ). Die Boxplots zeigen den Median mit Interquartilsabstand, die Verlängerung (Antennen) den kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10  $\mu\text{g/ml}$  Eap-behandelter Ansatz, „40“=40  $\mu\text{g/ml}$  Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“= mit 40  $\mu\text{g/ml}$  Eap-behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

Die mittels Instillationstherapie mit Eap bzw. der Proteinase K und hitzeinkativierten Eap Probe behandelten RT-4-Zellen wiesen mehrheitlich eine der unbehandelten Kontrolle vergleichbaren Sphäroidbildungskinetik auf (Abb. 9B). Einzig für die mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Eap vorbehandelten RT-4-Zellsuspensionen konnte 24 h nach Aussaat im Vergleich zur Kontrolle eine tendenziell verminderte Querschnittsfläche der Sphäroide beobachtet werden, die sich jedoch nicht signifikant von den Querschnittsflächen der Kontrolle unterschied ( $p=0,1037$ , Mann-Whitney-U-Test). Wie schon für die Kontrollsphäroide beobachtet, zeigten auch alle Sphäroide der mit Eap bzw. der inaktivierten Eap-Probe behandelten RT-4-Zellen eine signifikante Größenabnahme über den Zeitverlauf (Abb. 9C,  $p < 0,05$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Ein klarer Einfluss von Eap auf die Größenentwicklung der RT-4 Sphäroide war in diesem Versuch damit nicht zu erkennen. Die Bildung der Zellsäume um die Sphäroide über die Zeit legen jedoch nahe, dass die Größenabnahme der Sphäroide über die Zeit auf das Herauslösen von Zellen aus dem Sphäroid zurückzuführen ist. Warum sich diese Zellsäume um die Sphäroide der RT-4 Zellen über die Zeit bildeten, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht eruiert werden.

## 5.2.1.2. RT-112

Unbehandelte Zellsuspensionen der Zelllinie RT-112 bildeten, ähnlich wie RT-4, 24 h nach Aussaat rundliche, kompakte Sphäroide mit einer mittleren Querschnittsfläche von  $0,61 \pm 0,14 \text{ mm}^2$  (Abb. 10). Anders als bei den RT-4-Sphäroiden zeigte sich bei den Sphäroiden der Zelllinie RT-112 über die Zeit aber eine kleine, signifikante Zunahme der Querschnittsflächen (Abb. 10C), die mit einer Farbveränderung der Sphäroide über die Zeit einherging (Abb. 10A). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Sphäroide dieser Zelllinie über die Zeit an Masse und Dichte zunehmen, auch wenn anhand der verfügbaren Daten nicht ausgeschlossen werden kann, dass die beobachteten Farbveränderungen der Sphäroide über die Zeit eventuell auf eine erhöhte Pigmentproduktion zurückzuführen sind.





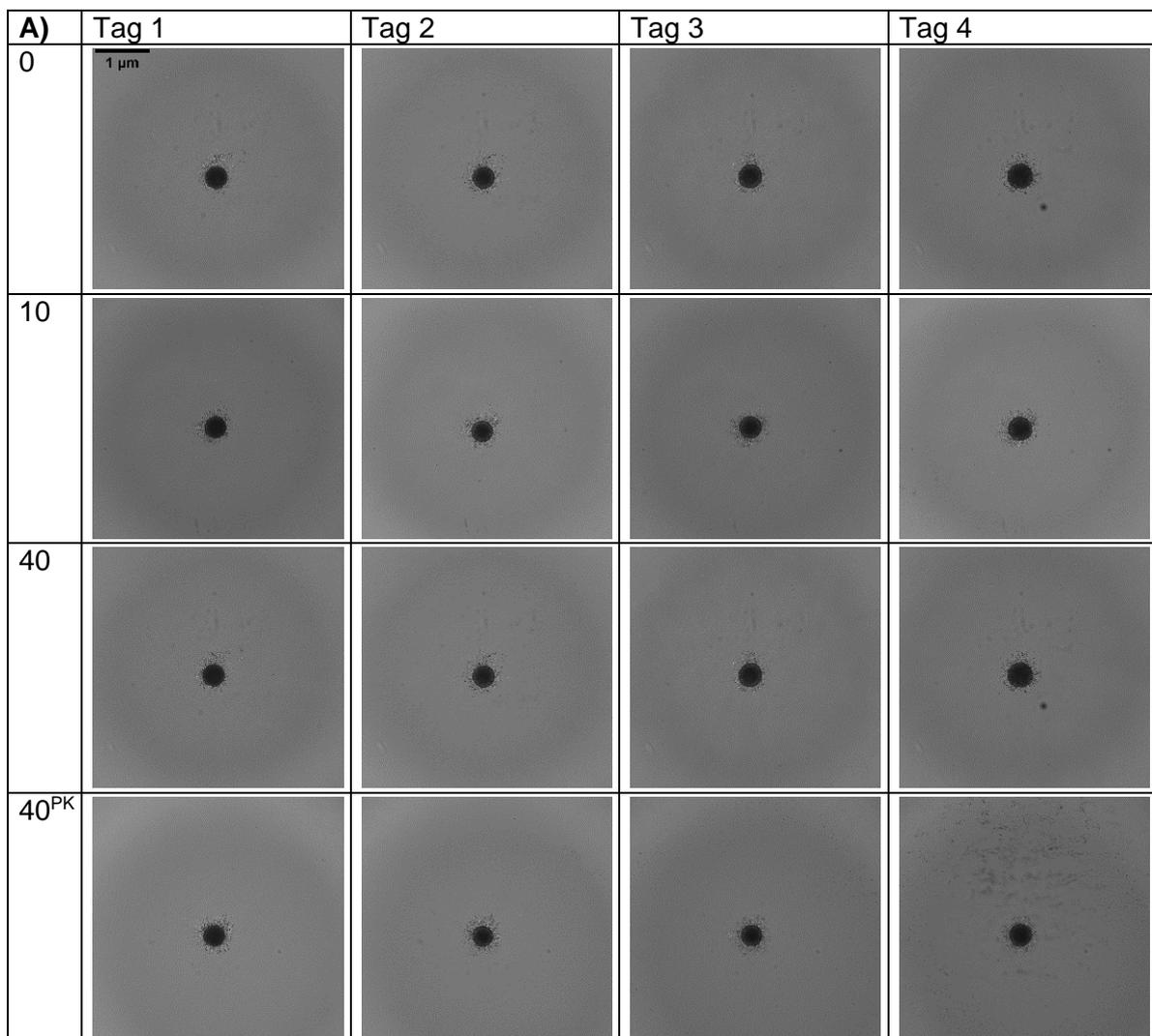
**Abbildung 10: Verlauf der Querschnittsfläche des Sphäroids der Zelllinie RT-112.** Die RT-112-Zellen wurden in RPMI1640-Medium und 10% FKS kultiviert und bei einer Zellzahl von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml dem *in vitro* Instillationsmodell mit vier verschiedenen Eap-Konzentrationen zugeführt. Anschließend wurden sie auf einer 96-Well-Rundbodenplatte ausgesät und nach 24, 48, 72 und 96 h je eine Fotodokumentation pro Well mit Hilfe des EnSight Multiplaterereaders durchgeführt. **A:** Dargestellt sind repräsentativ je ein Sphäroid des jeweiligen Ansatzes im Zeitverlauf. **B:** Veränderung der Sphäroidquerschnitte über die Zeit. Für die statistische Auswertung wurde der Versuch zunächst 12 Mal wiederholt und die Querschnittsfläche jedes Sphäroids manuell mittels Image J vermessen. Aus den erhobenen Messwerten wurde der dargestellte Boxplot entworfen und alle Ansätze gegeneinander im Mann-Whitney-U-Test ( $*p < 0,05$ ) analysiert. **C:** Relative Querschnittsfläche des Sphäroids normiert auf die Querschnittsfläche des jeweiligen Ansatzes nach 24 h. Diese Daten wurden im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test analysiert ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ). Die Boxplots zeigen den Median mit Interquartilsabstand, die Verlängerung (Antennen) den kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40“=40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“= mit 40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

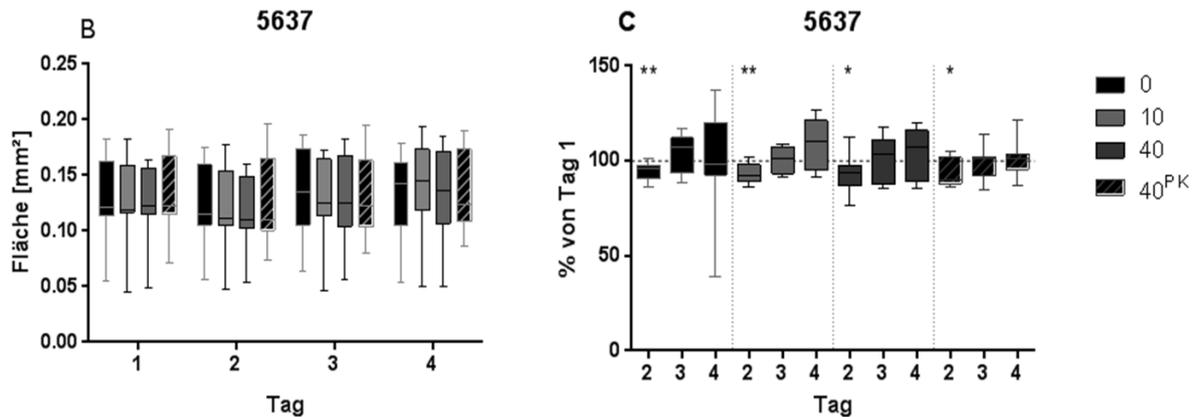
Im Unterschied zu RT-4-Sphäroiden war bei den unbehandelten RT-112-Sphäroiden vier Tage nach Aussaat kein Saum an Zellen um das Sphäroid herum sichtbar (Abb. 10A). Ähnliche Verläufe der Sphäroidbildungskinetik, Querschnittsveränderung und Farbverläufe über die Zeit konnten auch für RT-112-Zellsuspensionen, die mit 10 µg/ml Eap bzw. mit Proteinase K und Hitze-inaktiviertem Eap vorbehandelt wurden, beobachtet werden. RT-112-Zellsuspensionen, die hingegen einer Instillationstherapie mit 40 µg/ml Eap unterzogen worden waren, bildeten 24 h nach Aussaat im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant kleinere Sphäroide mit einem mittleren Querschnittsfläche von  $0,51 \pm 0,11$  mm<sup>2</sup> (Abb. 10B), die über den Zeitverlauf gesehen aber, ähnlich wie die Kontrollsphäroide, an Größe zunahm (Abb. 10C). Auch der Vergleich von mit denaturiertem Eap-behandelten Sphäroiden und mit 40 µg/ml Eap-behandelten Sphäroiden ergab, dass an Tag 1, 2 und 4 die mit Eap vorinkubierten Zellsuspensionen signifikant kleinere Sphäroide bildeten, als die zweite Kontrolle. (Tag 1:  $*p = 0,02$ ; Tag 2:  $*p = 0,02$ ; Tag 3:  $p = 0,058$ ; Tag 4:  $*p = 0,02$ , Mann-Whitney-U-Test). Diese Befunde belegen, dass nach einer Behandlung von RT-112-Zellen mit 40 µg/ml Eap, signifikant kleinere Sphäroide gebildet werden als von reiner Zellsuspension oder von mit denaturiertem Eap vorbehandelten Zellsuspensionen. Nach einer zweistündigen Inkubation mit 10 µg/ml Eap fiel dieser Effekt im Vergleich zu den Kontrollen deutlich geringer aus,

weshalb von einer dosisabhängigen Größenreduktion von Eap auf die Bildung von Sphäroiden der Zelllinie RT-112 gesprochen werden kann.

### 5.2.1.3. 5637

Die Zellsuspensionen der Zelllinie 5637 entwickelten, trotz der für alle Zelllinien gleich eingestellten Zellzahl von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml, mit einer mittleren Querschnittsfläche von  $0,12 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ , an der Querschnittsfläche bemessen, deutlich kleinere Sphäroide, welche ein fast symmetrisch-rundliches Erscheinungsbild hatten (Abb. 11A). Des Weiteren hatte sich um diese Sphäroide herum schon 24 h nach Aussaat ein kleiner Saum an Zellen gebildet, der über die Zeit aber nicht markant zunahm.



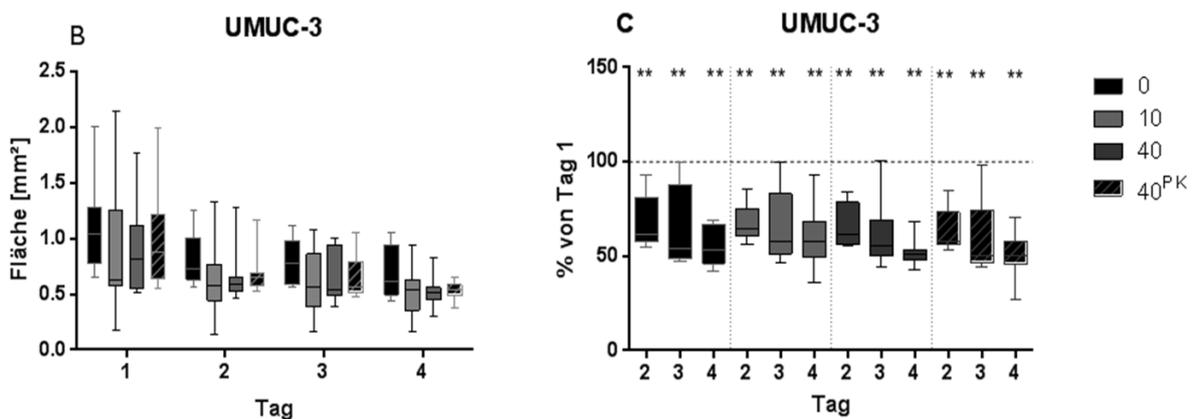
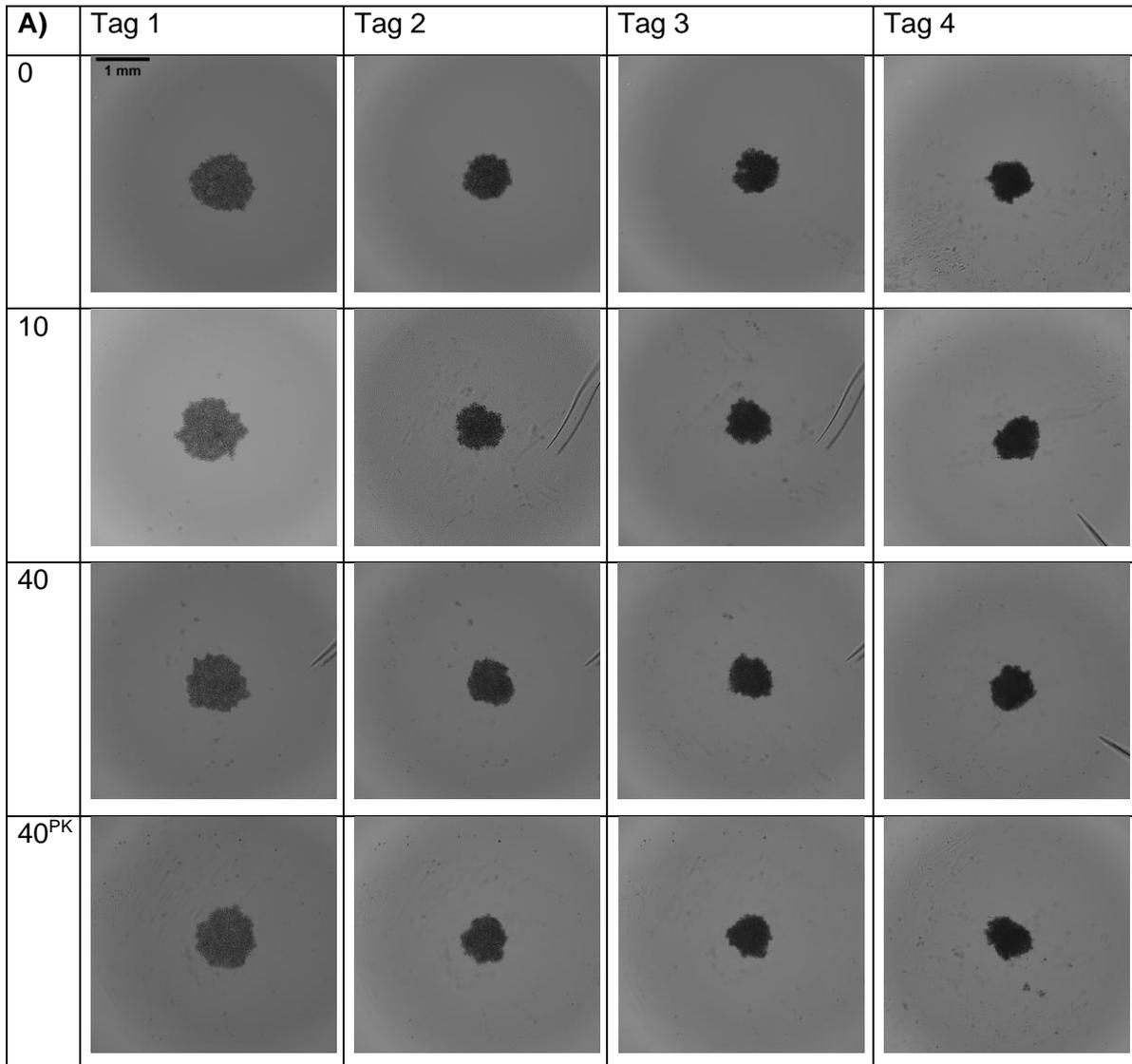


**Abbildung 11: Verlauf der Querschnittsfläche des Sphäroids der Zelllinie 5637.** Nach der *in vitro* Instillationstherapie mit einer Zellsuspension von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml in RPMI-Medium versetzt mit 10% FKS wurden die 5637-Zellen auf eine 96-Well-Platte mit Rundboden ausgesät. Die Sphäroide wurden jeden Tag mittels Kaleido fotodokumentiert. **A:** Dargestellt sind repräsentativ je ein Sphäroid des jeweiligen Ansatzes im Zeitverlauf. **B:** Veränderung der Sphäroidquerschnitte über die Zeit. Mittels des Programmes Image J wurden die Querschnittsflächen vermessen, die hier in Form von Boxplots dargestellt sind. Zudem wurden die Daten statistisch im Mann-Whitney-U-Test analysiert. **C:** Relative Querschnittsfläche des Sphäroids normiert auf die Querschnittsfläche des jeweiligen Ansatzes nach 24 h. Hier wurde die Analyse mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ). Die Boxplots zeigen den Median mit Interquartilsabstand, die Verlängerung (Antennen) den kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40“=40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“= mit 40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

Im Zeitverlauf waren diese Sphäroide weitestgehend größenkonstant und wiesen innerhalb der vier unterschiedlich vorbehandelten Ansätze keine markanten Unterschiede auf (Abb. 11B). Wurden hingegen die Flächenquerschnitte der Sphäroide über die Zeit mit den jeweiligen Flächenquerschnitten der 24 h nach Aussaat gebildeten Sphäroide verglichen, so wiesen die Sphäroide aller vier Gruppen zwischen Tag 1 und 2 eine geringe, aber signifikante Abnahme der Querschnittsfläche auf (Abb. 11C). Diese transiente Größenabnahme war aber bereits an Tag 3 nach Aussaat nicht mehr erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt hatten alle Ansätze wieder Flächenquerschnitte in der Größenordnung des 24 h nach Aussaat gebildeten Sphäroids. Auch an Tag 4 blieben die Sphäroide, unabhängig von der vorausgegangenen Therapie, größenkonstant. Diese Befunde legen nahe, dass eine Eap Instillationstherapie keinen relevanten Einfluss auf die Sphäroidbildungsfähigkeit dieser Zelllinie hatte.

