

Aus der Kinderklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. C. Härtel

**Isolation und Charakterisierung primärer  
Harnblasenkarzinomzellen**

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Ina Helene Darmstädter  
aus Margetshöchheim

Würzburg, März 2021

Referent bzw. Referentin: apl. Prof. Dr. med. M. Wöfl

Korreferent bzw. Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. med. H. Kübler

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2021

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Das Harnblasenkarzinom.....	1
1.1.1 Pathologie: Makroskopie, Histologie und Klassifikation von Tumoren der Harnblase.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	4
1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren.....	5
1.1.4 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms.....	7
1.1.5 Therapie des Harnblasenkarzinoms.....	10
1.1.6 Prognose.....	13
1.2 Tumorstammzellen.....	13
1.2.1 Tumorstammzelltheorie.....	13
1.2.2 Identifikation von Tumorstammzellen.....	14
1.2.3 Charakterisierung und Forschungsstand spezifischer Oberflächenmarker.....	17
1.2.4 Forschungsergebnisse zu Tumorstammzellen im Harnblasenkarzinom.....	20
1.3 Zielsetzung.....	22
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.1 Laborgeräte.....	23
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	25
2.3 Medien, Puffer und Lösungen.....	26
2.4 Zellkulturmedien.....	28
2.5 Kits.....	29
2.6 Microbeads.....	29
2.7 Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle.....	29
2.8 Software.....	30
2.9 Zelllinien.....	31
2.10 Patientenkollektiv und Probenmaterial.....	32
2.11 Herstellung der Einzelzellsuspension.....	36
2.12 Bestimmung der Zellzahl.....	36
2.13 Magnet-assoziierte Zellsortierung.....	37
2.14 Depletion von CD45 und CD31 positiven Zellen.....	39
2.15 Gewinnung einer CD44 positiven und negativen Zellfraktion.....	40
2.16 Durchflusszytometrie.....	40
2.17 Bestimmung der viablen Zellen mittels 7-Aminoactinomycin.....	42
2.18 Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	43
2.19 Isotypenkontrolle.....	43

2.20 Fluorescence Minus One (FMO)-Methode .....	44
2.21 Zellkultur der Tumorproben .....	44
2.22 Zellkultur der Zelllinien .....	44
2.23 Messung der Aldehyddehydrogenase-Aktivität .....	45
2.24 Statistische Analyse .....	47
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
3.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension und Aufreinigung mittels Magnet-aktivierter Zellsortierung .....	47
3.1.1 Herstellung der Einzelzellsuspension, Gewicht, Vitalität und Zellzahl .....	47
3.1.2 Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen .....	51
3.1.3 Anreicherung der CD44 positiven Zellen, Vergleich mit der CD44 negativen Zellfraktion .....	56
3.2 Identifikation von CD47 und CD326 positiven Zellpopulationen .....	60
3.3 Zellkultur .....	62
3.4 Identifikation von Zellpopulationen mit Stammzellcharakter .....	63
3.4.1 Identifikation von ALDH <sup>high</sup> Zellpopulationen in den Operationspräparaten.....	63
3.4.2 Aldehyddehydrogenase-Aktivität im Harnblasenkarzinom, CD44, CD47, CD133, CD326 und CD338 Koexpression .....	65
3.4.3 Aldehyddehydrogenase-Aktivität der Zelllinien RT4, J82T24, TCCSUP, R11, R28, A1207, MB3W1 .....	69
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>73</b>
4.1 Bereitstellung der Tumorproben und Herstellung einer Einzelzellsuspension.....	74
4.2 Magnet-assoziierte Zellsortierung .....	75
4.3 Zellkultur .....	78
4.4 Isotypenkontrolle.....	79
4.5 Nachweis der Expression von CD44, CD47 und CD326 im Harnblasenkarzinom .	80
4.6 Identifikation von ALDH <sup>high</sup> Zellpopulationen in den Operationspräparaten.....	81
4.7 ALDH-Aktivität im Harnblasenkarzinom, CD44, CD47, CD133, CD326 und CD338 Koexpression.....	83
4.8 Identifikation von ALDH <sup>high</sup> Zellpopulationen in den Zelllinien .....	85
4.9 Fazit.....	86
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>87</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>106</b>

<b>9. Abkürzungen .....</b>	<b>108</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>110</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>110</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Harnblasenkarzinom