#### 5.2.1.4. UMUC-3

Die 24 h nach Aussaat gebildeten Sphäroide der Zelllinie UMUC-3 zeigten, anders als die zuvor beschriebenen Sphäroide, eine unscharfe Begrenzung (Abb. 12). Optisch präsentierten sich diese am ehesten als ein Haufen locker neben- und aufeinanderliegender Zellen, der den Sphäroiden ein inhomogenes Erscheinungsbild verlieh und ihre Oberfläche uneben erscheinen ließ (Abb. 12A).



**Abbildung 12: Verlauf der Querschnittsfläche des Sphäroids der Zelllinie UMUC-3.** Die Anzucht der UMUC-3-Sphäroide erfolgte bei einer Zellzahl von  $1,5 \cdot 10^5/\text{ml}$  in DMEM und 10% FKS auf einer 96-Well-Rundbodenplatte. Für die Auswertung wurden 12 Wiederholungen je Ansatz herangezogen. **A:** Dargestellt sind repräsentativ je ein Sphäroid des jeweiligen Ansatzes im Zeitverlauf. **B:** Veränderung der Sphäroidquerschnitte über die Zeit. Die statistische Testung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. **C:** Relative Querschnittsfläche des Sphäroids normiert auf die Querschnittsfläche des jeweiligen Ansatzes nach 24 h. Die normierten Daten wurden im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ausgewertet ( $**p < 0,01$ ). Die Boxplots zeigen den Median mit Interquartilsabstand, die Verlängerung (Antennen) den

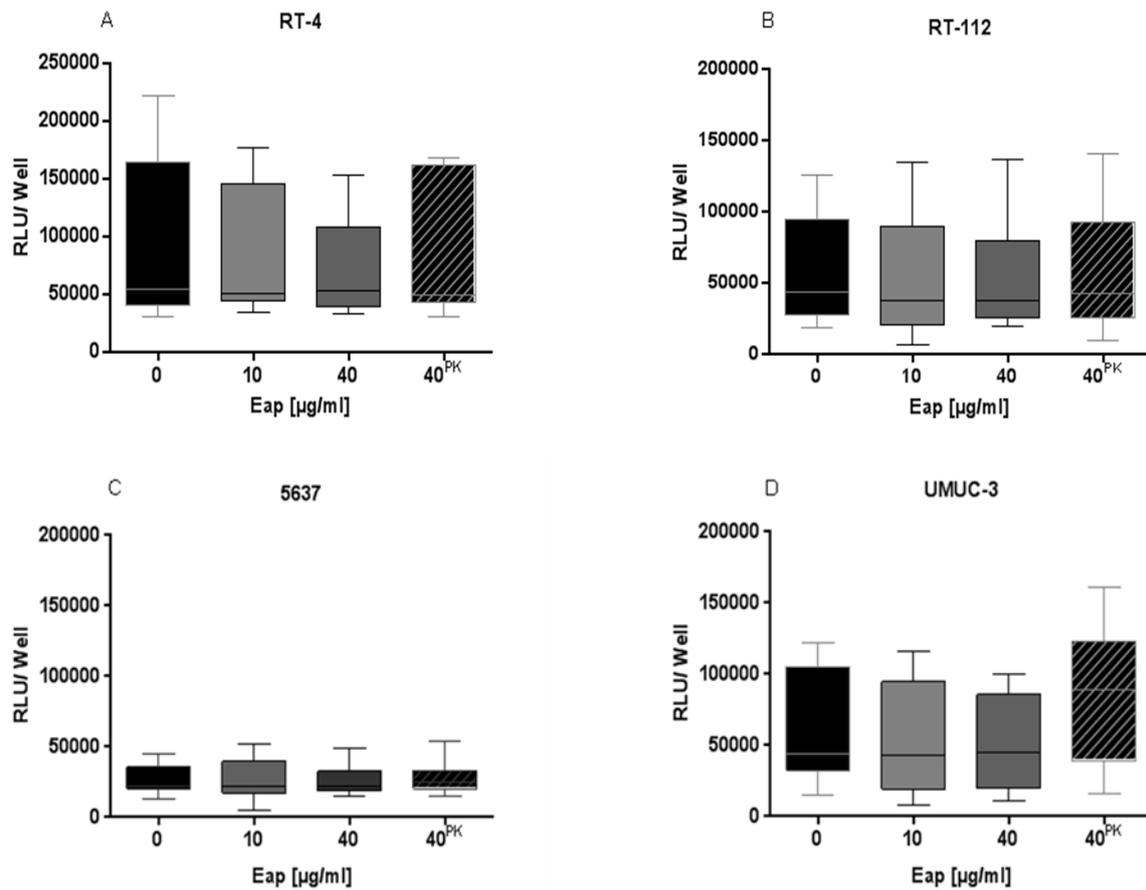
kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40“=40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“= mit 40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

Die von unbehandelten UMUC-3-Zellen gebildeten Sphäroide wiesen am ersten Tag nach Aussaat die größten mittleren Querschnittsflächen aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Sphäroide auf ( $1,14 \pm 0,44 \text{ mm}^2$ ). Ähnlich wie für die Sphäroide der Zelllinie RT-4 beobachtet, konnte auch bei den Sphäroiden von UMUC-3 im Zeitverlauf eine Größenabnahme festgestellt werden (Abb. 12B). Im zeitlichen Verlauf verloren die Sphäroide aller Ansätze kontinuierlich an Querschnittsfläche, sodass diese an Tag 4 nach Aussaat für die unbehandelte Kontrolle noch  $0,59 \pm 0,13 \text{ mm}^2$  betrug. Die einzelnen Ansätze unterschieden sich dabei weder optisch noch statistisch anhand ihrer Morphologie oder Querschnittsfläche über den Zeitverlauf, weshalb davon ausgegangen werden darf, dass die Bildung von UMUC-3-Sphäroiden nicht durch Eap beeinflusst wird. Wurden die Messwerte auf die Größe nach 24 h normiert, wird auch hier deutlich, dass die UMUC-3-Sphäroide jeden Tag signifikant an Größe abnahmen (Abb. 12C). Analog dazu erschienen diese Sphäroide optisch als dunklere und in sich kompaktere Zellaggregate, was die Vermutung nahelegt, dass UMUC-3-Zellen eine möglicherweise langsamere Sphäroidbildungskinetik als die anderen hier getesteten Zelllinien aufweisen. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass, anders als bei RT-4 Sphäroiden beobachtet, kein klarer Saum an Zellen um die UMUC-3 Sphäroide über die Zeit sichtbar wurde, der die beobachtete Flächenabnahme erklären könnte.

### 5.2.2. ATPLite 3D-Assay

Dieser Assay sollte Aufschluss über einen möglichen, von Eap ausgehenden zytostatischen bzw. zytotoxischen Effekt auf Sphäroide geben. Der Versuch basierte auf einer ATP-abhängigen Reaktion, bei der Lumineszenz emittiert wurde. Dafür wurden die Sphäroide zunächst lysiert, um das intrazelluläre ATP freizusetzen. Anschließend wurde eine Luciferase-katalysierte Reaktion ausgelöst, bei der unter Verbrauch von ATP Lumineszenz emittiert wurde. Die Emission konnte quantitativ durch den EnSight Multiplaterereader erfasst werden und steht somit im direkten Bezug zu dem intrazellulären ATP-Gehalt, welcher die Stoffwechselaktivität und Energieversorgung des Zellverbandes innerhalb des Sphäroids widerspiegelt (vgl. Abschnitt 4.2.3.2.). Dafür wurden die vier Ansätze jeder Zelllinie bei einer Zellzahl von  $5 \cdot 10^4/\text{ml}$  zunächst in dem beschriebenen *in vitro* Instillationsmodell mit aufsteigenden Eap-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurden die NMIBC-Zellen auf eine anti-adhäsiv beschichtete 96-Well-Platte mit Rundboden ausgesät und für 24 h als Sphäroid angezüchtet. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da in den 2D-Zellkulturen von RT-112 und 5637 24 h nach der *in vitro* Instillationstherapie zum Teil inhibitorische Effekte von Eap auf

die Replikation oder metabolische Aktivität der Zellkulturen sichtbar waren. Im Anschluss erfolgte die Durchführung des ATPLite 3D-Assays mit der Lyse der Sphäroide. Hierbei wurde mikroskopisch sichergestellt, dass durch Zugabe des Natriumhydroxid-basierten Lysepuffers das gesamte Sphäroid lysiert wurde.



**Abbildung 13: Bestimmung der ATP-Mengen in Sphäroiden 24 h nach Aussaat.** Die mit unterschiedlichen Eap-Konzentrationen vorbehandelten Zellen wurden mit einer Zellzahl von  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml in einer beschichteten 96-Well-Rundbodenplatte in RPMI bzw. DMEM mit 10% FKS ausgesät. Die sich nach 24 h gebildeten Sphäroide wurden anschließend dem ATPLite 3D-Assay nach Herstellerangaben unterzogen, um die relativen ATP-Mengen der Sphäroide anhand des Luciferase-Luciferin vermittelten Lumineszenzsignals zu ermitteln. Jeder Ansatz wurde für die Erstellung der dargestellten Boxplots 12 Mal wiederholt. Die erhobenen Daten wurden im Man-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Ansätze getestet. Die Boxplots zeigen den Median mit Interquartilsabstand der erhaltenen RLU pro Well, die Verlängerung (Antennen) den kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40“=40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“=mit 40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

Die 24 h alten Sphäroide der Zelllinie RT-4 (Abb. 13A) zeigten mit  $95.615 \pm 68.121$  RLU/Well die höchsten Lumineszenzwerte der in dieser Arbeit getesteten Zelllinien, wiesen zugleich aber auch die höchste Streuung der Messwerte auf. Sphäroide der Zelllinien RT-112 (Abb. 13B) und UMUC-3 (Abb. 13D) wiesen 24 h nach Aussaat im Mittel  $58.997 \pm 38.096$  RLU/Well und  $66.007 \pm 39.940$  RLU/Well auf. Die in ihrer Querschnittsfläche kleinsten Sphäroide der

Zelllinie 5637 (Abb. 13C) emittierten im Vergleich zu den anderen Zelllinien mit durchschnittlich  $26.717 \pm 9.695$  RLU/Well deutlich weniger Licht. Korreliert man die Lumineszenzwerte der Sphäroide mit den jeweiligen Querschnittsflächen, so zeichnet sich ab, dass einen Tag nach der Instillationstherapie und Aussaat der Zellen die Größe des Sphäroids mit der intrazellulären ATP-Konzentration korreliert. Es kann anhand des Assays jedoch nicht darauf zurückgeschlossen werden, ob die Sphäroide eine höhere Zellzahl aufwiesen oder aber deren Stoffwechselaktivität erhöht war. Vergleicht man die für die unbehandelten Kontrollen erhaltenen Lumineszenzwerte mit den Lumineszenzwerten, die aus den Eap-behandelten Zellverbänden gemessen wurden, so zeigte sich für keine der untersuchten Zelllinien ein klarer Unterschied. Selbst die Eap-sensiblen Sphäroide der Zelllinie RT-112, die nach einer Vorbehandlung der Zellen mit  $40 \mu\text{g/ml}$  Eap signifikant kleinere Sphäroide als die Kontrollen bildeten, wiesen hier keine signifikante Veränderung in Hinblick auf das mittlere Lumineszenzsignal und damit auf den ATP-Gehalt des Sphäroids auf.

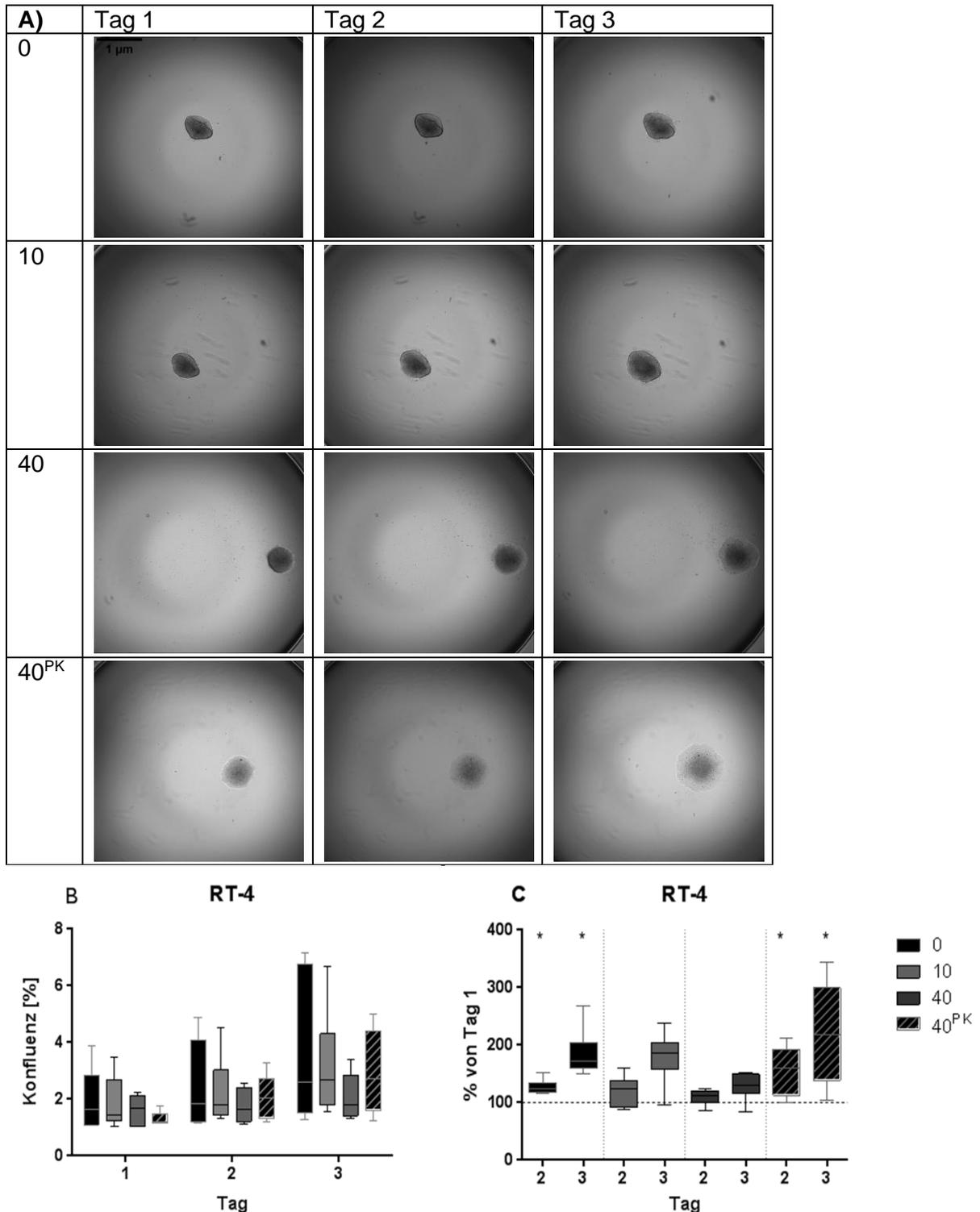
### 5.2.3. Wiederaussaat der Sphäroide

In dieser Versuchsreihe sollte ein Prognose-bestimmender Schritt bei der Entstehung eines Tumorrezidivs simuliert und die Wirkung von Eap auf jenen untersucht werden. Dafür wurden, anders als in den vorherigen Versuchsreihen, bereits 24 h herangewachsene Sphäroide, die den Residualtumor nach einer transurethralen Resektion der Harnblase (TURB) simulieren sollten, einer *in vitro* Instillationstherapie unterzogen. Nach der zweistündigen Therapie wurde dann das komplette Medium des Sphäroids mitsamt des Instillationstherapeutikums entfernt. Anschließend wurden die behandelten Sphäroide auf eine Flachbodenplatte umgesetzt, welches die Blasenwand imitieren sollte. Auf einer fotografischen Kontrolle nach Umsetzen der Sphäroide war ersichtlich, dass die Struktur der Sphäroide nach dem Umsetzen nahezu erhalten blieb. Abgesehen von der Zelllinie UMUC-3, die nach dem Umsetzen leicht aufgelockert erschien, waren die Sphäroide nach dem Transfer in das Flachboden-Well unverändert zu der Situation im Rundboden-Well (vgl. Anhang 1 und 2). Die sich aus dem Sphäroid herauslösenden Tumorzellen readhärierten in der Folge an den Plattenboden und imitierten damit ein sich bildendes NMIBC-Rezidiv aus einem Residualtumor nach TURB. Nach dem Transfer der Sphäroide in die Flachbodenplatte erfolgte nach 24, 48 und 72 h die Beurteilung des Auswachsens der Tumorzellen aus der Sphäroidformation mit dem EnSight Multiplaterereader. Neben einer Fotoaufnahme jedes Wells wurde über das Datenakquise- und Auswertungsprogramm Kaleido auch der prozentuale Anteil des Well-Bodens, der mit Zellen bewachsen war, ermittelt. Anhand dessen wurden sechs Einzelwerte für jeden Ansatz erhoben, die einer statistischen Analyse unterzogen wurden. Eine hohe technische Herausforderung des Versuches bestand darin, den Sphäroid als intakten Zellverband in ein

Well der Flachbodenplatte zu transferieren und diesen möglichst mittig auf den Well-Boden zu platzieren. Trotz größter Sorgfalt wuchs ein relevanter Teil der transferierten Sphäroide am Well-Rand an, lag außerhalb des Messbereiches von Kaleido und war damit nicht mehr für die Auswertung verfügbar. Diese Sphäroide flossen nicht in die Auswertung mit ein, sodass alle hier gewerteten Sphäroide mittig auf dem Well herangewachsen waren.

#### 5.2.3.1. RT-4

Die RT-4-Zellen, die aus einem differenzierten G1-Tumor entstammen, wuchsen kaum aus ihrer Sphäroidformation heraus. Auch nach 72 h war die rundliche Silhouette des Sphäroids noch erkennbar (Abb. 14A). Optisch ließ sich in dem in Abb. 14A gezeigten Wachstumsverlauf ein deutlich größerer Saum um den mit 40 µg/ml Eap-behandelten Sphäroiden vor allem an Tag 3 erkennen. Dieser lag bei der Kontrolle und bei dem mit 10 µg/ml Eap-behandelten Sphäroid reduzierter vor. Bei der Betrachtung von Aufnahmen anderer Auswertungszeitpunkte der Zelllinie RT-4 entstand dieser Eindruck wiederholt. Kontrovers war dabei, dass der Ansatz, bei dem Eap mit Proteinase K- und Hitze denaturiert wurde, in einigen Ansätzen ebenfalls einen ausgeprägten Saum zeigte.



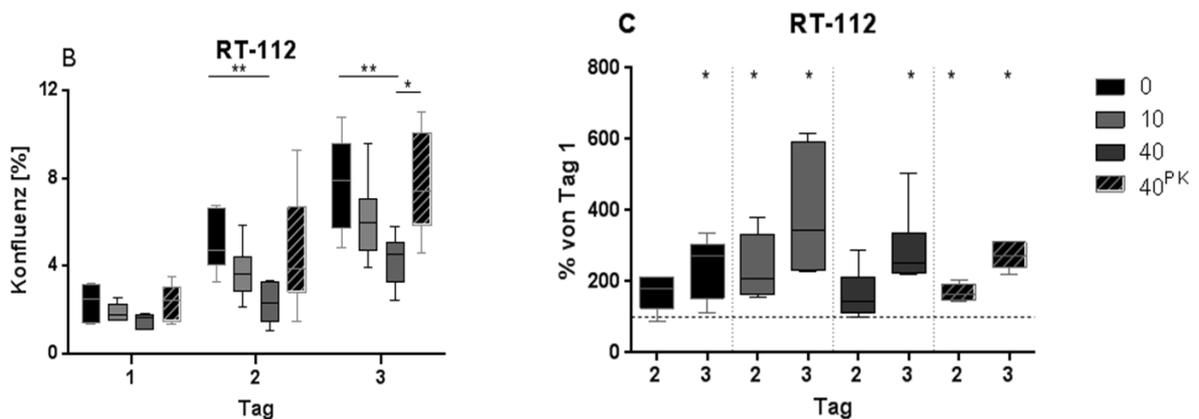
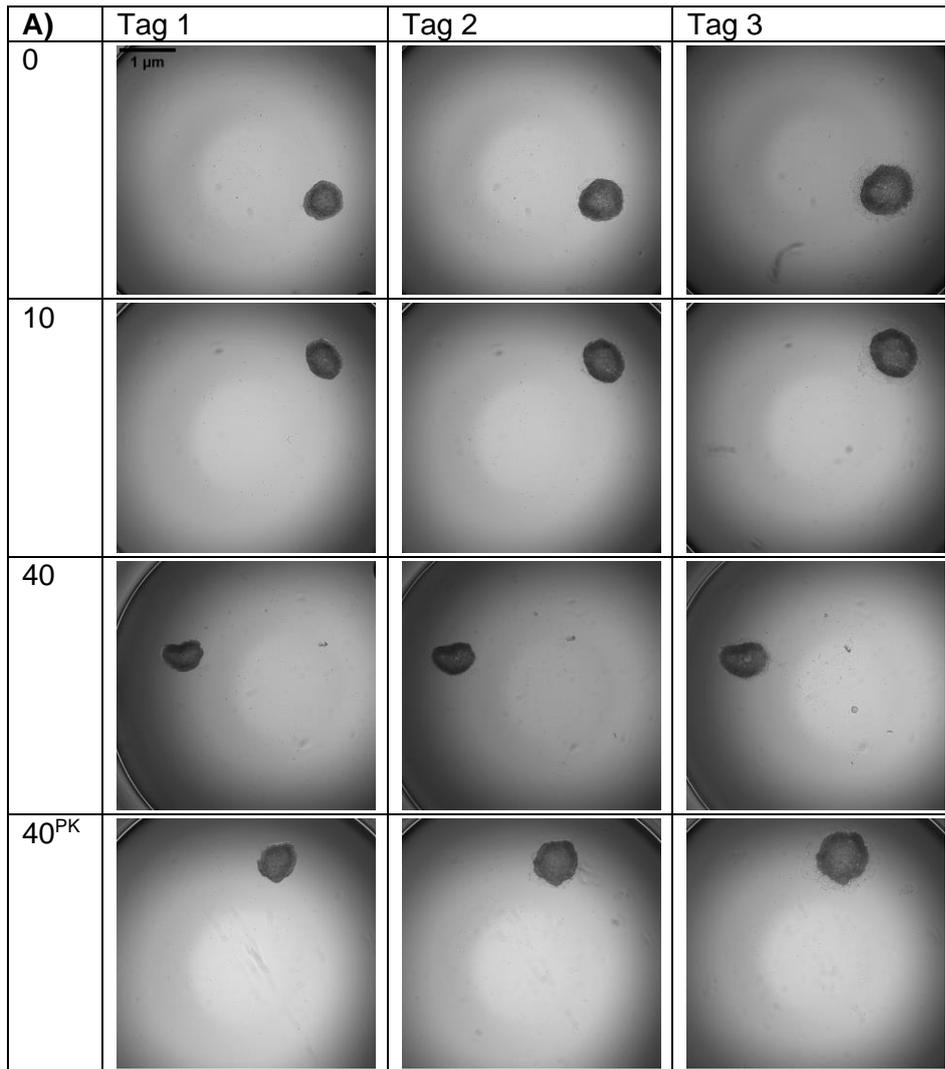
**Abbildung 14: Flächenzunahme der transferierten RT-4-Sphäroide über die Zeit.** Die in RPMI-Medium und FKS kultivierten RT-4-Sphäroide (Zellzahl  $1,5 \cdot 10^5/\text{ml}$ ) wurden 24 h nach ihrer Anzucht einer zweistündigen Instillationstherapie unterzogen und anschließend auf eine 96-Well-Platte mit Flachboden umgesetzt. Dort wurden diese für drei Tage beobachtet. **A:** Repräsentativ ist je ein auswachsendes Sphäroid im Zeitverlauf dargestellt. **B:** Zusätzlich wurde über das Programm Kaleido der prozentuale Anteil des Wells, der auf der Aufnahme bewachsen war, ermittelt. Es wurden 6 Sphäroide je Ansatz für die Auswertung herangezogen. Die Signifikanzlevel zwischen Kontrolle und mit Eap behandelten Proben wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **C:** Prozentuale Veränderung der bewachsenen Areale über die Zeit in Relation zur jeweiligen bewachsenen Fläche an Tag 1 in Prozent. Hier erfolgte die Analyse der relativen Bewuchsflächen der Sphäroide an Tag 2 und 3 in Relation zu Tag 1 mithilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ( $*p < 0,05$ ). Die Boxplots zeigen den

Median mit Interquartilsabstand, die Verlängerung (Antennen) den kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40“=40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“= mit 40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

Ein signifikanter Unterschied der prozentual bewachsenen Fläche zwischen den Kontrollen und den mit Eap inkubierten Sphäroiden war zu keinem Zeitpunkt feststellbar. Allerdings waren die mit 40 µg/ml Eap therapierten Sphäroide an Tag 3 trendmäßig kleiner als die unbehandelten Sphäroide ( $p=0,093$ ). Außerdem fiel bei der Betrachtung des Wachstumsverlaufs in Abbildung 14B bereits auf, dass der Median von drei Ansätzen (0,10,40<sup>PK</sup>) an Tag 2 und 3 höher lag als an Tag 1. Bei dem mit 40 µg/ml behandeltem Ansatz war dies nicht in gleichem Maße festzustellen. Darum wurde eine weitere Graphik erstellt, bei der die erhobenen Messwerte jedes Sphäroids auf den Wert 24 h nach Aussaat normiert wurden (Abb. 14C). Hier lässt sich erkennen, dass sich die beiden Kontrollen in Bezug auf die Fläche nach 24 h signifikant ausdehnten. Bei den mit Eap-vorbehandelten RT-4-Zellen konnte dies nicht in gleichem Maße beobachtet werden. Vor allem bei den mit 40 µg/ml Eap-behandelten Sphäroiden war an Tag 3 im Mittel nur eine Vergrößerung der Fläche um 25% zu beobachten, während die Flächen der Kontrollen an Tag 3 im Mittel um 85% und 120% im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert nach 24 h zunahmen (Abb. 14C). Diese Werte legen nahe, dass Eap in hoher Konzentration das Auswachsen von Zellen aus dem Tumorverband zu reduzieren vermag.

### 5.2.3.2. RT-112

Bei der Beobachtung der umgesetzten Sphäroide der Zelllinie RT-112 zeigte sich im Zeitverlauf ein eher geringes Auswachsen von Zellen (Abb. 15A). Erst am dritten Tag war bei der Kontrolle ein größerer Saum aus einzelnen Zellen erkennbar. Gleichzeitig wurde die Querschnittsfläche des ehemaligen Sphäroids größer und das Zentrum wirkte aufgelockert. Einige Zellen waren zu diesem Zeitpunkt schon mehrere Millimeter von dem ursprünglichen Ansatzpunkt des Sphäroids entfernt (Abb. 15A).



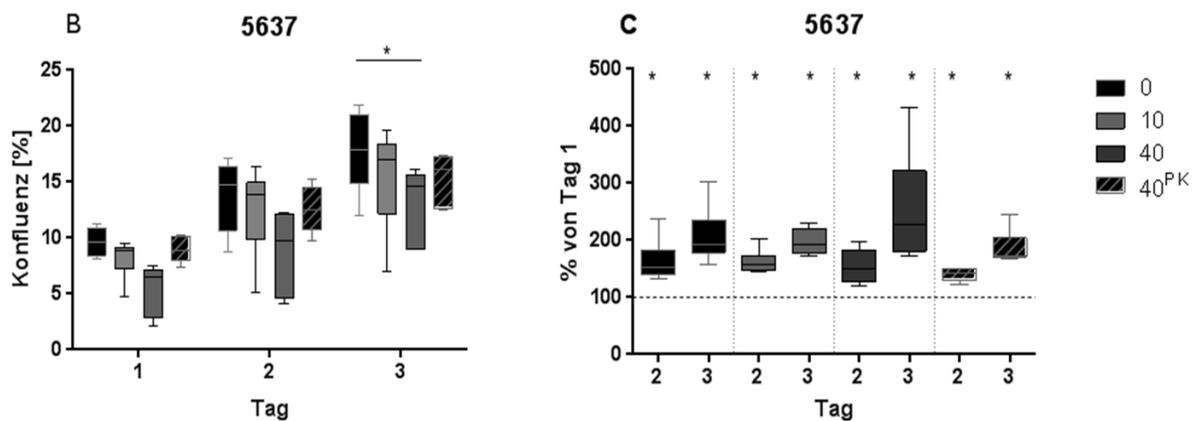
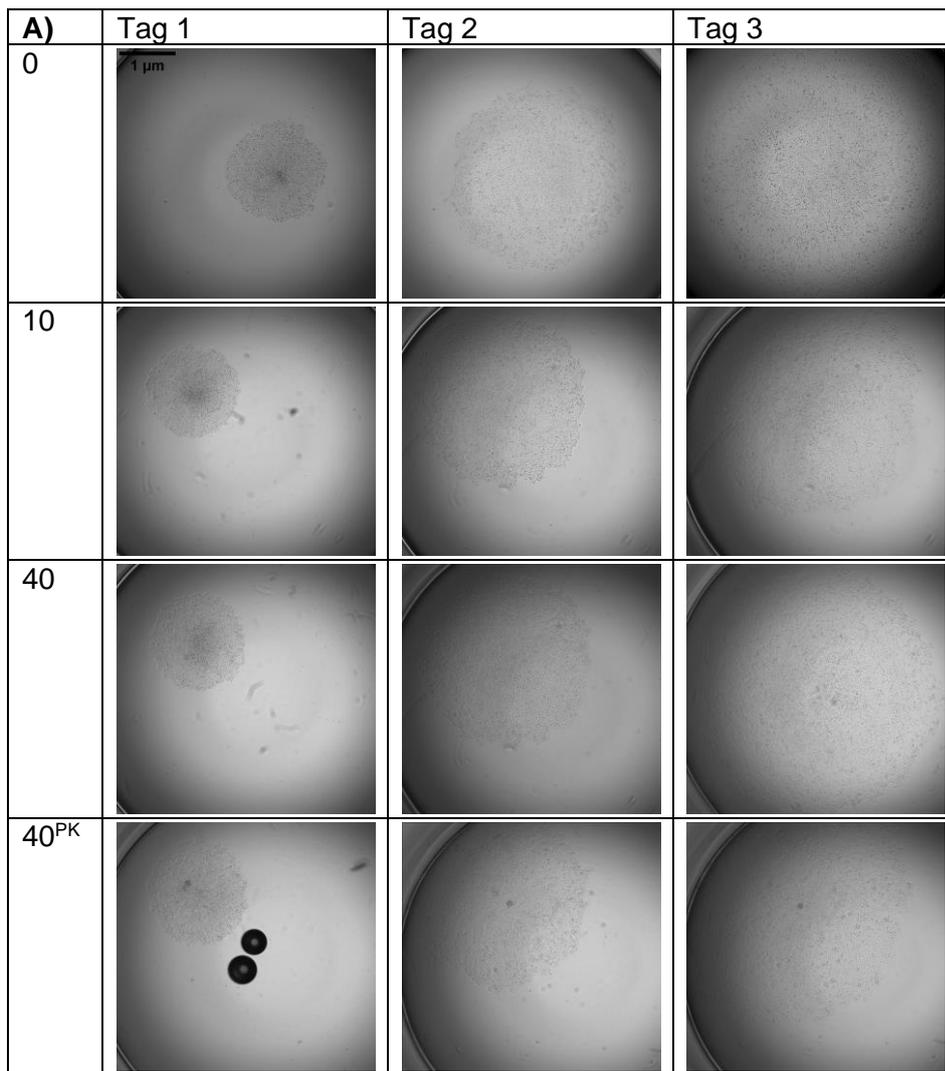
**Abbildung 15: Flächenzunahme der transferierten RT-112-Sphäroide über die Zeit.** Die in RPMI-Medium und 10% FKS kultivierten RT-112 Zellen wurden nach Umsetzen des 24 h alten Sphäroids (Zellzahl  $1,5 \cdot 10^5/\text{ml}$ ), der einer zweistündigen Instillationstherapie unterzogen worden war, auf einer 96-Well-Platte mit Flachboden für drei Tage beobachtet. **A:** Repräsentativ ist je ein ausgewachsenes Sphäroid im Zeitverlauf dargestellt. **B:** Zusätzlich wurde über das Programm Kaleido der prozentuale Anteil des Wells, der auf der Aufnahme bewachsen war, ermittelt. Die Signifikanzlevel zwischen Kontrolle und mit Eap behandelten Proben wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Test ermittelt (\*\* $p < 0,01$ ). **C:** Prozentuale Veränderung der bewachsenen Areale über die Zeit in Relation zur jeweiligen bewachsenen Fläche an Tag 1 in Prozent. Zwischen den relativen Bewuchsflächen der

Sphäroide an Tag 2 und 3 in Relation zu Tag 1 wurde die statistische Auswertung mithilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt ( $*p < 0,05$ ). Es wurden 6 Sphäroide je Ansatz für die Auswertung herangezogen. Die Boxplots zeigen den Median mit Interquartilsabstand, die Verlängerung (Antennen) den kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40“=40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“= mit 40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

Im Vergleich zu den unbehandelten Sphäroiden sind jene, die zwei Stunden mit der höheren Eap-Konzentration (40) inkubiert wurden, auch an Tag drei kaum verändert. Lediglich ein leichter Saum aus herauswachsenden Zellen um den Rand des mit 40 µg/ml Eap-behandelten Sphäroiden war hier sichtbar. Auch statistisch konnte dies mit einem signifikanten Ergebnis belegt werden. Wurde die Konfluenz der Kontrolle (0) mit dem Eap-behandelten Ansatz (40 µg/ml) verglichen, so war 48 und 72 h nach dem Transfer des Sphäroids ein signifikanter Unterschied der prozentual bewachsenen Fläche messbar (Abb. 16B,  $**p = 0,004$  bzw.  $0,009$ ). Zog man einen Vergleich mit der zweiten Kontrolle (40<sup>PK</sup>), so zeigte sich ebenfalls, dass die Eap-vorbehandelten RT-112 Zellen (40) an Tag 2 und 3 weniger Fläche einnahmen (Tag 2:  $p = 0,06$ ; Tag 3:  $*p = 0,015$ ). Auch die Sphäroide, deren Zellen für zwei Stunden mit 10 µg/ml Eap inkubiert wurden, dehnten sich etwas weniger aus als die Kontrollen, was in der Graphik zu erahnen ist. Eine statistische Signifikanz lag in diesem Vergleich nicht vor, lediglich an Tag 2 zeichnete sich ein statistischer Trend ab ( $p = 0,093$ ). Eap beeinflusste demnach dosisabhängig das Anwachsen der Zelllinie RT-112 an den die Blasenwand simulierenden Well-Boden und störte, nach diesem Modell, die Bildung eines Rezidivtumors. Auch hier wurde der Wachstumsverlauf normiert auf die Messwerte nach 24 h betrachtet (Abb. 16C). Die relative Fläche aller vier Ansätze wurde im Wilcoxon sign-rank Test an Tag 3 in Relation zu Tag 1 signifikant größer. Somit können die Eap-behandelten RT-112-Zellen sich in Bezug auf ihre Ausgangsgröße signifikant ausbreiten, nahmen jedoch absolut eine kleinere Fläche ein als die Kontrollen.

### 5.2.3.3. 5637

Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, produzieren 5637-Zellen 24 h nach der Aussaat in Wells einer anti-adhäsiv beschichteten Rundbodenplatte kleine und klar umrandete Sphäroide. Wurden diese Sphäroide jedoch nachfolgend in ein Well mit Flachboden transferiert, so konnte in diesem Versuch bereits einen Tag nach dem Umsetzen der Sphäroide eine rasche Ausbreitung der Zellen aller Versuchsgruppen über den Well-Boden beobachtet werden (Abb. 16A). Zwar blieben die Zellen noch in einer rundlichen Anordnung beieinander, aber ein Sphäroid war durch die vielen auswachsenden Zellen kaum mehr erkennbar. Die Zellen verloren vermutlich durch das rasche Auseinanderwachsen der anfänglich übereinanderliegenden Zellen an Kontrast, die Auswertung der Konfluenz blieb davon jedoch unbeeinträchtigt.