### 1.1.1 Pathologie: Makroskopie, Histologie und Klassifikation von Tumoren der Harnblase

In der neuen *WHO (World Health Organisation)*-Klassifikation von 2016 werden die Tumore des Harntraktes in zehn Gruppen eingeteilt (Humphrey, Moch, Cubilla, Ulbright, & Reuter, 2016). Etwa 95% aller Blasenkarzinome sind urothelialen Ursprungs und weisen ein papilläres oder solides Tumorwachstum auf. Bei rund 5% lassen sich Adeno- und Plattenepithelkarzinome unterscheiden. Adenokarzinome machen dabei einen Anteil von 0,2-2% aus und sind damit nur sehr selten zu finden (Dorp, Schatzl, Rübben, & Steiner, 2010). Zu den weiteren, in der *WHO*-Klassifikation aufgeführten, Tumoren der Harnblase, die aber nur sehr selten nachzuweisen sind, gehört das Urachuskarzinom, der Müllersche Misch tumor, neuroendokrine Tumore, melanozytische Tumore, mesenchymale Tumore, hämatopoetische und lymphoide Tumore und sonstige, nicht zu den anderen Kategorien, gehörende Tumore. Zu der letztgenannten Gruppe gehören unter anderem die sekundären Harnblasentumore, die durch Metastasierung entstehen. Hierbei ist ein infiltratives Wachstum ausgehend von Tumoren des weiblichen Genitaltraktes, des Prostata- und Kolonkarzinoms und Fernmetastasen durch das maligne Melanom und durch Magen-, Mamma- und Bronchialkarzinome zu unterscheiden. Diese 10 Gruppen wurden in der *WHO*-Klassifikation hinsichtlich histopathologischer Eigenschaften weiter unterteilt (Humphrey et al., 2016).

Im Rahmen der TNM-Klassifikation (Tabelle 1) erfolgt eine Unterteilung des Harnblasenkarzinoms hinsichtlich verschiedener klinischer und histopathologischer Merkmale (Grignon, 2009; Kotake et al., 1995). Das „T“ impliziert dabei mit aufsteigender Zahl die Eindringtiefe des Tumors in die Blasenwand, „N“ den Lymphknotenstatus und der Buchstabe „M“, ob Fernmetastasen vorliegen. Zudem sind zur weiteren Beschreibung der TNM-

Klassifikation Präfixe üblich. Unter anderem bedeutet „p“ dabei, dass die TNM-Klassifikation durch einen Pathologen ermittelt wurde, ein „c“ im Gegensatz dazu, dass die Klassifikation klinisch eingeschätzt wurde (Brierley, 2017). Anhand der TNM-Klassifikation erfolgt eine weitere Einteilung in verschiedene Stadiengruppen (Tabelle 2) (Crundwell, 2004; Grignon, 2009). Die TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung lässt die Prognose abschätzen und spielt eine wichtige Rolle bei der Therapieentscheidung.

Eine weitere Unterteilung der Tumore erfolgt nach dem *Grading*-System, das heißt nach der histologischen Differenzierung der Tumorzellen (Tabelle 3). Das *Grading*-System spielt vor allem eine Rolle bei den nichtinvasiven Urothelkarzinomen. Zwar ist auch ein geringer Anteil von invasiven Blasenkarzinomen als *low-grade* Karzinom einzustufen, bei etwa 95% handelt es sich allerdings um *high-grade* Karzinome (Zhang, Wang, Sun, & Yu, 2012). Im Rahmen der Klassifikation der *WHO* von 1973 erfolgte die Unterscheidung des urothelialen Harnblasenkarzinoms in ein benignes urotheliales Papillom und in die Differenzierungsgrade 1-3 (Mostofi, Sobin, Torloni, & World Health, 1973). Da die Einteilung in G1-G3, aufgrund unzureichender Definitionen der einzelnen Grade, zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen mit schlechter Reproduzierbarkeit und damit zu unterschiedlichen Diagnosen geführt hatte, wurde eine neue Klassifikation angestrebt (Grignon, 2009; Miyamoto et al., 2010). Im Jahr 1998 wurde von der *WHO* und *ISUP* (*International Society of Urological Pathology*) eine neue Klassifikation entwickelt, die 2004 von der *WHO* veröffentlicht wurde (Epstein, Amin, Reuter, & Mostofi, 1998). In dieser Klassifikation erfolgte eine Einteilung des nicht invasiven Urothelkarzinom in die histomorphologischen Tumorgade *low-* und *high-grade*. Hiervon wurden papilläre hochdifferenzierte Tumore, die sog. *PUNLMP* (*Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential*) abgegrenzt. Invasive Urothelkarzinome werden in der Klassifikation von 2004 immer als *high-grade* eingestuft (Alfred Witjes et al., 2017). 2016 erfolgte eine weitere Überarbeitung zu der aktuellen Klassifikation (Humphrey et al., 2016). Da sich die Publikationen überwiegend auf die Klassifikationssysteme von 1973 und 2004 beziehen und klinisch weiterhin das Klassifikationssystem von 1973 angewendet wird, sind diese hier aufgeführt.

Nach einer operativen Therapie wird zusätzlich das Fehlen oder Vorhandensein eines Residualtumors mit der R-Klassifikation beschrieben (Tabelle 4).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms

<b>T – Tumorinfiltrationstiefe</b>		
Tx		Tumor kann nicht beurteilt werden
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
Ta		Nicht invasiver papillärer Tumor
TIS		<i>Carcinoma in situ</i>
T1		Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2		Tumor infiltriert die Muskulatur
	T2a	Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
	T2b	Tumor infiltriert äußere Muskulatur (äußere Hälfte)
T3		Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe
	T3a	Mikroskopisch
	T3b	Makroskopisch
T4		Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina oder Becken-/Bauchwand
	T4a	Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina
	T4b	Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand
<b>N - Regionäre Lymphknoten</b>		
NX		Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		Kein Anhalt für Befall der regionären Lymphknoten
N1		Metastase in solitärem Lymphknoten $\leq 2$ cm in größter Ausdehnung
N2		Metastase in solitärem Lymphknoten $> 2$ cm, aber $\leq 5$ cm in größter Ausdehnung oder multiple Lymphknoten $< 5$ cm
N3		Metastasen in Lymphknoten $> 5$ cm in größter Ausdehnung
<b>M – Metastasen</b>		
MX		Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0		Keine Fernmetastasen

M1		Fernmetastasen, diese finden sich vor allem in Lunge, Leber und Knochen.
----	--	--

Tabelle 2: Stadiengruppierung des Harnblasenkarzinoms

Stadium 0a	Ta	N0	M0
Stadium 0is	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2a, T2b	N0	M0
Stadium III	T3a, T3b, T4a	N0	M0
Stadium IV	T4b	N0	M0
	Jedes T	N1, N2, N3	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 3: Grading

GX	Grad kann nicht beurteilt werden
G1	Gewebe gut differenziert ( <i>low grade</i> )
G2	Gewebe mäßig differenziert ( <i>intermediate grade</i> )
G3	Gewebe schlecht differenziert ( <i>high grade</i> )

Tabelle 4: R-Status nach der operativen Therapie

Rx	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor nachweisbar
R1	Residualtumor mikroskopisch nachweisbar
R2	Residualtumor makroskopisch nachweisbar

### 1.1.2 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom gehört zu den häufigsten Tumorerkrankungen des Menschen. 2012 stand das Harnblasenkarzinom beim Mann an der vierten und bei Frauen an der vierzehnten Stelle der häufigsten Tumorlokalisationen bei Krebsneuerkrankungen in Deutschland. Nach Daten des Robert Koch-Institutes von 2015 erkrankten 2012 15.400 Menschen in Deutschland an einem invasiven

Harnblasenkarzinom, in etwa einem Viertel davon handelte es sich um Frauen. Mehr als 13.500 erkrankten an nicht invasiven papillären Karzinomen und in situ Tumoren der Blase. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2012 für Männer bei 74 Jahren und für Frauen bei 76 Jahren. Die relative Überlebensrate nach zehn Jahren lag 2012 für Männer bei 52% und für Frauen bei 44%. Die günstigere Überlebensrate bei Männern lässt sich durch die günstigere Verteilung der Tumorstadien bei Erstdiagnose erklären (37% bei Männern gegenüber 47% bei Frauen mit T1 Stadium bei Erstdiagnose) (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015).

### 1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Eine Reihe von ätiologischen Faktoren sind mit der Entstehung von Harnblasenkarzinomen assoziiert, wobei in industrialisierten Ländern Zigaretten den wesentlichen Risikofaktor darstellen (Johansson & Cohen, 1997). Das Risiko an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken korreliert dabei linear mit der Dauer und Menge des Tabakkonsums (Brennan et al., 2000).