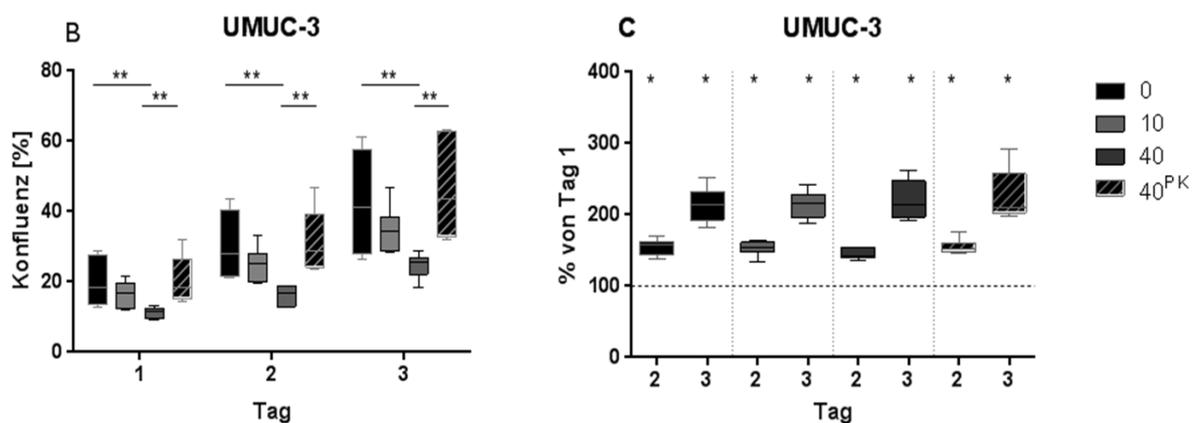
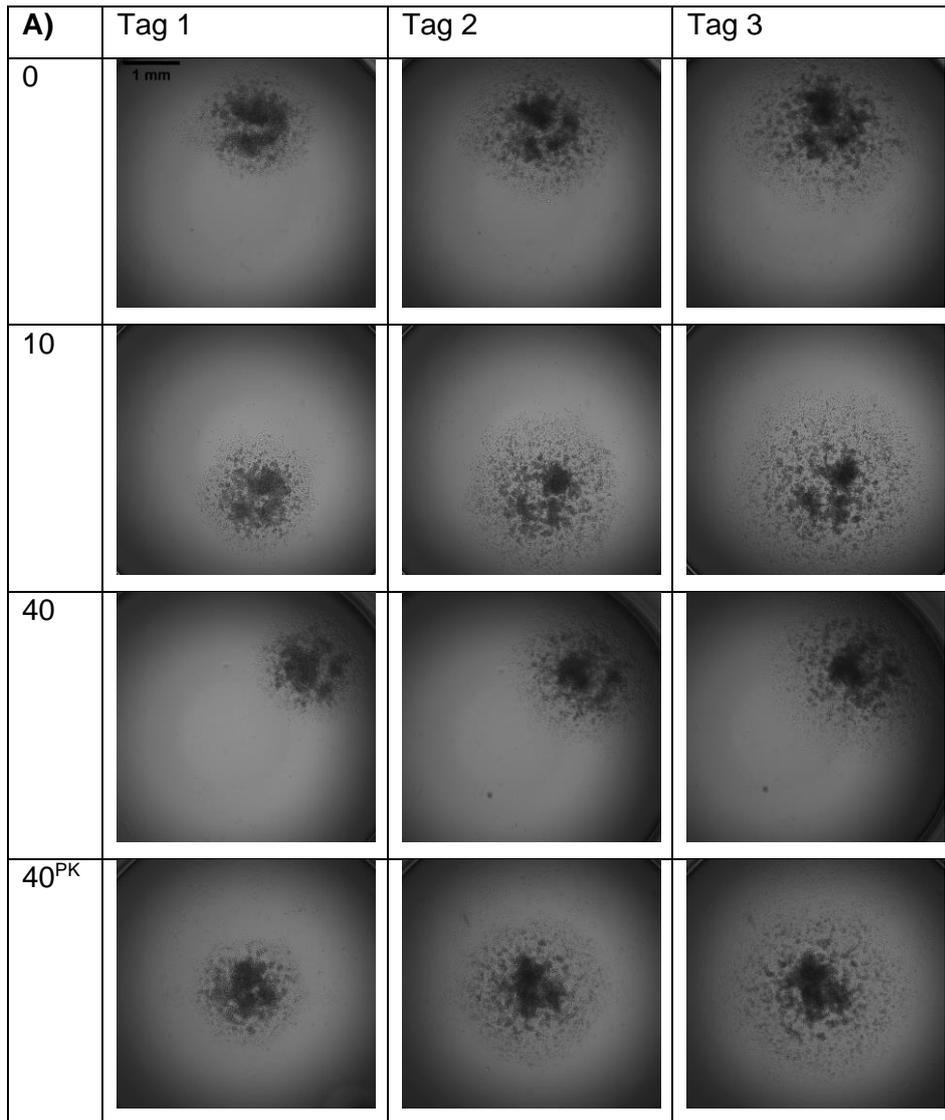
**Abbildung 16: Flächenzunahme der transferierten 5637-Sphäroide über die Zeit.** Die in RPMI-Medium und 10% FKS kultivierten 5637-Zellen wurden nach Umsetzen des 24 h alten Sphäroids (Zellzahl  $1,5 \cdot 10^5/\text{ml}$ ), der einer zweistündigen Instillationstherapie unterzogen worden war, auf eine 96-Well-Platte mit Flachboden für drei Tage beobachtet. **A:** Repräsentativ ist je ein auswachsendes Sphäroid im Zeitverlauf dargestellt. **B:** Zusätzlich wurde über das Programm Kaleido der prozentuale Anteil des Wells, der auf der Aufnahme bewachsen war, ermittelt. Der Versuch wurde für jeden Ansatz sechs Mal wiederholt. Die Testung auf statistische Signifikanz erfolgte im Mann-Whitney-U-Test ( $*p < 0,05$ ). **C:** Prozentuale Veränderung der bewachsenen Areale über die Zeit in Relation zur jeweiligen

bewachsenen Fläche an Tag 1 in Prozent. Hier erfolgte die statistische Testung im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ( $*p < 0,05$ ). Die Boxplots zeigen den Median mit Interquartilsabstand, die Verlängerung (Antennen) den kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40“=40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“= mit 40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

Die Kontrolle nahm anfänglich im Median 9% und am dritten Tag 17% des Well-bodens ein. Im Vergleich dazu bedeckten die mit 40 µg/ml Eap-behandelten Sphäroide der Zelllinie 5637 an Tag drei nur im Median 12% des Wellbodens. Statistisch war die Konfluenz der Eap-behandelten Zellen (40 µg/ml) am dritten Tag signifikant geringer als in der Kontrollsituation ( $*p = 0,039$ ). An den vorherigen beiden Tagen lag keine statistische Signifikanz vor, jedoch war auch zu diesen Zeitpunkten der statistische Trend erkennbar, dass unter Einfluss von Eap das Auswachsen der Zellen im Vergleich zu den Kontrollen vermindert war (Tag 1:  $p = 0,093$ ; Tag 2:  $p = 0,064$ ). Für die mit 10 µg/ml Eap inkubierten Sphäroide hingegen konnte kein klarer Unterschied in der Ausbreitung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Betrachtet man den Wachstumsverlauf der Ansätze normiert auf die eingenommene Fläche nach 24 h (Abb. 16C), so dehnten sich alle Ansätze signifikant im Vergleich zu der Fläche nach 24 h über das Well aus. Somit reduzierte die Präinkubation der Sphäroide mit Eap auch bei der Zelllinie 5637 dosisabhängig die Ausbreitung des Sphäroids über das Well, nicht aber die Ausbreitung im Zeitverlauf.

#### 5.2.3.4. UMUC-3

Ähnlich wie die 5637-Sphäroide breiteten sich die UMUC-3-Sphäroide schon 24 h nach dem Umsetzen auf den flachen Well-Boden markant aus (Abb. 17A). Anders als bei 5637-Sphäroiden beobachtet, schienen die UMUC-3-Sphäroide jedoch eher in Fragmente zu zerfallen, wobei auch bei dieser Zelllinie weitläufig vom ehemaligen Zentrum des Sphäroids auswachsende Zellen erkennbar waren. Die Zelllinie UMUC-3 fiel außerdem dadurch auf, dass schon am ersten Tag nach Umsetzen ihrer Sphäroide mit bis zu 20% die größte Fläche auf dem Wellboden im Vergleich zu den anderen Zelllinien besiedelt wurde (Abb. 17B). Rein optisch wurde zudem ein Unterschied zwischen den weit streuenden Zellen der Kontrollen und den im Vergleich dazu dichter beieinanderstehenden Zellen, die den zuvor mit 40 µg/ml Eap-behandelten Sphäroiden entstammten, beobachtet (Abb. 17A).



**Abbildung 17: Flächenzunahme der transferierten UMUC-3-Sphäroide über die Zeit.** Hier wurden in DMEM und 10% FKS angezüchtete Sphäroide (Zellzahl  $1,5 \cdot 10^5/\text{ml}$ ) nach 24 h einer modifizierten *in vitro* Instillation unterzogen und anschließend auf eine 96-Well-Platte mit Flachboden umgesetzt. Es wurden 6 Sphäroide je Ansatz für die Auswertung herangezogen. **A:** Repräsentativ ist je ein auswachsendes Sphäroid im Zeitverlauf dargestellt. **B:** Zusätzlich wurde über das Programm Kaleido der prozentuale Anteil des Wells, der auf der Aufnahme bewachsen war, ermittelt. Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Signifikanztest angewendet ( $*p < 0,05$ ). **C:** Prozentuale Veränderung der bewachsenen Areale über die Zeit in Relation zur jeweiligen bewachsenen Fläche an

Tag 1 in Prozent. Die Daten wurden hier im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test analysiert ( $*p < 0,05$ ). Die Messung bei dieser Zelllinie wurde wie bei den vorherigen Zelllinien sechs Mal wiederholt. Die Boxplots zeigen den Median mit Interquartilsabstand, die Verlängerung (Antennen) den kleinsten bzw. größten Datenwert. „0“=unbehandelte Kontrolle, „10“=10 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40“=40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, „40<sup>PK</sup>“= mit 40 µg/ml Eap-behandelter Ansatz, der zuvor mit Proteinase K und Hitze denaturiert wurde.

So breiteten sich die Sphäroide der NMIBC-G3-Zelllinie nach einer zweistündigen Therapie mit 40 µg/ml Eap deutlich weniger über das Well aus als die Kontrollen (Abb. 17B). Die inhibitorische Wirkung von Eap auf das Auswachsen des Sphäroides konnte dabei bereits 24 h nach Aussaat beobachtet werden. Auch in der Testung mit der zweiten Kontrolle fiel die Analyse ähnlich aus und war signifikant (Tag 1-3:  $**p = 0,002$ ). Bei den mit dem Proteinase K und Hitze-denaturierten Eap inkubierten Sphäroiden hingegen wurden der unbehandelten Kontrolle entsprechende Ausdehnungen in der Fläche beobachtet (Ab. 17B). Der gleiche Effekt wurde auch für die mit 10 µg/ml Eap-behandelten Sphäroide sichtbar, die sich über die Zeit in ähnlicher Weise wie die Sphäroide der unbehandelten Kontrolle ausbreiteten. Bei der Betrachtung der Ausdehnung der Sphäroide über das Well normiert auf die Größe nach 24 h, war, wie bei den anderen Zelllinien, wieder für die Tage 2 und 3 bei allen Ansätzen eine signifikante Zunahme zu verzeichnen (Abb. 17C). Diese Befunde präsentieren somit eine weitere Zelllinie, deren Ausbreitung aus der Sphäroidformation heraus über den Wellboden unter dem Einfluss von Eap dosisabhängig reduziert wird, wobei die Ausbreitung im Zeitverlauf unbeeinflusst blieb.

## 6. Diskussion

### 6.1. Die Eap-bedingte Proliferationsinhibition

Bereits bei verschiedenen Zelltypen wie T-Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten wurde eine von Eap ausgehende dosisabhängige Inhibition der zellulären Proliferation beschrieben (Hagggar et al. 2005; Sobke et al. 2006; Eisenbeis et al. 2017; Eisenbeis 2019). Als ein Wirkmechanismus von Eap wurde dabei die Inhibierung des ERK1/2 MAPK-Signalwegs (Abb. 1) diskutiert, da nach Stimulation mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren in Endothelzellen und Keratinozyten signifikant weniger phosphoryliertes ERK1/2 als in den Eap-freien Kontrollen nachgewiesen wurde, was auf eine Eap-vermittelte Blockade der ERK1/2-MAPK-Signalkaskade hindeutete (Sobke et al. 2006; Eisenbeis et al. 2017). Über diesen Signalweg vermag Eap unter anderem mit der zellulären Proliferation, der Zelldifferenzierung und der Apoptose der Wirtszelle zu interferieren. Bei vielen neoplastischen Zellen ist eben diese Kaskade so verändert, dass ein unkontrolliertes Wachstum von undifferenzierten Zellen, die häufig resistent gegen Apoptosereize sind, resultiert (Garnett und Marais 2004). Auch Urothelkarzinome weisen, wie schon in der Einleitung beschrieben, häufig Mutationen der MAPK-Signalkaskade oder deren Aktivatoren auf (Juanpere et al. 2012; Knowles 2015). Besonders bei nicht-muskelinvasiven Entitäten sind in circa 80% der Fälle Mutationen des für den Rezeptor FGFR-3 kodierenden Genes vorzufinden, die zu einer verstärkten Expression führen (Di Martino et al. 2012). Eine weitere Subgruppe an Blasen Tumoren weist wiederum Mutationen in Ras-kodierenden Genen auf (Lamont et al. 2011). Die für diese Arbeit untersuchten Zelllinien fallen ebenfalls durch derartige Veränderungen gegenüber normalem Urothel auf: die Zelllinien RT-4 und RT-112 weisen eine Überexpression des Wildtyps von FGFR-3 auf (Lamont et al. 2011). Eine Blockade dieses Rezeptors hat eine reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 als Bestandteil der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade zur Folge, weshalb eine Verbindung zwischen dem FGFR-3 und der das Zellwachstums beeinflussenden ERK1/2 MAPK-Kaskade angenommen wird (Lamont et al. 2011). Die Zelllinie UMUC-3 exprimiert den Wildtyp des FGFR-3, weist aber eine Mutation des G-Proteins Ras auf (Lamont et al. 2011). Die Mutation in Ras führt über eine verstärkte Aktivierung der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade zu einem gesteigerten Wachstum des als G3 eingestuften NMIBC im Vergleich zu normalem Urothel (Lamont et al. 2011). Die ebenfalls hier verwendete Zelllinie 5637 exprimiert hingegen nur wenig FGFR-3 und weist keine bekannte Mutation in der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade auf (Tomlinson et al. 2005). Aber auch für diese Zelllinie wurde eine besondere Bedeutung des ERK1/2 MAPK-Signalwegs für die Proliferations- und Migrationsfähigkeiten dieses Zelltyps beschrieben (Monami et al. 2006; Lee et al. 2013). Die Wirkung von Eap konnte daher an vier NMIBC-Zelllinien mit unterschiedlich

ausgeprägten Veränderungen des FGFR-3 und der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade getestet werden.

Um nun einen Anhalt darüber zu erhalten, ob Eap auf die Proliferation verschiedener NMIBC-Zelllinien einen Effekt hat, wurden die Zellen nach der *in vitro* Instillationstherapie mit aufsteigenden Eap-Konzentrationen in Proliferationsassays untersucht. Diese erbrachten, dass eine transiente Behandlung mit Eap nicht alle vier der hier untersuchten NMIBC-Zelllinien gleichermaßen beeinflusst. Im BrdU-Assay wurde 24 h nach der Instillationstherapie nur bei der Zelllinie RT-112 eine signifikant verminderte Proliferation der mit 10 und 40 µg/ml Eap-vorbehandelten Zellen im Vergleich zu der Eap-freien Kontrolle beobachtet (Abb. 5). Beide Eap-vortherapierten Ansätze waren in Hinblick auf den BrdU Einbau ähnlich stark vermindert, sodass hier nicht von einem dosisabhängigen Effekt gesprochen werden kann. In dem mehr die metabolische Aktivität der Zellkultur untersuchenden MTT-Assay konnte nach 24 h jedoch nur ein statistischer Trend zwischen den Eap-freien und Eap-therapierten Zellen bei den Zelllinien RT-112 und 5637 festgestellt werden. Beide Assays weisen in der Summe aber darauf hin, dass die Zelllinien RT-112 und 5637 einen Tag nach der *in vitro* Instillationstherapie mit Eap, auch nach einem kurzen Inkubationsintervall von zwei Stunden, in ihrem Stoffwechsel negativ beeinflusst werden. Die Zelllinien RT-4 und UMUC-3 hingegen waren nach den hier erhobenen Testergebnissen von einer kurzzeitigen Therapie mit Eap nach 24 h in ihrem Stoffwechsel und der Proliferation unbeeinträchtigt. Während die Befunde der BrdU- und MTT-Assays für die Zelllinien RT-112 und 5637 im Großen und Ganzen mit der Literatur übereinstimmen (Hagggar et al. 2005; Sobke et al. 2006; Eisenbeis et al. 2017), so weichen die mit diesen Assays erhobenen Befunde für die Zelllinien RT-4 und UMUC-3 davon ab. Dies mag dem Umstand geschuldet sein, dass in den Arbeiten von Hagggar, Sobke und Eisenbeis die entsprechenden Zelllinien für eine deutlich längere Zeitspanne mit Eap inkubiert wurden (Hagggar et al. 2005; Sobke et al. 2006; Eisenbeis et al. 2017). Die proliferationshemmenden Effekte von Eap auf die verschiedenen Zelllinien waren vermutlich ausgeprägter, da Eap dauerhaft mit den Zellen interagieren konnte. In den hier vorgestellten Versuchsreihen zeigte auch wahrscheinlich deshalb nur die Zelllinie RT-112 eine signifikant verringerte Proliferationsleistung nach einer Behandlung mit der höheren Dosis Eap. Trotzdem konnte auch in dieser Arbeit zumindest trendmäßig eine Hemmung von Eap auf die Proliferation von zwei der hier verwendeten vier maligne entarteten NMIBC-Zelllinien im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle beobachtet werden, die vermuten lässt, dass Eap diese auch bei kurzzeitiger Therapie in ihrem Stoffwechsel zu beeinträchtigen vermag. Um festzustellen, ob die Zelllinien RT-4 und UMUC-3 grundsätzlich gegenüber der Wirkung von Eap inert sind, könnten die Zellen dieser beiden Zelllinien, wie in Eisenbeis und Kollegen (Eisenbeis et al. 2017) beschrieben, für einen längeren Zeitraum mit Eap inkubiert werden.

Im Langzeitintervall war sowohl im BrdU-Assay (Abb. 6) als auch im MTT-Assay (Abb. 8) kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Eap-behandelten und unbehandelten Zellen mehr feststellbar. Die Zelllinien RT-4 und UMUC-3 blieben auch, ebenso wie in den Kurzzeit-Assays beobachtet, von einer zweistündigen Inkubation mit Eap in Hinblick auf ihre Proliferationsraten und Stoffwechselaktivitäten unbeeinflusst. Für die Zelllinien RT-112 und 5637 hingegen konnte im Langzeit-MTT-Assay nach einer Behandlung mit 40 µg/ml Eap zumindest noch ein statistischer Trend registriert werden, der auf eine verringerte Proliferationsrate nach Eap-Behandlung hinwies. Für die Zelllinie RT-112 war ein solcher Trend auch in dem mit 10 µg/ml Eap-behandelten Ansatz erkennbar. Nachdem beide Zelllinien in den Kurzzeitversuchen bereits eine signifikante Proliferationsabnahme nach der einmaligen, zweistündigen Eap-Therapie aufwiesen, scheint auch im Zeitverlauf ein proliferationshemmender Effekt von Eap auszugehen. Diese Befunde sind nicht überraschend, da eine Erholung der Proliferation von NMIBC bzw. ein Wirkverlust des Therapeutikums nach einer einmaligen, kurzzeitigen Instillationsbehandlung mit wachstumshemmenden Wirkstoffen bereits in anderen, im Folgenden vorgestellten, Studien beschrieben worden ist. Auch bei der von Lamont und Kollegen (Lamont et al. 2011) durchgeführten Testung von FGFR-Inhibitoren an NMIBC konnte keine vollständige Inhibition der Proliferation festgestellt werden, da trotz der Therapie mit diesen Inhibitoren immer eine Subpopulation von weiter proliferierenden Zellen erhalten blieb. Dabei wurde beobachtet, dass diese Subpopulation nicht resistent gegenüber den Inhibitoren war, sondern in einer erneuten Behandlung größtenteils wieder auf die Therapeutika ansprach, wobei auch danach eine kleinere Subpopulation weiter proliferierender Zellen verblieb (Lamont et al. 2011). Ebenso beobachteten Lamont und Kollegen (Lamont et al. 2011) ein erneutes Proliferieren der Tumorzelllinien, sobald die Inhibitoren dem System entzogen wurden. Diese Ergebnisse legen die Folgerung nahe, dass, wenn sich die Zellen von dem wachstumshemmenden Effekt der FGFR-Inhibitoren erholen können, auch eine Erholung von der kurzzeitigen Eap-Therapie möglich wäre. In der aktuellen Standardtherapie der NMIBC wird vor allem bei einem Intermediären- und Hochrisikoprofil des NMIBC folglich zu einer mehrfachen Wiederholung der Instillationstherapie geraten (AWMF 2020), denn trotz der angewendeten Therapeutika wie Mitomycin C oder BCG kommt es im Verlauf häufig zu Rezidiven des Tumors (Sylvester et al. 2016). Um eine langfristige Proliferationshemmung zu erzielen, ist auch in der klinischen Praxis eine einmalige Therapie der NMIBC mit wachstumshemmenden Therapeutika häufig nicht ausreichend, da die Inhibition der Proliferation reversibel ist und somit weiter proliferierende Residualtumorzellen ein großes Rezidivrisiko darstellen. Umgangen werden könnte der Verlust der zellulären Eap-Wirkung auf neoplastische Zellen vermutlich nur durch eine wiederholte Behandlung. Um die Wirkung von Eap auf neoplastische Zellen zusätzlich zu verlängern und zu verstärken, wäre grundsätzlich auch eine Dosissteigerung von Eap denkbar. Für die Versuche dieser Arbeit

wurde eine maximale Konzentration von 40 µg/ml verwendet. Da Vorarbeiten bereits zeigten, dass erst eine Konzentration von 81 µg/ml Eap zytotoxisch auf Lymphozyten wirkte (Haggar et al. 2005), wäre eine Steigerung der Dosis von Eap für das *in vitro* Instillationsmodell durchaus praktikabel. Jedoch existieren bislang nur Daten zu der Zytotoxizität von Eap aus Versuchen in der Zellkultur, weshalb hier keine Aussage zu der Situation *in vivo* getroffen werden kann. Auch die Auswirkungen auf physiologisches Urothel kann derzeit nicht abgeschätzt werden, sollte unter weiterer Dosiserhöhungen untersucht und für die Übertragung auf *in vivo* Modelle berücksichtigt werden.