Als weiterer Risikofaktor gelten aromatische Amine (2-Naphthylamin, Benzidin, 4-Aminobiphenyl). Betroffen sind unter anderem Arbeiter in der Farbstoff-, Textil-, Chemieindustrie und Friseure. Blasenkrebs wird daher bei betroffenen Arbeitern dieser Berufsgruppen als Berufskrankheit anerkannt (Hueper, 1942; Johansson & Cohen, 1997). Zu berücksichtigen ist allerdings die lange Latenzzeit für beruflich bedingte Harnblasenkarzinome. So betrug der Mittelwert der Latenzzeit, der im Zeitraum zwischen 1978 bis 2010 durch die gewerbliche Berufsgenossenschaft anerkannten Fälle, 37,9 Jahre (Standardabweichung 14,1 Jahre) (Butz, M. 2012).

Als ein weiterer Risikofaktor gelten chronische Entzündungen der Harnblase mit *Schistosoma haematobium*. Eine chronische Entzündung durch *S. haematobium* hat dabei ein vermehrtes Auftreten vor allem von Plattenepithelkarzinomen gezeigt (Murta-Nascimento et al., 2007). Ebenso führt eine chronische Strahlentherapie des Beckens zu einem erhöhten Risiko an einem Blasenkarzinom zu erkranken.

Als weiterer iatrogener Risikofaktor ist die Einnahme bestimmter Medikamente zu erwähnen. Hierzu gehört Phenacetin, ein Analgetikum welches seit 1983 nicht mehr im Handel ist (McCredie, Ford, Taylor, & Stewart, 1982). Das Immunsuppressivum Cyclophosphamid kann eine hämorrhagische Zystitis auslösen und dadurch die Entstehung von Blasenkrebs begünstigen (Monach, Arnold, & Merkel, 2010; Pedersen-Bjergaard et al., 1988). Um diese bekannte unerwünschte Arzneimittelwirkung zu verhindern, wird die Einnahme von Cyclophosphamid mit der Einnahme von Mesna (2-Mercaptoethansulfonat-Natrium) kombiniert (Andriole et al., 1987). In neueren Studien zeigte das Antidiabetikum Pioglitazon ein erhöhtes Krebsrisiko und wurde 2013 von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) als wahrscheinlich krebserregend eingestuft (Gruppe 2a). Für das gleichermaßen zu den Thiazolidindione gehörende Rosiglitazon konnte diese Assoziation nicht nachgewiesen werden (Azoulay et al., 2012).

Zudem wurde ein Zusammenhang zwischen chloriertem Wasser und der erhöhten Inzidenz von Harnblasenkarzinomen untersucht. Als ursächlich werden vor allem Arsen und chemische Nebenprodukte, wie THM (Trihalomethane), die bei der Wasseraufbereitung entstehen, angesehen (Cantor, 1997). Studien hierzu kamen bisher zu unterschiedlichen Ergebnissen (King & Marrett, 1996; Michaud et al., 2007). Arsen im Trinkwasser führt zu einem erhöhten Harnblasenkarzinom Risiko (Baris et al., 2016; Fernandez, Lopez, Vivaldi, & Coz, 2012). Des Weiteren wurde für Nitrat im Trinkwasser eine kanzerogene Wirkung angenommen. Studien hierzu waren allerdings bislang nicht eindeutig (Espejo-Herrera et al., 2015; Jones et al., 2016).

Künstliche Süßungsmittel (Cyclamat und Saccharin) führen zu keinem erhöhten Risiko ein Harnblasenkarzinom zu entwickeln (Elcock & Morgan, 1993). Ein Zusammenhang zwischen dem Konsum von Kaffee und einem erhöhten Risiko an einem Urothelkarzinom zu erkranken wird bereits seit den 1970er Jahren vermutet (Cole, 1971). Weitere Studien veröffentlichten widersprüchliche Ergebnisse (Bruemmer, White, Vaughan, & Cheney, 1997; Hartge, Hoover, West, & Lyon, 1983). Eine Studie aus dem Jahr 2015 zeigte ein erhöhtes Risiko bei Männern und Nichtrauchern mit hohem Kaffeekonsum (W. Wu et al., 2015).

Gleichermaßen kamen auch Studien, die einen Zusammenhang zwischen Alkohol und dem erhöhten Risiko an einem Blasenkarzinom zu erkranken untersuchten, zu unterschiedlichen Ergebnissen. In den meisten Studien konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden (Djousse et al., 2004; Jiang et al., 2007; Pelucchi, Negri, Franceschi, Talamini, & La Vecchia, 2002). Darüber hinaus konnten auch familiäre Häufungen beobachtet werden. Hierbei wurden unter anderem N-acetyltransferase 2 (NAT2) Varianten und ein Glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1)–Null Genotyp als genetische Risikofaktoren nachgewiesen, wobei diese Faktoren vermutlich nicht ursächlich wirken, sondern nur das Risiko für das Entstehen eines Harnblasenkarzinoms bei Vorhandensein von anderen Karzinogenen erhöhen (M. Burger et al., 2013). Einen schützenden Effekt scheint dagegen eine ausgewogene Ernährung mit viel Obst und Gemüse zu haben (Murta-Nascimento et al., 2007).

#### **1.1.4 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms**

Patienten mit einem Harnblasenkarzinom stellen sich oft mit einer schmerzlosen Hämaturie vor. Das Blut im Urin kann sowohl makroskopisch sichtbar sein (Makrohämaturie) oder auch nicht sichtbar sein (Mikrohämaturie). Dieses Symptom ist jedoch nicht spezifisch für ein Harnblasenkarzinom und kann auch bei anderen urologischen Erkrankungen auftreten. Als weiteres Symptom treten unspezifische Reizsymptome wie Dysurie, Drangsymptomatik und Pollakisurie auf. Anamnestisch ist jede Veränderung des Miktionsverhaltens zu erfragen, des Weiteren sollten unter anderem auch die erwähnten Risikofaktoren und Vorerkrankungen erfragt werden (Dorp et al., 2010). Schmerzen sind selten und treten vor allem in späteren Stadien auf, wenn zum Beispiel durch den Tumor der Harnabfluss behindert wird. Weitere Symptome können auch durch Metastasierung des Primärtumors entstehen.

Neben der klinischen Untersuchung, mit einer ausführlichen Untersuchung des Abdomens und Abtasten von Becken, Nieren und des Genitalbereichs, sollte der gesamte Harntrakt sonographisch untersucht werden. Des Weiteren kann auch ein Ausscheidungsurogramm einen exophytisch wachsenden Tumor

nachweisen. Zudem sollte eine Urinuntersuchung erfolgen. Im Urin können sowohl Erythrozyten, also eine Mikrohämaturie, nachgewiesen, als auch eine Urinzytologie durchgeführt werden. Außerdem kann der Urin auf bestimmte Tumormarker untersucht werden. Die Urinzytologie ist ein sehr spezifisches diagnostisches Mittel. Sie ist abhängig von Qualität und Verarbeitung des Urins, von der Erfahrung des Untersuchers, dem *Grading* des Tumors, sowie der Größe des Tumors. Die abgeschilferten Zellen im Urin werden auf Malignitätskriterien, wie der Kerngröße und Kernform, Hyperchromasie, vergrößerter Nukleoli, einer verdickten Kernmembran und Anisokaryose untersucht. Da diese Kernveränderungen bei zunehmender Entdifferenzierung mit einer höheren Sicherheit festgestellt werden können, zeigt diese Untersuchung vor allem bei *high-grade* (G2, G3) Urothelkarzinomen eine Sensitivität von bis zu 78%- 94% (F. M. Brown, 2000; Koss, Deitch, Ramanathan, & Sherman, 1985; Planz et al., 2005). Zudem zeichnet sich die Urinzytologie durch eine hohe Spezifität aus (Glas et al., 2003; Raisi et al., 2012). Ein weiteres diagnostisches Verfahren weist molekulare Zellbestandteile im Urin nach, die bei Urothelkarzinomen vorkommen. Zu diesen Blasentumormarkersystemen gehören unter anderem der NMP 22-Test, der *Bladder Tumor Antigen*-Test (*BTA-STAT/TRAK*-Test) und der *Urinary Bladder Cancer Antigen*-Test (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016). Die Literatur zu den Tumormarkern ist sehr heterogen und entspricht kaum standardisierten Kriterien, eine Anwendung zur Früherkennung eines Blasenkarzinoms ist in den Leitlinien der DGU nicht empfohlen (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016). Eine weitere Methode ist die zellgebundene Urindiagnostik. Hierbei werden markierte Zellen im Urin ausgezählt. Hierzu zählt das *uCyt+™/ImmunoCyt™* Verfahren, bei dem durch Fluoreszenz markierte Antikörper, wie zum Beispiel das häufig auf malignen Urothelzellen vorkommende CEA (Carcinoembryonales Antigen) und Mucine (MO344, LDQ10) nachgewiesen werden. Der Test ist FDA zugelassen in Verbindung mit der Urinzytologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016).