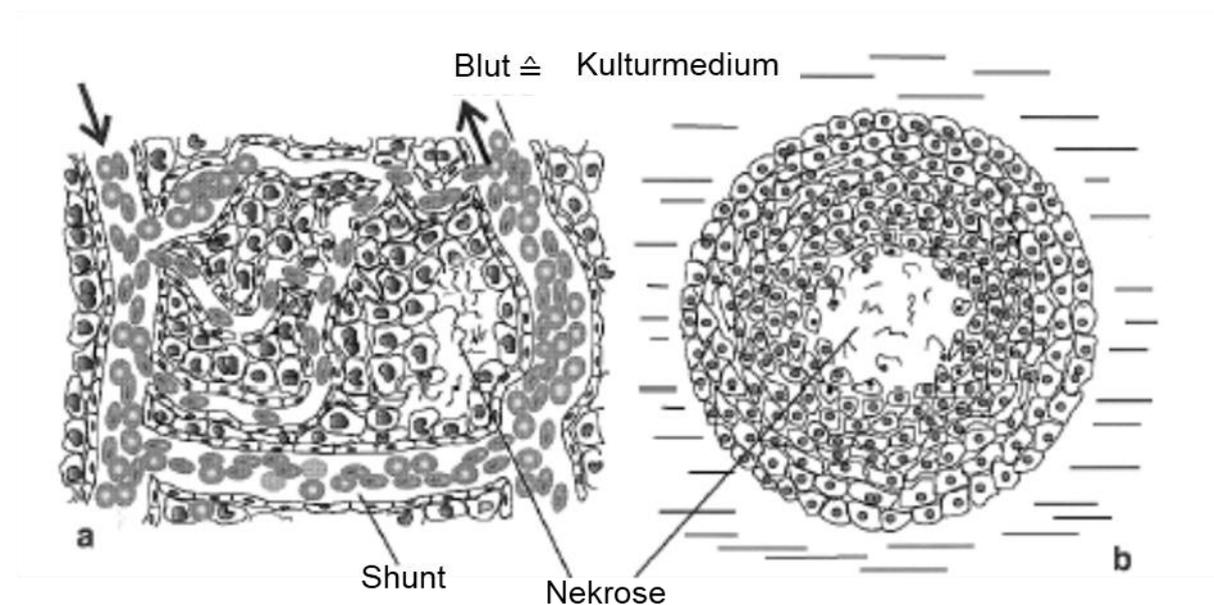
Die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde werfen auch die Frage auf, warum vor allem die Zelllinien RT-112 und zum Teil auch 5637 in den BrdU- und MTT-Assays empfindlich auf Eap zu sein scheinen, die Zelllinien RT-4 und UMUC-3 hingegen nicht. Eine Studie von Vidal und Kollegen (Vidal et al. 2018) beschrieb eine Besonderheit der Zelllinie RT-112. Zunächst wurde beobachtet, dass die mit Inhibitoren des EGFR und „human epidermal growth factor receptor-2“- (engl., kurz Her2) behandelten RT-112-Zellen, nicht vollständig aufhörten zu proliferieren. Deshalb wurde untersucht, welche zellulären Proteine nach einer Therapie mit den EGFR- und Her2-Inhibitoren unverändert vorlagen. Dabei wurde erkannt, dass Proteine der p38-MAPK-Signalkaskade nach der Inkubation mit den genannten Inhibitoren gleichbleibend phosphoryliert waren (Vidal et al. 2018). Auf dieser Grundlage wurde anschließend getestet, wie sich Urothelkarzinomzellen nach einer Dreifachblockade mit EGFR-, Her2- und p38-MAPK-Inhibitoren verhielten. In der Tat wurde eine signifikante Proliferationsabnahme, vor allem der Zelllinie RT-112, festgestellt (Vidal et al. 2018). Bei den anderen getesteten Zelllinien, unter anderem UMUC-3, wurde zwar auch eine Proliferationsabnahme verzeichnet, jedoch nicht in einem so starken Maß wie bei RT-112-Zellen (Vidal et al. 2018). Auch bei einer isolierten Blockade des p38-MAPK-Signalwegs von RT-112-Zellen zeichnete sich ein signifikanter Abfall der Proliferation ab (Vidal et al. 2018). Wie bereits erwähnt diskutierten Sobke und Kollegen (Sobke et al. 2006) eine von Eap-ausgehende Beeinflussung der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade in Wachstumsfaktor-stimulierten Endothelzellen. Auch RT-112-Zellen zeigten unter dauerhaftem Einfluss von Eap in Untersuchungen der jüngeren Vergangenheit eine Veränderung der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade. Eine Inkubation mit Eap reduzierte die Phosphorylierung von ERK1/2 trotz einer VEGF-Stimulation um circa 50% (Eisenbeis 2019), wohingegen die Zelllinie 5637 in dieser Untersuchung keine signifikante Verminderung des phosphorylierten ERK1/2 aufwies, dennoch aber ein statistischer Trend erkennbar war (Eisenbeis 2019). Da in den Vorarbeiten von Sobke und Kollegen (Sobke et al. 2006) zum Teil auch, abhängig vom Endothelzelltyp und Wachstumsfaktor, Effekte von Eap auf die Phosphorylierungen von unter anderem p38 beobachtet wurden, besteht die Möglichkeit, dass Eap ebenfalls über diese alternative MAPK-Signalkaskade auf die Proliferation und

Stoffwechselaktivität von RT-112- und vielleicht auch 5637-Zellen Einfluss nimmt. Die Arbeiten von Sobke und Kollegen (Sobke et al. 2006) legen nahe, dass Eap mit der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade auf Ebene der Signaltransduktionskomponente Ras interferiert (Abb. 1). Eine Eap-Modulation der ERK1/2-Phosphorylierung über Ras könnte auch erklären, warum die Zelllinie RT-112 auf die Eap-Behandlung anspricht. Denn vermutlich wird die ERK1/2 MAPK-Signalkaskade, trotz der die Proliferation des NMIBC modulierenden Überexpression von FGFR-3, durch Eap auf Höhe von Ras/Raf blockiert, was zu einer reduzierten ERK1/2 Phosphorylierung und schlussendlich zu einer reduzierten Proliferation führen könnte. Fraglich ist jedoch, warum dieser Effekt von Eap nicht auch bei RT-4-Zellen, die ebenfalls eine Überexpression von FGFR-3 aufweisen, zu beobachten ist. Das Nicht-Ansprechen von UMUC-3-Zellen in der 2D-Zellkultur auf eine Eap-Vorbehandlung mag der Tatsache geschuldet sein, dass diese Zelllinie eine Mutation in Ras aufweist, die zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 führt. Hier kann vermutet werden, dass Eap nicht dazu in der Lage ist, über eine Interaktion mit dem mutierten Ras die Phosphorylierung von ERK1/2 im relevanten Maße zu reduzieren. Diese Hypothese müsste zukünftig über entsprechende Western-Blot-Analysen mit anti-Phospho-ERK1/2 Antikörpern überprüft werden. Fraglich bleibt dennoch, ob Eap zusätzlich einen aktivierenden Rezeptor der ERK1/2 MAPK- oder der p38-MAPK-Signalkaskaden zu beeinflussen vermag oder ob Eap direkt mit Komponenten der Signalkaskaden interferiert. Nicht ausgeschlossen ist auch eine Kombination aus mehreren Wirkmechanismen oder ein bislang noch unbekannter zellulärer Angriffspunkt von Eap. Aufbauend auf den Versuchsergebnissen der 2D-Zellkultur kann eine moderate proliferationshemmende Wirkung einer einmaligen, zweistündigen Therapie mit Eap auf zwei der vier unterschiedlichen NMIBC beschrieben werden, die jedoch im Zeitverlauf von vier Tagen nachlässt. Anhand der molekulargenetischen Profile der NMIBC-Zelllinien konnte jedoch keinem bekannten zellulären Charakteristikum der NMIBCs eine sichere Schlüsselrolle in der Interaktion mit Eap zugeordnet werden.

## 6.2. Die Auswirkungen von Eap auf die Größe von NMIBC-Sphäroiden

Die Erkenntnisse aus den 2D-Zellkulturversuchen warf die Fragen auf, ob eine kurzzeitige Eap-Therapie auch auf NMIBC in ihrer dreidimensionalen Struktur Einfluss nimmt. Dafür wurde ein der 2D-Zellkultur überlegenes Modell zur Darstellung von Wirkungen einer Substanz auf die Gewebeoberfläche und die interzellulären Kontakte eines Tumors verwendet: die Sphäroide (Fitzgerald et al. 2015). Die Eigenschaften eines Sphäroids im Vergleich zu Tumoren *in vivo* ist in einer Gegenüberstellung in Abbildung 19 graphisch dargestellt. Neben der nahezu geometrischen Anordnung der Zellen im Sphäroid und der chaotisch

erscheinenden Gewebestruktur *in vivo*, weisen die Wachstumsbedingungen der Zellen in beiden Fällen jedoch eine Reihe an Gemeinsamkeiten auf (Mueller-Klieser 2000).



**Abbildung 18: Tumorgewebe *in vivo* (a) und in einem Sphäroid (b)** als schematische Darstellung (nach: (Mueller-Klieser 2000)).

Eine wesentliche Gemeinsamkeit zwischen Sphäroiden und Tumorgewebe ist die meist nicht optimale Nährstoffversorgung des Gewebeverbandes. Die Zellen im Sphäroid werden allein von dem umspülenden Medium, dessen Inhaltsstoffe über Diffusion in das Innere des Sphäroids gelangen müssen, mit Nährstoffen versorgt (Mueller-Klieser 2000). Infolgedessen kann ein Sphäroid in drei Schichten unterteilt werden: eine äußere Schicht, bei der die Zellen am besten nährstoffversorgt werden, eine zentrale Schicht, in der die Zellen schlecht nährstoffversorgt sind und eine intermediäre Schicht, die moderat versorgte Zellen beinhaltet (Mueller-Klieser 2000). Meist besteht im Inneren des Sphäroids durch den schlechten An- und Abtransport von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten ein Nekrosekern, der sich je nach Zelltyp, Größe und Alter des Sphäroids ausdehnt (Mueller-Klieser 2000). Weiterhin herrscht in einem Sphäroid eine heterogene Sauerstoffversorgung (Mueller-Klieser 2000). *In vivo* werden die Tumorzellen durch Gefäße, die in die extrazelluläre Matrix eingebettet sind, versorgt (Folkman 1971). Tumore weisen jedoch eine so schnelle Vermehrung der Zellen auf, dass die Neovaskularisierung oftmals nicht ausreicht, um eine optimale Nährstoffversorgung aller Regionen des Tumors zu gewährleisten (Folkman 1971). Nicht alle Tumorzellen sind somit gleichmäßig mit Nährstoffen versorgt, weisen dementsprechend eine unterschiedliche Stoffwechselaktivität auf und beginnen je nach Zelltyp und Dauer der Unterversorgung mit Nährstoffen zu nekrotisieren (Mueller-Klieser 2000). Die Nährstoffversorgung und daraus resultierende Stoffwechselaktivität beeinflussen das Ansprechen auf Therapeutika. Zum einen

erreicht in den beiden Gewebemodellen das Therapeutikum vermutlich nicht jede Zelle gleichermaßen. Zum anderen beeinflusst die Nährstoffversorgung und die damit einhergehende Stoffwechselaktivität der Zelle die Wirkung des Therapeutikums (Mueller-Klieser 2000). Folglich werden nicht aktiv proliferierende Zellen im Inneren des Sphäroids durch proliferationshemmende Therapeutika weniger stark beeinflusst (Mueller-Klieser 2000). Dies ist bei der Arbeit mit Sphäroiden und der Übertragung auf die *in vivo* Situation zu berücksichtigen.

Auch zur Bildung von NMIBC-Sphäroiden liegen bereits einige Daten vor, die jüngst in einem Review zusammengefasst wurden (Vasyutin et al. 2019). Unter anderem wurde darin beschrieben, dass vor allem die Erstellung von NMIBC-Sphäroiden mit einer hohen Erfolgsrate gelang, wohingegen MIBC-Zellen oder NMIBC-Zellen mit Progressionsneigung selten kompakte Sphäroide bildeten. Auch hier wurde berichtet, dass innerhalb der Sphäroide unterschiedlich gute Nährstoffbedingungen und dementsprechend variierende zelluläre Stoffwechselaktivitäten vorherrschen (Vasyutin et al. 2019).

In den Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit bildeten alle Zelllinien nach etwa acht Stunden Sphäroide, die in ihrem Wachstumsverlauf über zwölf Wiederholungen hinweg reproduzierbar waren (Daten hier nicht gezeigt). Die Sphäroide der Zelllinien unterschieden sich jedoch in der äußeren Erscheinung ihrer 3D-Struktur zum Teil stark voneinander. Bei der Betrachtung der Morphologie der Sphäroide fiel auf, dass besonders die als G3-Tumor deklarierten UMUC-3-Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien lichte Sphäroide bildeten, die eher einer lockeren Zellansammlung ähnelten als einem kompakten Zellaggregat. Diese Beobachtung ist in Einklang mit den Befunden von Vasyutin und Kollegen (Vasyutin et al. 2019) zu bringen, die beobachteten, dass die Sphäroide von differenzierteren Urothelkarzinomzellen kompakter erscheinen als jene von NMIBC mit Progressionsneigung, wozu der G3-Tumor UMUC-3 vermutlich zählt. Über den Zeitverlauf betrachtet nahmen die UMUC-3-Sphäroide jedoch an Größe ab, wurden kompakter und optisch dichter. In ähnlicher Form konnte dieser Größenverlauf bei den von RT-4-Zellen gebildeten Sphäroiden beobachtet werden. Die 3D-Struktur dieser beiden Zelllinien nahm 24 h nach Aussaat der Zellen die größte Querschnittsfläche ein. Im Zeitverlauf verloren beide Zelllinien jedoch signifikant an Größe. Anders als die Beobachtungen der UMUC-3-Sphäroide, stehen die Befunde der Größenentwicklung von RT-4-Sphäroiden über die Zeit eher im Widerspruch zur Literatur, da Amaral und Kollegen (Amaral et al. 2017) bei der Untersuchung der Größe von RT-4-Sphäroiden eine Zunahme über die Zeit beobachteten. Jedoch arbeiteten diese Autoren auch mit um eine Zehnerpotenz geringeren Zellzahl, um eine schlechtere Nährstoffversorgung, die mit einer zunehmenden Größe des Sphäroids einhergeht, zu vermeiden, da bekannt ist, dass bei einem Sphäroid-Durchmesser von circa 500  $\mu\text{m}$  ein zentral nekrotischer Kern entsteht

(Vasyutin et al. 2019). Vermutlich weitet sich diese zentrale Nekrose im Sphäroid bei einem Durchmesser über 500  $\mu\text{m}$  noch weiter aus, sodass Sphäroide, die einen solchen zentral nekrotischen Kern aufweisen, mit Fortschreiten der Inkubationsdauer in sich zusammenfallen. Dies könnte erklären, warum vor allem die etwa 1  $\text{mm}^2$  großen Sphäroide von UMUC-3 und RT-4 über den Beobachtungszeitraum hinweg an Größe verloren, während 5637-Sphäroide, die im Schnitt nur eine Fläche von 0,12  $\text{mm}^2$  aufwiesen, ab Tag 3 nach Aussaat sogar leicht an Größe zulegten (Abb. 11C). Eine zweistündige Eap-Vorbehandlung der Zellen schien auf den Prozess der Sphäroidbildung und des Verlaufes aller drei zuvor genannten Zelllinien keinen markanten Einfluss zu haben, da die Querschnittsflächen der Sphäroide, unabhängig von der Art der Vorbehandlung, bei allen Ansätzen ähnlich groß waren. Die Sphäroide der Zelllinie RT-112 hingegen unterschieden sich je nach Therapieverfahren deutlich voneinander (Abb. 10). Die Querschnittsflächen der Sphäroide, deren Zellen zuvor für zwei Stunden mit 40  $\mu\text{g/ml}$  Eap inkubiert wurden, waren bereits an Tag 1 nach Aussaat signifikant kleiner als die der Kontrollen. Dieser Effekt war auch noch an vier Tage nach Aussaat sichtbar. Da aber die Sphäroide der mit 40  $\mu\text{g/ml}$  Eap vorbehandelten Zellen im Zeitverlauf eine ähnliche Größenzunahme der Querschnittsflächen wie die Kontrollen aufwiesen, darf davon ausgegangen werden, dass die Eap-Vorbehandlung im besonderen Maße die Sphäroidbildung beeinflusst, das weitere Wachstum über die Zeit aber nicht zu beeinflussen vermag. In der Literatur vergangener Jahre wurde bereits 2007 von Schneider und Kollegen (Schneider et al. 2007) eine Eap-induzierte Wachstumsinhibition von neoplastischen Zellen bei osseären Metastasen eines Brusttumors im Mausmodell beschrieben. Dabei wurden die erkrankten Mäuse mehrfach mit intraperitonealen Injektionen von Eap behandelt. Computertomographisch konnte festgestellt werden, dass die Metastasen der Eap-behandelten Mäuse in signifikant geringerer Anzahl vorlagen und signifikant kleiner waren als bei PBS-behandelten Mäusen (Schneider et al. 2007). Die Autoren mutmaßten, dass dies durch die Wechselwirkung von Eap mit Osteopontin, einem Protein an der Oberfläche von Knochen, begründet ist (Schneider et al. 2007). Osteopontin ist eine Bindestelle für den Übertritt von zirkulierenden Tumorzellen in den Knochen, wodurch die hämatogene Metastasierung dorthin erst möglich wird (Schneider et al. 2007). Die Autoren konnten in derselben Studie nachweisen, dass Eap an Osteopontin zu binden vermag und damit vermutlich die Interaktion von Osteopontin mit Integrinen an der Oberfläche der Brustkrebszellen verhindert (Schneider et al. 2007). Ob Eap direkten Einfluss auf das Größenwachstum nimmt oder lediglich der reduzierte Übertritt von Brusttumorzellen in den Knochen die kleinere Metastasengröße im Vergleich zu den mit PBS-behandelten Kontrollen bedingt, blieb an dieser Stelle ungeklärt. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Befunde weisen nun darauf hin, dass Eap möglicherweise auch über einen direkten zellulären Signalweg das Wachstum eines Tumorverbandes moduliert. Dies könnte eine Begründung

darstellen, warum die osseären Brustkrebsmetastasen, ebenso wie die Sphäroide der Zelllinie RT-112, bei einer Vorbehandlung mit Eap eine geringere Größe aufwiesen als die Eap-freien und Eap-denaturierten Kontrollsphäroide bzw. Metastasen. Auf funktionaler Ebene könnte dabei wieder eine Veränderung der Aktivität der ERK1/2 MAPK-Signalkaskade eine Rolle spielen. Fraglich bleibt, warum ein solcher Eap-Effekt auf den ERK1/2 MAPK-Signalweg nur in Sphäroiden der Zelllinie RT-112 zu sehen war und Sphäroide andere Zelllinien diesen Effekt nicht aufwiesen.