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH, UroVysion®) werden chromosomale Veränderungen, die häufig beim Urothelkarzinom vorkommen, nachgewiesen. Der Test ist sehr aufwendig und bedarf einer hohen Erfahrung des Untersuchers. In den USA besteht eine FDA-Zulassung für die Diagnostik bei Makrohämaturie und bei der Nachsorge des nicht muskelinvasiven Blasenkarzinoms (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016).

EGFR (*epidermal growth factor receptor*) kann mittels Immunfärbung auf Urothelzellen nachgewiesen werden. Die EGFR Positivität korreliert dabei mit einem schlechteren Differenzierungsgrad und dem klinischen Stadium (Neal et al., 1990). Des Weiteren kann das Cytokeratin 20 auf Urothelzellen immunhistochemisch nachgewiesen werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016).

Gesichert wird die Diagnose durch die Zystoskopie, das heißt durch Spiegelung der Blase mit transurethraler Resektion des Tumors (TUR-Blase) und histologischer Untersuchung. Zusätzlich sollten auch Biopsien aus der normal erscheinenden Harnblasenschleimhaut und aus dem durch die Prostata verlaufenden Teil der Harnröhre entnommen werden. Als Standard der Primärdiagnostik soll die Weißlicht-Zystoskopie angewendet werden, die Zystoskopie weist allerdings eine Sensitivität zwischen 62%-84% und eine Spezifität zwischen 43% und 98% auf und ist sehr untersucherabhängig (Jocham, Stepp, & Waidelich, 2008). Schwierig gestaltet sich vor allem die Detektion von kleinen papillären Tumoren und von *Carcinoma in situ* (CIS) mittels Weißlicht-Zystoskopie (Filbeck, Pichlmeier, Knuechel, Wieland, & Roessler, 2002). Durch Photodynamische Diagnostik (PDD) kann die Detektionsrate noch gesteigert werden. Dieses Verfahren kann in der Primärdiagnostik eingesetzt werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016). Dabei wird ein bis zwei Stunden vor der Zystoskopie ein Fluoreszenzfarbstoff in die Harnblase eingebracht. Bei diesem rot-fluoreszierenden Farbstoff (Hexyl-Aminolävulinsäure; HAL; Hexvix®) handelt es sich um ein Porphyrin, welches sich vor allem in malignen Zellen ablagert.

Dadurch können die benignen und malignen Zellen bei der Zystoskopie besser abgegrenzt werden (Fradet et al., 2007).

Anschließend folgt die bildgebende Diagnostik. Bei der Erstdiagnose eines nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms (NMIBC) wird außer der Sonographie keine routinemäßige Diagnostik empfohlen. Bei einer Tumorlokalisation im Trigonum, *high-grade* Tumoren oder multiplen Tumoren wird dagegen eine mehrphasige CT mit Kontrastmittel mit CT-Urographie des gesamten Urothels empfohlen (alternativ MRT mit MR-Urographie, Ausscheidungsurogramm). Handelt es sich um einen muskelinvasiven Tumor wird für das *Staging* eine Computertomographie des Abdomens (mit CT-Urographie), des Beckens und des Thorax mit Kontrastmittel empfohlen. Bei klinischer Symptomatik sollte zudem eine kraniale CT und eine Knochenszintigraphie erfolgen (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016).

### **1.1.5 Therapie des Harnblasenkarzinoms**

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms hängt von dem Tumorstadium und dem Differenzierungsgrad des Tumors ab. Diese Faktoren bestimmen zusammen die Progressionswahrscheinlichkeit. Bei etwa 70% bis 80% der Patienten kann bei Erstdiagnose ein nicht invasives Urothelkarzinom nachgewiesen werden, in 10% bis 15% zeigen diese Tumore eine Progression in ein muskelinvasives Wachstum (Dorp et al., 2010). Bei der transurethralen Resektion des Tumors wird Gewebe bis einschließlich der Blasenmuskulatur entfernt. Je nach Befundkonstellation der histologischen Aufarbeitung erfolgt die weitere Therapiestrategie.

Das nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinom (Ta, T1, Tis) kann durch die TUR-Blase vollständig entfernt werden, allerdings zeigte sich eine hohe Variabilität der Rezidivwahrscheinlichkeit nach einem Jahr (Allard, Bernard, Fradet, & TÊtu, 1998). Eine Nachresektion innerhalb von sechs Wochen durch eine TUR-Blase wird empfohlen bei einer nicht vollständigen initialen TUR-Blase, bei allen *high-grade* Tumoren außer beim primären CIS, bei allen pT1 Tumoren und wenn im Resektat keine Muskulatur enthalten ist, außer es handelt sich um pTa, *low-grade*

Tumore (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016). Zur Planung einer adjuvanten Therapie werden die Patienten in die drei Risikogruppen *low*-, *intermediate* und *high-risk* unterteilt. Von der *EORTC* (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*) wurde dafür eine Klassifizierung zur Einstufung des Risikos für intravesikale Rezidive und der Progression des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms entwickelt, die auf den folgenden Faktoren basiert: Anzahl der Tumore, Tumorgöße, bisherige Rezidivrate, Vorliegen eines *Carcinoma in situ*, Differenzierungsgrad, pT-Stadium (Sylvester et al., 2006). Bei Patienten mit *low-risk* Tumoren sollte eine Chemotherapie Frühinstallation mit Mitomycin C innerhalb der ersten 24 Stunden nach der transurethralen Resektion erfolgen. Danach wird keine weitere adjuvante Chemotherapie-Installation empfohlen (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016). Patienten im *intermediate-risk* Stadium sollten zusätzlich eine adjuvante intravesikale Therapie mittels eines Chemotherapeutikums oder eine Instillationstherapie mit Bacillus-Calmette Guerin (BCG) erhalten. Tritt nach oder während einer Chemotherapie-Instillation ein Rezidiv auf, wird die Instillation von BCG für mindestens ein Jahr empfohlen. Das attenuierte Tuberkulosebakterium Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) wirkt über einen lokalen Entzündungsprozess als Immunmodulator. Die intravesikale Instillation von Chemotherapeutika beziehungsweise von BCG senkt die Rezidivwahrscheinlichkeit (Perlis et al., 2013). Die Instillation von BCG zeigte in Studien bessere Ergebnisse hinsichtlich der Rezidivwahrscheinlichkeit als die alleinige TUR-Blase und TUR-Blase plus Instillation eines Chemotherapeutikums (Bohle, Jocham, & Bock, 2003). Die Progressionswahrscheinlichkeit war allerdings bei beiden Behandlungsoptionen gleich (Malmstrom et al., 2009). Im Gegensatz zur Chemotherapie weist die intravesikale Therapie mit BCG jedoch eine höhere Toxizität auf (Sylvester, van der, & Lamm, 2002). Schwerwiegende Nebenwirkungen sind dabei aber selten und die Folgen sind in fast allen Fällen gut behandelbar (van der Meijden, Sylvester, Oosterlinck, Hoeltl, & Bono, 2003). Typische Nebenwirkungen nach einer BCG Instillation sind unter anderem eine Zystitis, Fieber und Hämaturie. Außerdem kann es auch zu einer BCG Sepsis oder einer allergischen Reaktion kommen (Babjuk et al., 2017). Besteht eine