Um eine mögliche Antwort auf die Frage zu erhalten, ob Eap die Stoffwechselaktivität der Zellen innerhalb des Sphäroids beeinflusst, wurde ein Assay durchgeführt, mit dem das intrazelluläre ATP der Zellen anhand eines lumineszenzbasierten Signals gemessen werden kann. Diese Untersuchungen erbrachten keinen klaren Effekt der Eap-Vorbehandlung auf die Stoffwechselaktivität der Sphäroide. Interessanterweise konnten aber zwischen den Sphäroiden der verschiedenen Zelllinien klare Unterschiede beobachtet werden. So wiesen die in der Fläche kleinsten Sphäroide der Zelllinie 5637, ungeachtet der Tatsache, dass für alle Zelllinien eine vergleichbare Zellzahl ausgesät wurde, auch die mit Abstand geringsten relativen Lichteinheiten pro Well auf, während für Sphäroide der Zelllinie RT-4 im Vergleich zu den 5637-Sphäroiden im Mittel zweimal höhere relative Lichteinheiten pro Well ermittelt wurden. Dieser Befund steht im Gegensatz zu der Hypothese, dass in größeren Sphäroiden ein größerer Nekrosekern vorliegt (Mueller-Klieser 2000), der sich negativ auf die ATP-Konzentration im Gesamtsphäroid auswirken sollte. Andererseits wurde beschrieben, dass die Nekrosezone im Sphäroid je nach Zelltyp sehr differieren kann und diese auch bei einigen Sphäroiden unabhängig von der vorliegenden Sauerstoffversorgung sein kann (Mueller-Klieser 2000). Die mikroskopische Evaluation der Sphäroide lässt zudem vermuten, dass die Zellen in 5637-Sphäroiden bereits 24 h nach Aussaat sehr dicht aneinander standen, sodass möglicherweise wenig Medium die zentral liegenden Zellen im Sphäroid erreichte, während RT-4-Sphäroide zu diesem Zeitpunkt unter Durchlicht transparenter erschienen und vermutlich auch im Inneren des Sphäroides noch mit Medium in Kontakt kamen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wären jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Eine Bestimmung der Zellzahl der einzelnen Sphäroide könnte zum Beispiel Aufschluss darüber geben, ob sich nicht alle in das jeweilige Well pipettierte Zellen im Sphäroid zusammengeschlossen und auf diese Weise Einfluss auf die Größe des Sphäroids genommen haben. Ebenso würde die Bestimmung der ATP-Mengen der Zelllinien ohne vorherige *in vitro* Instillationstherapie Einblicke liefern, ob die vier NMIBC-Zelllinien sich in Hinblick auf den ATP-Gehalt pro Zelle grundsätzlich voneinander unterscheiden. Die Auswertung der ATP-Konzentration der Sphäroide von UMUC-3 erbrachte ähnliche Werte wie die der Zelllinie RT-112, obwohl die Fläche von UMUC-3-Sphäroiden an Tag 1 nach Aussaat etwa doppelt so groß war wie die Fläche der RT-112-Sphäroide.

Bemerkenswert ist auch, dass mit 40 µg/ml Eap-vorbehandelten RT-112-Sphäroide, obwohl diese in ihrer Fläche deutlich kleiner als die unbehandelten Kontrollsphäroide waren, ähnliche ATP-Mengen wie die Kontrollsphäroide aufwiesen. Letzterer Befund lässt vermuten, dass Eap vermutlich mehr die Zellaggregation der RT-112-Sphäroide und weniger die Stoffwechselaktivität der Sphäroide dieser Zelllinie beeinflusst.

Da bei keiner der Zelllinien bei den Eap-behandelten Sphäroiden im Vergleich zur Kontrolle ein signifikanter Abfall der ATP-Konzentration beobachtet werden konnte, darf zudem gemutmaßt werden, dass Eap in den angewendeten Konzentrationen weder apoptotisch noch nekrotisch auf die Sphäroide wirkte. Diese Annahme deckt sich weitestgehend mit der Literatur, in der bis dato nur in einer Publikation eine apoptotisch oder nekrotische Wirkung von Eap beschrieben wurde, die aber erst bei einer Eap-Konzentration von 81 µg/ml festgestellt werden konnte (Bur et al. 2013; Haggart et al. 2005).

Das Fehlen einer Wirkung von Eap auf die Größenentwicklung und Stoffwechselaktivität der Sphäroide in drei der vier getesteten Zelllinien könnte zum Teil darauf zurückzuführen sein, dass Sphäroide im Vergleich zu 2D-Kulturen eine geringere Proliferationsrate und metabolische Aktivität aufweisen. So konnte von Amaral und Kollegen (Amaral et al. 2017) bereits festgestellt werden, dass die Proliferationsrate von RT-4-Zellen in den Sphäroiden vierfach geringer war, als jene in der 2D-Zellkultur. Eine derart eingeschränkte Proliferation führt zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit der Zellen gegen wachstumshemmende Therapeutika (Vasyutin et al. 2019). Außerdem präsentierten Werner und Werb (Werner und Werb 2002) Daten zu einer verringerten Aktivität von metabolischen Enzymen im Sphäroid, sodass Therapeutika, die solche Enzyme inhibieren, im Sphäroid weniger Wirkung entfalten können. Letztendlich konnte wahrscheinlich deshalb in keiner Zelllinie ein Effekt auf die zelluläre Stoffwechselaktivität der Sphäroide im ATP-Lite 3D-Assay nach Behandlung mit Eap beobachtet werden. Auf der Basis dieser Daten darf angenommen werden, dass Eap Zellen in einem 3D-Zellverbund nicht in gleichem Maße wie Zellen in einer 2D-Kultur beeinflusst. Um jedoch zweifelsfrei auf eine veränderte Wirksamkeit von Eap auf stoffwechselreduzierte Zellen schließen zu können, sind weiterführende Studien notwendig. Hier wäre unter anderem eine Testung älterer 2D-Kulturen, die schon für eine geraume Zeit ein konfluentes Wachstumsstadium erreicht haben, denkbar.

Die hier beobachtete Variabilität der Formation, der ATP-Konzentrationen und dem Ansprechen auf Therapeutika der NMIBC-Sphäroide spiegelt sich auch in der klinischen Praxis wider. NMIBC variieren häufig stark in ihren Krankheitsverläufen, was die Auswahl einer optimalen Therapie und Nachsorge erschwert (Rieken et al. 2014), sodass die hier beschriebenen Unterschiede in dem Ansprechen auf Eap ebenfalls einen Ausdruck der Heterogenität von NMIBC darstellt.

### 6.3. Eap hemmt das Auswachsen von NMIBC-Zellen aus einem Sphäroid

Das Auftreten eines Rezidivs stellt in der Behandlung von NMIBC eine häufige Komplikation dar, die trotz einer einmaligen Instillationstherapie eines Chemotherapeutikums bei circa 42,5% der Erkrankten auftritt (Sylvester et al. 2016). In dieser Arbeit wurde deshalb das Modell einer Rezidiv-verursachenden Situation generiert, das nach einer transurethralen Resektion zurückgebliebene NMIBC-Zellen bei ihrem Readhärieren an das Urothel und ihrer lokalen Ausbreitung simulieren sollte. Zu diesen sogenannten Residualtumorzellen zählen zum einen jene Zellen, die durch eine unvollständige Resektion des Tumors in der Blasenwand zurückbleiben und von dort aus zu einem Rezidiv oder Tumorprogress führen können (Grimm et al. 2003). Zum anderen ordnet man hierzu auch Zellen, die durch die Entfernung des Tumors aus der Blasenwand herausgerissen wurden und frei im Harnblasenlumen flotieren (Sylvester et al. 2004). Diese frei in der Blase vorliegenden Zellen können vor allem an verwundetes Urothelgewebe readhärieren und stellen ein hohes Risiko für die Bildung eines Rezidivs dar, was bei einer alleinigen TURB ohne adjuvante Therapie in circa 56% der Fälle auftritt (Sylvester et al. 2016). Um den Prozess der Rezidivbildung und Tumorprogression in der Zellkultur zu simulieren, wurden für 24 h herangewachsene Sphäroide nach einer Instillationstherapie im Well auf eine Flachbodenplatte transferiert, wo sie anschließend über drei Tage beobachtet wurden. Der Versuchsaufbau basierte auf der Annahme, dass über die Eap-vermittelte Steigerung der Adhäsion, die Veränderung der Zellmorphologie sowie der Verminderung der Proliferation und Migration der Zellen (Eisenbeis et al. 2017), das Ausbreiten von Tumorzellen in die bevorzugte adhärente Wachstumsform verhindert werden könnte (vgl. Tabelle 1). Dieser Versuch zielte damit besonders auf die Klärung einer Eap-bedingten Reduktion potenzieller Ursachen eines Rezidivs nach einer TURB.

Bei der Betrachtung der Versuchsergebnisse ist erkennbar, dass alle verwendeten NMIBC-Zelllinien aus ihrer ursprünglichen Sphäroid-Form, wenn auch in unterschiedlichen Geschwindigkeiten, herauswachsen (Abb. 14-18). Die Zellen bevorzugten unter den angebotenen Kultivierungsbedingungen wie erwartet das Wachstum als adhärente Einzelzellschicht an einer Well-Platte gegenüber der rundlichen 3D-Struktur. Die als G1-NMIBC bekannte Zelllinie RT-4 unterschied sich über den Beobachtungszeitraum nicht wesentlich zwischen Eap-behandelten Ansätzen und der Kontrollsituation. Verglichen mit den anderen Zelllinien zeigten diese sich langsam teilenden Zellen bei allen Ansätzen über den gesamten Versuchszeitraum, unabhängig von der jeweiligen Vorbehandlung, kaum Änderungen des ausgesetzten Sphäroids (Abb. 14). Jedoch beträgt die Teilungsrate dieser Zelllinie über 80 h (vgl. Tabelle 1), sodass das hier verwendete Zeitfenster für diesen Zelltyp

möglicherweise zu kurz gewählt wurde. Nichtsdestotrotz zeigten die unbehandelten Sphäroide dieser Zelllinie, die auch an Tag 3 nach Ausbringen auf dem Flachboden noch gut in ihrer Struktur erkennbar waren, über die Zeit eine signifikante Zunahme der Flächenbedeckung, die bei Eap-behandelten Sphäroiden so nicht zu sehen war (Abb. 14C). Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass Eap auch bei dieser Zelllinie ein vermindertes Auswachsen bewirkt. Im Gegensatz zu den RT-4-Zellen konnten bei den NMIBC-Zelllinien RT-112, 5637 und UMUC-3 klare Unterschiede zwischen den Eap-behandelten Ansätzen und den Kontrollen beobachtet werden. So migrierten die Zellen aller drei Zelllinien, die sich zuvor in einem Sphäroid befunden hatten, nach zweistündiger Inkubation mit 40 µg/ml Eap signifikant langsamer aus ihrer 3D-Konfiguration heraus als die entsprechenden Kontrollen (Abb. 15, 16 und 17). Besonders eindrücklich war dieser Effekt bei der wenig differenzierten G3-Tumor-Zelllinie UMUC-3 nach der vorausgegangenen Eap-Instillation zu beobachten, von der an Tag 3 die mit 40 µg/ml Eap behandelten, aus dem Sphäroid auswachsenden Zellen nur etwa halb so viel Fläche einnahmen, wie von den Zellen der anderen Ansätze (Abb. 17). Allgemein waren die Sphäroide dieser Zelllinie auch dafür auffällig, dass bereits an Tag 1 nach Ausbringen auf den Flachboden keine klaren Sphäroidstrukturen mehr erkennbar waren. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass UMUC-3 Sphäroide ein hohes Potential zur Auflösung des Zellverbandes bei Kontakt mit einer adhäsionsfördernden Oberfläche haben. Da sich die prozentualen Veränderungen in der besiedelten Zellfläche der Eap-behandelten Sphäroide über die Zeit jedoch nicht von den Kontrollen unterschieden (Abb. 17C), kann gemutmaßt werden, dass Eap wahrscheinlich primär das Herauswandern der Zellen aus dem Zellverband reduziert und weniger die Migration/Proliferation der aus dem Zellverband herausgelösten Zellen. Bei den Sphäroiden der mäßig differenzierten Zelllinie RT-112 wurden durch die *in vitro* Instillationstherapie mit der höheren Eap-Konzentration an den Tagen 2 und 3, verglichen mit den entsprechenden Kontrollen, ebenfalls signifikante Veränderungen in der Ausbreitung beobachtet. Ähnlich wie bei RT-4-Sphäroiden waren bei RT-112-Sphäroiden aber auch an Tag 3 nach Aussetzen auf den Flachboden noch klare Sphäroide zu erkennen. Da aber auch bei diesen Sphäroiden zwischen Eap-behandelten Proben und den Kontrollen in Hinblick auf die Ausbreitungskinetik über die Zeit in Relation zur Fläche an Tag 1 keine klaren Unterschiede zwischen den Ansätzen erkennbar waren, kann auch hier, wie für UMUC-3, vermutet werden, dass Eap insbesondere das Herauswandern der Zellen aus dem Zellverband zu reduzieren vermag. Bei den Sphäroiden der ebenfalls mäßig differenzierten Zelllinie 5637 konnte bereits 24 h nach Ausbringen auf dem Flachboden eine verkleinerte Besiedlungsfläche gegenüber der Kontrolle beobachtet werden, die sich jedoch erst 72 h nach Ausbringung signifikant von der eingenommenen Fläche der Kontrollsphäroide unterschied. Ebenso wie UMUC-3 Sphäroide wiesen 5637 Sphäroide bereits 24 h nach dem Ausbringen auf einen Flachboden keine klare Sphäroidstruktur mehr auf. Anders als UMUC-3-Sphäroide

schiene 5637-Sphäroide jedoch nicht in sich zu zerfallen, sondern ähnelten eher einem aufgetropften, losen Zellverband (Abb. 16A). Da aber auch für 5637-Sphäroide zwischen Eap-behandelten Proben und den Kontrollen in Hinblick auf die Ausbreitungskinetik über die Zeit in Relation zur Fläche an Tag 1 keine klaren Unterschiede zwischen den Ansätzen verzeichnet wurden, ist auch für Sphäroide dieses Zelltyps davon auszugehen, dass Eap vor allem das Herauswandern der Zellen aus dem Zellverband zu reduzieren vermag. In einem direkten Vergleich der Eap-Effekte auf das Auswandern der Zellen aus RT-112- und 5637-Sphäroiden scheint Eap einen stärkeren Effekt auf RT-112-Sphäroide auszuüben, was auch in ähnlicher Form bereits von Janina Eisenbeis im Rahmen ihrer Promotionsarbeit beobachtet wurde (Eisenbeis 2019). An den vorherigen Messzeitpunkten war hingegen nur ein statistischer Trend erkennbar, bei dem die Kontrollen eine größere Fläche des Well-Bodens einnahmen als die Eap-behandelten Ansätze. Demnach fallen die Effekte von Eap auf RT-112 stärker aus als für 5637, was auch in der Dissertationsschrift von Janina Eisenbeis (Eisenbeis 2019) beobachtet wurde. So waren Sphäroide der Zelllinie RT-112, die in permanenter Anwesenheit von Eap für 72 h angezüchtet wurden, deutlich stärker durch die Anwesenheit des bakteriellen Proteins in ihrem Wachstum reduziert als Sphäroide der Zelllinie 5637 unter diesen Bedingungen.

Die hier vorgestellten Daten lassen vermuten, dass Eap zu einer mehr oder weniger starken Abnahme des Auswachsens der Zellen aus dem Sphäroidverband bei allen vier getesteten NMIBC Zelllinien führte, das Wachstum der Sphäroide aber nur bei einer Zelllinie in relevantem Maße beeinflusst wurde. In Hinblick auf die Stoffwechselaktivität der Sphäroide übte Eap keinen markanten Einfluss aus. Ich möchte im folgenden Absatz darüber spekulieren, was diese Befunde für die weiteren Forschungsziele bedeuten könnten: Die Literatur zu Eap weist darauf hin, dass Eap mit mehreren zellulären Mechanismen interagiert, die Zellen in ihrer Proliferation oder Migration modulieren (Sobke et al. 2006; Eisenbeis et al. 2017; Eisenbeis 2019), wodurch die Produktion von Proteinen für eine Änderung des Zytoskeletts und die Mobilisation von Zellen erschwert ist oder eben die Zellreplikation reduziert wird. Für RT-112- als auch 5637-Zellen konnte eine signifikante Inhibition der Proliferation beobachtet werden, wenn die Zellen dauerhaft mit Eap inkubiert wurden (Eisenbeis 2019). Dies könnte als ein Hinweis dafür gewertet werden, dass vor allem Zellen mit einer hohen Proliferationsrate anfällig für die Wirkung von Eap sind. Diese Annahme wird auch durch die erhaltenen Befunde der Zelllinie RT-4 unterstützt, da in dieser deutlich langsamer replizierenden Zelllinie so gut wie kein Eap-Effekt sichtbar wurde. Allerdings widersprechen dabei die gemachten Beobachtungen mit der schnell wachsenden Zelllinie UMUC-3 dieser Hypothese, da in dieser Zelllinie nur beim Auswachsen der Zellen aus dem Sphäroid ein signifikanter Eap-Effekt detektiert werden konnte. Die mit der zuletzt genannten Zelllinie erhaltenen Befunde könnten aber dafürsprechen, dass Eap möglicherweise durch direkte Protein-Protein Interaktionen mit

Bestandteilen der extrazellulären Matrix von eukaryonten Zellen interagiert. Dadurch könnte ein inhibitorischer Effekt auf das Ablöseverhalten der Zellen aus dem Zellverband ausgeübt werden, ohne dabei zwingend auf intrazelluläre Signalwege wie dem ERK1/2 MAPK-Signalweg Einfluss zu nehmen. Eine vollständige Immobilisierung lag jedoch nach der zweistündigen Eap-Therapie bei keiner Zelllinie vor, da ein mehr oder weniger ausgeprägtes Herauswachsen von einzelnen Zellen aus dem ehemaligen Sphäroid zu jedem Beobachtungszeitpunkt sichtbar war. Dass eine kurzzeitige Vorbehandlung der Sphäroide mit Eap nur einen transienten Effekt auf das Auswachsen der Zellen aus dem Sphäroidverbund ausübt, wird auch dadurch sichtbar, dass drei der vier Zelllinien, ungeachtet der Vorbehandlung, eine ähnliche Flächenzunahme an den Tagen 2 und 3 nach Ausbringen auf den Flachboden zeigten, wenn diese auf die Fläche an Tag 1 nach Ausbringung bezogen wurde (Abb. 15-18C). Lediglich die Zelllinie RT-4 zeigte nach einer Eap-Behandlung nicht die gleiche Flächenzunahme, wie die Kontrollen (Abb. 14C). Ob dieser Effekt primär durch Eap-vermittelte Adhäsionseffekte mit der extrazellulären Matrix der Zellen im Sphäroidverbund oder über die Einflussnahme auf intrazelluläre Signalwege hervorgerufen wird, ist durch weiterführende Untersuchungen zu klären. So könnte in den unbehandelten bzw. mit Eap vorbehandelten Sphäroiden die ERK1/2- und p38-Phosphorylierungslevel per Western-Blot-Verfahren ermittelt werden.

Betrachtet man die hier dargelegten Ergebnisse der einzelnen Zelllinien in Hinblick auf ihre eingangs beschriebenen molekulargenetischen Charakteristika des ERK1/2 MAPK-Signalweges, so lässt sich, wie zuvor schon erwähnt, kein eindeutiger Bezug zwischen dem Ansprechen der auswachsenden Zellen auf Eap und der zellulären Eigenschaften herstellen. Stellt man nun aber eine Verbindung zum Grading, also dem Differenzierungsgrad vom Ursprungsgewebe der NMIBC-Zelllinien her (Tabelle 1), so inhibiert Eap die als G1-eingestufte Zelllinie RT-4 am geringsten. Auf den als G3-Tumor klassifizierten UMUC-3-Sphäroid war der inhibitorische Einfluss auf das Auswachsen der Zellen am stärksten ausgeprägt, jedoch waren in Hinblick auf Proliferation und Stoffwechsel nur marginale Effekte erkennbar. Bei den von G2-Tumoren entstammenden Zelllinien RT-112 und 5637 waren nach einer zweistündigen Eap-Vorbehandlung sowohl die Proliferation der 2D-Kulturen transient gehemmt als auch das Auswandern der Zellen aus dem Sphäroid. Würden diese von Eap ausgehenden Effekte auch auf G2- und G3-Tumore *in vivo* zutreffen, wäre dies, neben der Reduktion des Rezidivrisikos, sehr wertvoll bei der Verringerung der Tumorprogression. Bislang werden eine Behandlung mit dem Chemotherapeutikum oder die Applikation von BCG Zellen als nahezu gleichwertig in Bezug auf die Hemmung des Tumorwachstums betrachtet, das Rezidivrisiko senkt BCG jedoch stärker als das Chemotherapeutikum (Malmström et al. 2009). Die Standardtherapeutika für die Instillationstherapie stellen bei den sich sehr heterogen verhaltenen Urothelkarzinomen jedoch nicht flächendeckend eine effektive Therapieoption

dar. Eine sichere Einschätzung des Therapieerfolgs ist zudem durch die starke Rezidiv- und Progressionsneigung dieser Tumore schwierig zu treffen. So wurde zum Beispiel erkannt, dass eine Instillationstherapie mit Chemotherapeutika bei High-risk-Tumoren mit einem EORTC-Score  $\geq 5$  und zuvor bereits aufgetretenen Rezidiven keine Reduktion der Rezidivrate erzielt (Witjes 2016). Möglicherweise könnte Eap gerade bei einem solchen Patientenkollektiv als weitere Therapieoption eingesetzt werden.

#### 6.4. Schlussfolgerung

Das von *S. aureus* sezernierte Eap hat die Fähigkeit nach einer zweistündigen Therapie die Proliferationsrate insbesondere von G2-Urothelkarzinomzellen transient zu reduzieren. Auch auf die Bildung eines 3D-Gewebeverbandes der Zelllinie RT-112 scheint Eap einen wachstumshemmenden Einfluss zu entfalten, ohne dabei apoptotisch oder nekrotisch zu wirken. Die Stoffwechselaktivität von NMIBC-Zellen innerhalb eines Sphäroids bleibt dabei jedoch, vermutlich aufgrund der gedrosselten Proliferationsrate von Zellen in Sphäroiden und des Nährstoff-, Sauerstoff- und pH-Gradienten, weitestgehend unbeeinträchtigt. Von besonderem Interesse ist, dass Eap das Auswachsen von mäßig- bis entdifferenzierten NMIBC-Zellen aus einem bestehenden Sphäroid signifikant zu vermindern vermag. Damit weist Eap einen vielversprechenden und therapeutisch bedeutsamen Effekt auf die Proliferations-, Adhäsions und/oder Migrationsfähigkeit von Zellverbänden auf, der jedoch in seiner Ausprägung sehr heterogen ist und weiter spezifiziert werden muss. Schwerpunktmäßig würde sich in Zukunft die Betrachtung einer Eap-Behandlung in der Onkologie in halb-offenen oder offenen Organsystemen anbieten, die eine gezielte Applikation ermöglichen. Neoplasien der Harnblase sind durch ihren minimalinvasiven Zugang für eine derartige Therapie besonders geeignet. Schon aufgrund der Inzidenz von NMIBC sowie der häufig auftretenden Rezidive, die hohe Kosten für das Gesundheitssystem verursachen und einen hohen Leidensdruck für den Patienten darstellen, könnte Eap die aktuelle Standardtherapie optimieren und damit individuell als auch gesamtgesellschaftlich von Vorteil sein. Wie auch der 2020 erschienenen Leitlinie zu NMIBC zu entnehmen ist, scheint eine das Rezidiv- und Progressionsrisiko ausreichend dezimierende Therapie noch zu fehlen und es bleibt die aktuell ubiquitär vorkommende Fragestellung bei der Therapie von Urothelkarzinomen: welches Therapeutikum wird wann und wie oft eingesetzt (Deutsche Krebsgesellschaft 2016; AWMF 2020). Auf den Erkenntnissen dieser Arbeit wären weitere Untersuchungen von Eap als potenzielles Therapeutikum für eine Instillationstherapie der Harnblase damit durchaus begründet. Als erste Erweiterung zu den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen könnten die Zellen um Bestandteile der extrazellulären Matrix und Kokultivierung mit Endothelzellen oder Fibroblasten, wie es beispielsweise im Rahmen des „Tissue Engineering“ etabliert wurde,

ergänzt werden (Metzger et al. 2011). Dabei sollte die Wirkung von Eap auch auf das Umfeld des Tumors untersucht werden. Durch die vielfältige Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix (Palma et al. 1999) verursacht Eap vermutlich noch viele weitere Wechselwirkungen. Anhand dieses erweiterten Modells könnte unter anderem auch die Wirkung von Eap auf die Neovaskularisierung des Tumorgewebes untersucht werden, die bekanntlich ab einer Tumorgroße von etwa 2 mm stattfindet (Bergers und Benjamin 2003). Im Zellkulturmodell wurde bereits gezeigt, dass die Neovaskularisierung durch eine Interaktion mit Endothelzellen, die sich Eap-induziert nicht mehr zu einem Kapillarbett formen konnten, inhibiert wurde (Sobke et al. 2006). Experimentell wurde dadurch ein um 45% reduzierter Blutfluss durch das Gewebemodell gemessen (Athanasopoulos et al. 2006). Eap würde sich über die Hemmung der Neovaskularisierung und die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen weiteren Wirkungen vermutlich stark auf die Bildung und Ausdehnung des NMIBC in der Blasenwand und die damit verbundene Progressions- und Rezidivwahrscheinlichkeit auswirken. Erst kürzlich publizierte Daten zeigen zudem, dass Eap auch die Aufnahme von Therapeutika-gefüllten Liposomen signifikant zu steigern vermag. Dabei wurde die Aufnahme von Eap-beschichteten Liposomen, die mit dem schlecht zellgängigen Therapeutikum Colistin gefüllt waren, in mit *Salmonella enterica*-infizierten Zellen getestet. (Menina et al. 2019). Jüngste, bis dato noch nicht veröffentlichte Daten des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Homburg weisen außerdem darauf hin, dass Eap auch die Pinozytose von eukaryonten Zellen erhöht (Roberts 2019). In Hinblick auf die Therapie von NMIBC wäre damit denkbar, dass Eap entweder als Adjuvans oder in Form Eap-beschichteter Liposomen, die mit einem Standardtherapeutikum wie Mitomycin C beladen sind, ergänzend therapeutisch eingesetzt wird. In Kombination könnten durch eine gesteigerte intrazelluläre Aufnahme des Zytostatikums, mit den damit einhergehenden Wirkungen, und den Effekten von Eap, wie Proliferationshemmung, Migrationshemmung und Reduktion der Neovaskularisierung, synergistische Effekte erzeugt werden, die eine relevante Verbesserung der Behandlung von nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen bewirken könnte.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abern, M R.; Owusu, R A.; Anderson, M R.; Rampersaud, E N.; Inman, B A. (2013) Perioperative intravesical chemotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. In: *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 11 (4), S. 477–484.
2. Amaral, R L. F.; Miranda, M; Marcato, P D.; Swiech, K (2017) Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. In: *Frontiers in physiology* 8, S. 605. DOI: 10.3389/fphys.2017.00605.
3. Athanasopoulos, A N.; Economopoulou, M; Orlova, V V.; Sobke, A; Schneider, D; Weber, H et al. (2006) The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. In: *Blood* 107 (7), S. 2720–2727. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3140.
4. AWMF (2020) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie, Nachsorge des Harnblasenkarzinoms. Langversion 2.0 (AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL). Online verfügbar unter <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/>, zuletzt geprüft am 11.08.2020.
5. Babjuk, M; Böhle, A; Burger, M; Capoun, O; Cohen, D; Compérat, E M. et al. (2017) EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. In: *European urology* 71 (3), S. 447–461. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.05.041.
6. Benner, C; Greenberg, M; Shepard, N; Meng, M V.; Rabow, M W. (2014) The natural history of symptoms and distress in patients and families following cystectomy for treatment of muscle invasive bladder cancer. In: *The Journal of Urology* 191 (4), S. 937–942. DOI: 10.1016/j.juro.2013.10.101.
7. Bergers, G; Benjamin, L E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. In: *Nature reviews. Cancer* 3 (6), S. 401–410. DOI: 10.1038/nrc1093.
8. Billis, A; Schenka, A A.; Ramos, C C.; Carneiro, L T.; Araújo, V (2001) Squamous and/or glandular differentiation in urothelial carcinoma: prevalence and significance in transurethral resections of the bladder. In: *International urology and nephrology* 33 (4), S. 631–633. DOI: 10.1023/A:1020597611645.
9. Bodén, M K.; Flock, J I. (1992) Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain Newman. In: *Microbial pathogenesis* 12 (4), S. 289–298.
10. Brausi, M; Witjes, J Alfred; Lamm, D; Persad, R; Palou, J; Colombel, M et al. (2011) A review of current guidelines and best practice recommendations for the management of

- nonmuscle invasive bladder cancer by the International Bladder Cancer Group. In: *The Journal of Urology* 186 (6), S. 2158–2167. DOI: 10.1016/j.juro.2011.07.076.
11. Bray, F; Ferlay, J; Soerjomataram, I; Siegel, R L.; Torre, L A.; Jemal, A (2018)Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (6), S. 394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.
  12. Brennan, P; Bogillot, O; Cordier, S; Greiser, E; Schill, W; Vineis, P et al. (2000)Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. In: *International journal of cancer* 86 (2), S. 289–294.
  13. Brennan, P; Bogillot, O; Greiser, E; Chang-Claude, J; Wahrendorf, J; Cordier, S et al. (2001)The contribution of cigarette smoking to bladder cancer in women (pooled European data). In: *Cancer causes & control : CCC* 12 (5), S. 411–417. DOI: 10.1023/A:1011214222810.
  14. Bruijn, E A. de; Sleeboom, H P.; van Helsdingen, P J.; van Oosterom, A T.; Tjaden, U R.; Maes, R A. (1992)Pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravesical mitomycin C upon different dwelling times. In: *International journal of cancer* 51 (3), S. 359–364.
  15. Bur, S; Preissner, K T.; Herrmann, M; Bischoff, M (2013)The Staphylococcus aureus extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. In: *The Journal of investigative dermatology* 133 (8), S. 2004–2012. DOI: 10.1038/jid.2013.87.
  16. Burger, M; Catto, J W. F.; Dalbagni, G; Grossman, H Barton; Herr, H; Karakiewicz, P et al. (2013)Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. In: *European urology* 63 (2), S. 234–241. DOI: 10.1016/j.eururo.2012.07.033.
  17. Cao, M; Yang, G; Pan, J; Sun, J; Chen, Q; Chen, Y et al. (2015)Repeated transurethral resection for non-muscle invasive bladder cancer. In: *International journal of clinical and experimental medicine* 8 (1), S. 1416–1419.
  18. Chaturvedi, A K.; Engels, E A.; Gilbert, E S.; Chen, B E.; Storm, H; Lynch, C F. et al. (2007)Second cancers among 104,760 survivors of cervical cancer: evaluation of long-term risk. In: *Journal of the National Cancer Institute* 99 (21), S. 1634–1643. DOI: 10.1093/jnci/djm201.
  19. Chavakis, T; Hussain, M; Kanse, S M.; Peters, G; Bretzel, R G.; Flock, J-I et al. (2002)Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. In: *Nature medicine* 8 (7), S. 687–693. DOI: 10.1038/nm728.

20. Chavakis, T; Preissner, K T.; Herrmann, M (2007)The anti-inflammatory activities of Staphylococcus aureus. In: *Trends in immunology* 28 (9), S. 408–418. DOI: 10.1016/j.it.2007.07.002.
21. Chavakis, T; Wiechmann, K; Preissner, K T.; Herrmann, M (2005)Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. In: *Thrombosis and haemostasis* 94 (2), S. 278–285. DOI: 10.1160/TH05-05-0306.
22. Chow, W H.; Lindblad, P; Gridley, G; Nyrén, O; McLaughlin, J K.; Linet, M S. et al. (1997)Risk of urinary tract cancers following kidney or ureter stones. In: *Journal of the National Cancer Institute* 89 (19), S. 1453–1457.
23. Deutsche Krebsgesellschaft, A (2016)S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom. S3-Leitlinie zur Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms. Langversion 1.1. Online verfügbar unter <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Harnblasenkarzinom.92.0.html>, zuletzt geprüft am 26.07.2018.
24. Dhillon, A S.; Hagan, S; Rath, O; Kolch, W (2007)MAP kinase signalling pathways in cancer. In: *Oncogene* 26 (22), S. 3279–3290. DOI: 10.1038/sj.onc.1210421.
25. Di Martino, E; Tomlinson, D C.; Knowles, M A. (2012)A Decade of FGF Receptor Research in Bladder Cancer: Past, Present, and Future Challenges. In: *Advances in urology* 2012, S. 429213. DOI: 10.1155/2012/429213.
26. Donin, N M.; Lenis, A T.; Holden, S; Drakaki, A; Pantuck, A; Beldegrun, A; Chamie, K (2017)Immunotherapy for the Treatment of Urothelial Carcinoma. In: *The Journal of Urology* 197 (1), S. 14–22. DOI: 10.1016/j.juro.2016.02.3005.
27. Duthie, E S.; Lorenz, L L. (1952)Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. In: *Journal of general microbiology* 6 (1-2), S. 95–107. DOI: 10.1099/00221287-6-1-2-95.
28. Eisenbeis, J (2019)Der Einfluss des multifunktionalen extrazellulären Adhäsionsproteins (Eap) von Staphylococcus aureus auf die Morphologie und Funktion von eukaryotischen Zellen. Unter Mitarbeit von Universität Des Saarlandes.
29. Eisenbeis, J; Peisker, H; Backes, C S.; Bur, S; Hölters, S; Thewes, N et al. (2017)The extracellular adherence protein (Eap) of Staphylococcus aureus acts as a proliferation and migration repressing factor that alters the cell morphology of keratinocytes. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 307 (2), S. 116–125. DOI: 10.1016/j.ijmm.2017.01.002.

30. Eisenbeis, J; Saffarzadeh, M; Peisker, H; Jung, P; Thewes, N; Preissner, K T. et al. (2018)The Staphylococcus aureus Extracellular Adherence Protein Eap Is a DNA Binding Protein Capable of Blocking Neutrophil Extracellular Trap Formation. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8, S. 235. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00235.
31. Epstein, J I.; Amin, M B.; Reuter, V R.; Mostofi, F K. (1998)The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. In: *The American journal of surgical pathology* 22 (12), S. 1435–1448.
32. Fitzgerald, K A.; Malhotra, M; Curtin, C M.; O' Brien, F J.; O' Driscoll, C M. (2015)Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 215, S. 39–54. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.07.020.
33. Folkman, J (1971)Tumor angiogenesis: therapeutic implications. In: *The New England journal of medicine* 285 (21), S. 1182–1186. DOI: 10.1056/NEJM197111182852108.
34. Garnett, M J.; Marais, R (2004)Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. In: *Cancer cell* 6 (4), S. 313–319. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.09.022.
35. Golin, A L.; Howard, R S. (1980)Asymptomatic microscopic hematuria. In: *The Journal of Urology* 124 (3), S. 389–391.
36. Grimm, M-O; Steinhoff, C; Simon, X; Spiegelhalder, P; Ackermann, R; Vogeli, T Alexander (2003)Effect of routine repeat transurethral resection for superficial bladder cancer: a long-term observational study. In: *The Journal of Urology* 170 (2 Pt 1), S. 433–437. DOI: 10.1097/01.ju.0000070437.14275.e0.
37. Hagggar, A; Ehrnfelt, C; Holgersson, J; Flock, J-I (2004)The extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus inhibits neutrophil binding to endothelial cells. In: *Infection and Immunity* 72 (10), S. 6164–6167. DOI: 10.1128/IAI.72.10.6164-6167.2004.
38. Hagggar, A; Shannon, O; Norrby-Teglund, A; Flock, J-I (2005)Dual effects of extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus on peripheral blood mononuclear cells. In: *The Journal of infectious diseases* 192 (2), S. 210–217. DOI: 10.1086/430948.
39. Hernández, V; Espinos, E Linares; Dunn, J; MacLennan, S; Lam, T; Yuan, Y et al. (2017)Oncological and functional outcomes of sexual function-preserving cystectomy compared with standard radical cystectomy in men: A systematic review. In: *Urologic oncology* 35 (9), 539.e17-539.e29. DOI: 10.1016/j.urolonc.2017.04.013.

40. Humphrey, P A.; Moch, H; Cubilla, A L.; Ulbright, T M.; Reuter, V E. (2016)The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. In: *European urology* 70 (1), S. 106–119. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.02.028.
41. Hussain, M; Becker, K; Eiff, C von; Peters, G; Herrmann, M (2001)Analogues of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. In: *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8 (6), S. 1271–1276. DOI: 10.1128/CDLI.8.6.1271-1276.2001.
42. Jönsson, K; McDevitt, D; McGavin, M H.; Patti, J M.; Höök, M (1995)*Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (37), S. 21457–21460.
43. Joost, I; Blass, D; Burian, M; Goerke, C; Wolz, C; Müller, L von et al. (2009)Transcription analysis of the extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* in authentic human infection and in vitro. In: *The Journal of infectious diseases* 199 (10), S. 1471–1478. DOI: 10.1086/598484.
44. Juanpere, N; Agell, L; Lorenzo, M; Muga, S de; López-Vilaró, L; Murillo, R et al. (2012)Mutations in *FGFR3* and *PIK3CA*, singly or combined with *RAS* and *AKT1*, are associated with *AKT* but not with *MAPK* pathway activation in urothelial bladder cancer. In: *Human pathology* 43 (10), S. 1573–1582. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.10.026.
45. Kamat, A M.; Flaig, T W.; Grossman, H Barton; Konety, B; Lamm, D; O'Donnell, M A. et al. (2015)Consensus statement on best practice management regarding the use of intravesical immunotherapy with BCG for bladder cancer. In: *Nature Reviews Urology* 12, 225 EP -. DOI: 10.1038/nrurol.2015.58.
46. Keller, J; Chiou, H-Y; Lin, H-C (2013)Increased risk of bladder cancer following diagnosis with bladder pain syndrome/interstitial cystitis. In: *Neurourology and urodynamics* 32 (1), S. 58–62. DOI: 10.1002/nau.22283.
47. Klint, P (1999)Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. In: *Front Biosci* 4 (1-3), d165. DOI: 10.2741/Klint.
48. Knowles, M et Al. (2015)Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. In: *Nature reviews. Cancer* 15 (1), S. 25–41. DOI: 10.1038/nrc3817.
49. Lamont, F R.; Tomlinson, D C.; Cooper, P A.; Shnyder, S D.; Chester, J D.; Knowles, M A. (2011)Small molecule FGF receptor inhibitors block FGFR-dependent urothelial carcinoma

- growth in vitro and in vivo. In: *British journal of cancer* 104 (1), S. 75–82. DOI: 10.1038/sj.bjc.6606016.
50. Lee, L Y.; Miyamoto, Y J.; McIntyre, B W.; Höök, M; McCrea, K W.; McDevitt, D; Brown, E L. (2002)The Staphylococcus aureus Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. In: *The Journal of clinical investigation* 110 (10), S. 1461–1471. DOI: 10.1172/JCI16318.
51. Lee, S-J; Cho, S-C; Lee, E-J; Kim, S; Lee, S-B; Lim, J-H et al. (2013)Interleukin-20 promotes migration of bladder cancer cells through extracellular signal-regulated kinase (ERK)-mediated MMP-9 protein expression leading to nuclear factor (NF-κB) activation by inducing the up-regulation of p21(WAF1) protein expression. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (8), S. 5539–5552. DOI: 10.1074/jbc.M112.410233.
52. Lightfoot, A J.; Rosevear, H M.; O'Donnell, M A. (2011)Recognition and treatment of BCG failure in bladder cancer. In: *TheScientificWorldJournal* 11, S. 602–613. DOI: 10.1100/tsw.2011.30.
53. Malmström, P-U; Sylvester, R J.; Crawford, D E.; Friedrich, M; Krege, S; Rintala, E et al. (2009)An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. In: *European urology* 56 (2), S. 247–256. DOI: 10.1016/j.eururo.2009.04.038.
54. McGavin, M H.; Krajewska-Pietrasik, D; Rydén, C; Höök, M (1993)Identification of a Staphylococcus aureus extracellular matrix-binding protein with broad specificity. In: *Infection and Immunity* 61 (6), S. 2479–2485.
55. Menina, S; Eisenbeis, J; Kamal, M Ashraf M.; Koch, M; Bischoff, M; Gordon, S et al. (2019)Bioinspired Liposomes for Oral Delivery of Colistin to Combat Intracellular Infections by Salmonella enterica. In: *Advanced healthcare materials*, e1900564. DOI: 10.1002/adhm.201900564.
56. Metzger, W; Sossong, D; Bächle, A; Pütz, N; Wennemuth, G; Pohlemann, T; Oberringer, M (2011)The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. In: *Cytotherapy* 13 (8), S. 1000–1012. DOI: 10.3109/14653249.2011.583233.
57. Moet, G J.; Jones, R N.; Biedenbach, D J.; Stilwell, M G.; Fritsche, T R. (2007)Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). In: *Diagnostic microbiology and infectious disease* 57 (1), S. 7–13. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.05.009.

58. Monami, G; Gonzalez, E M.; Hellman, M; Gomella, L G.; Baffa, R; Iozzo, R V.; Morrione, A (2006)Proepithelin promotes migration and invasion of 5637 bladder cancer cells through the activation of ERK1/2 and the formation of a paxillin/FAK/ERK complex. In: *Cancer research* 66 (14), S. 7103–7110. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0633.
59. Mostofi, F. K.; Sobin, L. H.; Torloni, H. (1973)Histological Typing of Urinary Bladder Tumours: World Health Organization (International histological classification of tumours). Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=0KgQtAEACAAJ>.
60. Mueller-Klieser, W (2000)Tumor biology and experimental therapeutics. In: *Critical reviews in oncology/hematology* 36 (2-3), S. 123–139.
61. Oddens, J; Brausi, M; Sylvester, R; Bono, A; van de Beek, C; van Andel, G et al. (2013)Final results of an EORTC-GU cancers group randomized study of maintenance bacillus Calmette-Guérin in intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the urinary bladder: one-third dose versus full dose and 1 year versus 3 years of maintenance. In: *European urology* 63 (3), S. 462–472. DOI: 10.1016/j.eururo.2012.10.039.
62. Palma, M; Haggar, A; Flock, J I. (1999)Adherence of Staphylococcus aureus is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. In: *Journal of bacteriology* 181 (9), S. 2840–2845.
63. Pan, J S.; Slocum, H K.; Rustum, Y M.; Greco, W R.; Gaeta, J F.; Huben, R P. (1989)Inhibition of implantation of murine bladder tumor by thiotepa in cauterized bladder. In: *The Journal of Urology* 142 (6), S. 1589–1593.
64. Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin; Silbernagl, Stefan (2014)Physiologie. S. 281. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme.
65. Patti, J M.; Allen, B L.; McGavin, M J.; Höök, M (1994)MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. In: *Annual review of microbiology* 48, S. 585–617. DOI: 10.1146/annurev.mi.48.100194.003101.
66. Peacock, S J.; Silva, I de; Lowy, F D. (2001)What determines nasal carriage of Staphylococcus aureus? In: *Trends in microbiology* 9 (12), S. 605–610.
67. Ploussard, G; Daneshmand, S; Efstathiou, J A.; Herr, H W.; James, N D.; Rödel, C M. et al. (2014)Critical analysis of bladder sparing with trimodal therapy in muscle-invasive bladder cancer: a systematic review. In: *European urology* 66 (1), S. 120–137. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.02.038.
68. Rampias, T; Vgenopoulou, P; Avgeris, M; Polyzos, A; Stravodimos, K; Valavanis, C et al. (2014)A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. In: *Nature medicine* 20 (10), S. 1199–1205. DOI: 10.1038/nm.3678.

69. Rieken, M; Xylinas, E; Kluth, L; Crivelli, J J.; Chrystal, J; Faison, T et al. (2014) Long-term cancer-specific outcomes of TaG1 urothelial carcinoma of the bladder. In: *European urology* 65 (1), S. 201–209. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.08.034.
70. RKI- Abteilung für Infektionsepidemiologie, Dr. Astrid Milde-Busch Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA. Stand: 19.05.2016.
71. Robert-Koch-Institut (2019) Krebs in Deutschland 2015/2016 (12). DOI: 10.25646/5977.
72. Roberts, L (2019) Auswirkungen des extrazellulären Adhärenzproteins aus *Staphylococcus aureus* auf die Zytokinausschüttung und Internalisierungsmechanismen epithelialer Zellen. Universität des Saarlandes.
73. Saika, T; Tsushima, T; Nasu, Y; Miyaji, Y; Saegusa, M; Takeda, K; Kumon, H (2010) Two instillations of epirubicin as prophylaxis for recurrence after transurethral resection of Ta and T1 transitional cell bladder cancer: a prospective, randomized controlled study. In: *World journal of urology* 28 (4), S. 413–418. DOI: 10.1007/s00345-009-0502-1.
74. Saluja, M; Gilling, P (2018) Intravesical bacillus Calmette-Guérin instillation in non-muscle-invasive bladder cancer: A review. In: *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 25 (1), S. 18–24. DOI: 10.1111/iju.13410.
75. Schneider, C A.; Rasband, W S.; Eliceiri, K W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. In: *Nature methods* 9 (7), S. 671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
76. Schneider, D; Liaw, L; Daniel, C; Athanasopoulos, A N.; Herrmann, M; Preissner, K T. et al. (2007) Inhibition of breast cancer cell adhesion and bone metastasis by the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus*. In: *Biochemical and biophysical research communications* 357 (1), S. 282–288. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.03.143.
77. Shang, P; Feng, J; Kwong, J; Wang, Z; Ping, T; Tian, J; Jiang, L; Yang, K et al. (2011) Intravesical Bacillus Calmette-Guérin versus epirubicin for Ta and T1 bladder cancer. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (5), CD006885. DOI: 10.1002/14651858.CD006885.pub2.
78. Shephard, E A.; Stapley, S; Neal, R D.; Rose, P; Walter, F M.; Hamilton, W T. (2012) Clinical features of bladder cancer in primary care. In: *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners* 62 (602), e598-604. DOI: 10.3399/bjgp12X654560.
79. Sobke, A C. S.; Selimovic, D; Orlova, V; Hassan, M; Chavakis, T; Athanasopoulos, A N. et al. (2006) The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* abrogates angiogenic responses of endothelial cells by blocking Ras activation. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (14), S. 2621–2623. DOI: 10.1096/fj.06-5764fje.

80. Soloway, M S.; Masters, S (1980)Urothelial susceptibility to tumor cell implantation: influence of cauterization. In: *Cancer* 46 (5), S. 1158–1163.
81. Statistisches Bundesamt DESTATISKrankheitskosten im Jahr 2015, zuletzt geprüft am 22.09.2018.
82. Svatek, R S.; Hollenbeck, B K.; Holmäng, S; Lee, R; Kim, S P.; Stenzl, A; Lotan, Y (2014)The economics of bladder cancer: costs and considerations of caring for this disease. In: *European urology* 66 (2), S. 253–262. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.01.006.
83. Sylvester, R J.; OOSTERLINCK, W; Holmang, S; Sydes, M R.; Birtle, A; Gudjonsson, S et al. (2016)Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? In: *European urology* 69 (2), S. 231–244. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.05.050.
84. Sylvester, R J.; OOSTERLINCK, W; van der Meijden, A P. M. (2004)A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. In: *The Journal of Urology* 171 (6 Pt 1), 2186-90, quiz 2435.
85. Sylvester, R J.; van der Meijden, A P. M.; OOSTERLINCK, W; Witjes, J Alfred; Bouffouix, C; Denis, L et al. (2006)Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. In: *European urology* 49 (3), 466-5; discussion 475-7. DOI: 10.1016/j.eururo.2005.12.031.
86. The MAK-Collection for Occupational Health and Safety (2002). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
87. Thompson, K M.; Abraham, N; Jefferson, K K. (2010)Staphylococcus aureus extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum. In: *FEMS microbiology letters* 305 (2), S. 143–147. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.01918.x.
88. Tomlinson, D C.; L'Hôte, C G.; Kennedy, W; Pitt, E; Knowles, M A. (2005)Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor 3 produces a secreted isoform that inhibits fibroblast growth factor-induced proliferation and is repressed in urothelial carcinoma cell lines. In: *Cancer research* 65 (22), S. 10441–10449. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1718.
89. Tong, S Y. C.; Davis, J S.; Eichenberger, E; Holland, T L.; Fowler, V G. (2015)Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical

- manifestations, and management. In: *Clinical microbiology reviews* 28 (3), S. 603–661. DOI: 10.1128/CMR.00134-14.
90. Travis, L B.; Curtis, R E.; Glimelius, B; Holowaty, E J.; van Leeuwen, F E.; Lynch, C F. et al. (1995)Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. In: *Journal of the National Cancer Institute* 87 (7), S. 524–530.
91. Turner, A G.; Hendry, W F.; Williams, G B.; Wallace, D M. (1977)A haematuria diagnostic service. In: *British Medical Journal* 2 (6078), S. 29–31.
92. Vasyutin, I; Zerihun, L; Ivan, C; Atala, A (2019)Bladder Organoids and Spheroids: Potential Tools for Normal and Diseased Tissue Modelling. In: *Anticancer research* 39 (3), S. 1105–1118. DOI: 10.21873/anticancer.13219.
93. Vermeulen, S H.; Hanum, N; Grotenhuis, A J.; Castaño-Vinyals, G; van der Heijden, A G.; Aben, K K. et al. (2015)Recurrent urinary tract infection and risk of bladder cancer in the Nijmegen bladder cancer study. In: *British journal of cancer* 112 (3), S. 594–600. DOI: 10.1038/bjc.2014.601.
94. Vidal, M; Regufe da Mota, R; Hayden, S; Markham, S; Douglas, H; Packham, J et al. (2018)Epidermal Growth Factor Receptor Family Inhibition Identifies P38 Mitogen-activated Protein Kinase as a Potential Therapeutic Target in Bladder Cancer. In: *Urology* 112, 225.e1-225.e7. DOI: 10.1016/j.urology.2017.10.041.
95. Vom Dorp, F; Pal, P; Tschirdewahn, S; Rossi, R; Börgermann, C; Schenck, M et al. (2011)Correlation of pathological and cytological-cytometric grading of transitional cell carcinoma of the urinary tract. In: *Urologia internationalis* 86 (1), S. 36–40. DOI: 10.1159/000321017.
96. Werner, E; Werb, Z (2002)Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. In: *The Journal of cell biology* 158 (2), S. 357–368. DOI: 10.1083/jcb.200111028.
97. Wertheim, H F. L.; Melles, D C.; Vos, M C.; van Leeuwen, W; van Belkum, A; Verbrugh, H A.; Nouwen, J L. (2005)The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. In: *The Lancet. Infectious diseases* 5 (12), S. 751–762. DOI: 10.1016/S1473-3099(05)70295-4.
98. Witjes, J Alfred (2016)The Final Answer to the Question of Whether We Should Use a Single Postoperative Instillation of Chemotherapy After Resection of pTa and pT1 Bladder Tumors. In: *European urology* 69 (2), S. 245–246. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.07.035.
99. Wittekind, Christian (Hg.) (2017)TNM - Klassifikation maligner Tumoren. Union for International Cancer Control; Wiley-VCH. Achte Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag

GmbH & Co. KGaA. Online verfügbar unter <http://www.wiley-vch.de/publish/dt/books/ISBN978-3-527-34280-8/>.

100. Woehl, J L.; Ramyar, K X.; Katz, B B.; Walker, J K.; Geisbrecht, B V. (2017) The structural basis for inhibition of the classical and lectin complement pathways by *S. aureus* extracellular adherence protein. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 26 (8), S. 1595–1608. DOI: 10.1002/pro.3195.
101. Yousif, Y; Schiltz, E; Okada, K; Batsford, S; Vogt, A (1994) Staphylococcal neutral phosphatase. A highly cationic molecule with binding properties for immunoglobulin. In: *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 102 (12), S. 891–900.

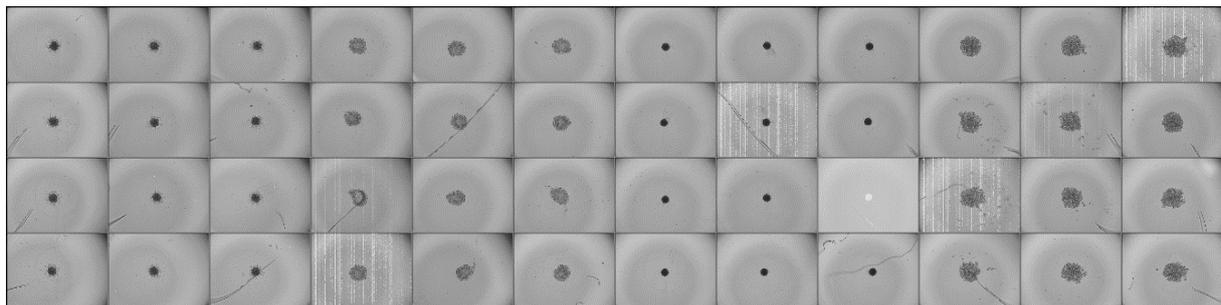
## 8. Anhang

### Anhangsverzeichnis:

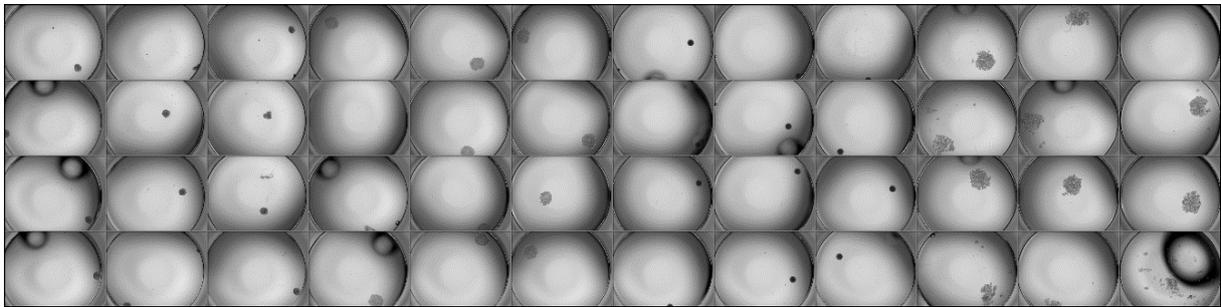
Anhang 1: Wiederaussaat der Sphäroide vor dem Umsetzen der Sphäroide. ....84

Anhang 2: Wiederaussaat der Sphäroide nach dem Umsetzen der Sphäroide.....85

Anhang 1: Wiederaussaat der Sphäroide vor dem Umsetzen der Sphäroide. Die Abbildung zeigt eine Übersichtsaufnahme der gesamten Well-Platte mit Rundböden, auf der die Zellen 24 h angewachsen waren. Die Aufnahme erfolgte vor der *in vitro* Instillationstherapie. Auf den ersten 3 Wells von links wächst die Zelllinie RT-4, in Well 5-7 von links RT-112, Well 8-10 5637 und Well 9-12 UMUC-3. Von oben nach unten waren die Zellen aus Reihe 1 die unbehandelten Kontrollen, Reihe 2 wurde mit 10 und Reihe 3 mit 40 µg/ml Eap inkubiert. Reihe 4 stellt die zweite Kontrolle, die mit denaturiertem Eap behandelt wurde, dar.



Anhang 2: Wiederaussaat der Sphäroide nach dem Umsetzen der Sphäroide. Fotografische Kontrolle direkt nach dem Umsetzen der Sphäroide in eine 96-Well-Platte mit Flachboden. Die Zellen wurden kurz vor dem Umsetzen der *in vitro* Instillationstherapie unterzogen. Die Abbildung zeigt eine Übersichtsaufnahme der gesamten Well-Platte mit Rundboden, auf der die Zellen 24 h angewachsen waren. Die Aufnahme erfolgte vor der *in vitro* Instillationstherapie. Auf den ersten 3 Wells von links wächst die Zelllinie RT-4, in Well 5-7 von links RT-112, Well 8-10 5637 und Well 9-12 UMUC-3. Von oben nach unten waren die Zellen aus Reihe 1 die unbehandelten Kontrollen, Reihe 2 wurde mit 10 und Reihe 3 mit 40  $\mu\text{g/ml}$  Eap inkubiert. Reihe 4 stellt die zweite Kontrolle, die mit denaturiertem Eap behandelt wurde, dar.



## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei dem Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben. Zuerst zu nennen ist mein Doktorvater, Herr Professor Dr. Markus Bischoff, der mir dieses Projekt anbot und damit diese Arbeit überhaupt erst möglich machte. Die vielen produktiven Gespräche, die neuen Denkanstöße, die Korrekturen und das regelmäßige Feedback trugen maßgeblich zu dem Gelingen meiner ersten wissenschaftlichen Arbeit bei. Daneben stand mir meine Betreuerin Dr. Janina Eisenbeis allseits mit Rat und Tat zur Seite. Sie arbeitete mich in die Zellkultur ein, wies mich in die Gerätschaften des Labors ein und stand allseits für offene Fragen, Probleme und Diskussionen zur Verfügung. Auch die Zusammenarbeit mit meinem Laborpartner Frederik Runge erleichterte mir die Arbeit im Labor und darüber hinaus sehr. Karin Hilgert danke ich ebenfalls für die Einweisung in das Labor, für das „Suchen-helfen“ von Labormaterialien und ihre allseits freundliche, erfahrene Organisation des täglichen Laborablaufs. Weitere Mitarbeiter der Forschungsgruppe wie Linda Pätzold, Mohamed I. Elhawy, Gubesh Gunaratnam und Dr. Philipp Jung standen mir, egal ob am Wochenende oder spät abends, immer tatkräftig zur Seite. Ich danke auch Frau Prof. Dr. Kerstin Junker für die Kooperation mit ihrer Forschungsgruppe der Klinik für Urologie in Homburg, die mir die verwendeten Zelllinien zur Verfügung stellte und ebenfalls für Rückfragen zur Verfügung stand.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei allen, die auch nur die kleinste rote Notiz am Rande vermerkt haben sehr. Im besonderen Maße gebührt mein Dank meiner Familie sowie Raija, Ina, Niklas, Sol und vielen weiteren Freunden für ihr offenes Ohr und ihre moralische Unterstützung. Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern von ganzem Herzen bedanken. Ohne ihren Rückhalt und die ständige Unterstützung jeglicher Art wäre meine gesamte Ausbildung, insbesondere diese wissenschaftliche Arbeit, nicht möglich gewesen.

## **10. Lebenslauf**

**Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.**