Risikokonstellation zur Tumorprogression, sollte eine frühe Zystektomie erwogen werden. Um ein Hochrisiko nicht-muskelinvasives Blasenkarzinom handelt es sich bei multifokalen und/oder mehr als 3 cm messenden pT1 *high-grade* Tumoren im TUR-Präparat, bei einem pT1 *high-grade* nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinomen mit begleitendem *Carcinoma in situ*, bei einem pT1 *high-grade* Tumor nach BCG Induktionstherapie in der Dreimonats-Kontrolle und bei einem Rezidiv eines pT1 *high-grade* Tumors unter laufender BCG Erhaltungstherapie oder nach abgeschlossener BCG Therapie. Darüber hinaus sollte eine Zystektomie auch bei ungewöhnlicher Histologie erwogen werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016). Ebenfalls werden muskelinvasive Tumore ohne Hinweis auf eine lymphogene und hämatogene Metastasierung in kurativer Absicht operiert. Im Rahmen einer radikalen Zystektomie wird beim Mann die Harnblase, die Prostata und die Samenblase entfernt. Bei der Frau erfolgt eine vordere Exenteration, dabei erfolgt die Zystektomie, Hysterektomie und Ovarektomie unter Mitnahme der vorderen Scheidenmanschette. Bei den betroffenen Männern und Frauen erfolgt eine bilaterale pelvine Lymphadenektomie. Nachfolgend kann die Harnableitung entweder inkontinent oder kontinent rekonstruiert werden. Bei der inkontinenten Harnableitung können die Harnleiter entweder direkt als Ureterokutaneostomie zur Haut geführt werden oder über ein zwischengeschaltetes Darmsegment als Ileum- oder Kolonconduit. Der Urin wird dabei extrakorporal in einem Stoma aufgefangen. Diese Verfahren werden vor allem in fortgeschrittenen, palliativen Tumorstadien oder bei multimorbiden Patienten angewendet. Neben diesen inkontinenten Harnableitungen ist es möglich aus einem Dünndarmstück eine Neoblase zu bilden und diese mit der Harnröhre zu verbinden. Das Resultat ist eine orthotope kontinente Neoblase. Im Gegensatz dazu, aber ebenfalls als kontinentes Verfahren, kann ein katheterisierbares Nabelstoma angelegt werden. Dabei wird in der Regel aus Dickdarm und gegebenenfalls Dünndarm die neue Blase gebildet, diese wird mit einem neuen Schließmuskel kombiniert und an den Nabel angeschlossen. Dort kann durch Einmalkatheterisierung die neue Blase entleert werden. Als ältestes Verfahren ist die Ureterosigmoideostomie zu nennen. Die Harnleiter werden dabei in den Enddarm eingepflanzt und der anale

Schließmuskel dient als Kontinenzmechanismus. In einzelnen Fällen ist auch eine Blasenteilresektion möglich (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016). Eine neoadjuvante Cisplatinhaltige Chemotherapie verlängert die Überlebenszeit und sollte daher Patienten mit einem Tumor pT2-4, N0, M0 angeboten werden (Alfred Witjes et al.). Patienten mit einem metastasierten Harnblasenkarzinom sollten, wenn der Allgemeinzustand und die Komorbiditäten es zulassen, eine Cisplatinhaltige Chemotherapie erhalten. Ist diese nicht geeignet, können Patienten alternativ mit Gemcitabin/Carboplatin behandelt werden oder eine Monochemotherapie erhalten. Bei gutem Ansprechen auf die Chemotherapie kann nachfolgend multidisziplinär eine Metastasenresektion erwogen werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016).

### **1.1.6 Prognose**

Die Prognose wird vor allem durch das Tumorstadium und dem Grad der Differenzierung bestimmt. Die 5-Jahres-Überlebensrate für alle Stadien liegt bei etwa 77%. Im Stadium 0 liegt die relative 5-Jahresüberlebensrate bei etwa 98%. In Stadium I bei etwa 88%, im Stadium II bei 63%, im Stadium III bei 46% und im Stadium IV bei etwa 15% (*The American Cancer Society medical and editorial content team*, 2016).

## **1.2 Tumorstammzellen**

### **1.2.1 Tumorstammzelltheorie**

Bereits 1855 stellte Rudolf Virchow die Embryonale-Rest-Hypothese der Tumorbildung auf. Seine Hypothese basierte auf seinen Beobachtungen, dass sich Tumorzellen histologisch ähnlich wie embryonales Gewebe verhielten (Virchow, R., 1855). Diese Hypothese wurde 1867 durch Julius Cohnheim erweitert. Dieser postulierte, dass Tumore aus Stammzellen der embryonalen Entwicklung entstehen. Die Tumorstammzellen liegen in einem ruhenden Zustand vor, können aber aus diesem Zustand heraus aktiviert werden und

nachfolgend einen Tumor bilden (Cohnheim, J., 1867). Im Jahr 1993 konnte der erste überzeugende Hinweis für die Präsenz von Tumorstammzellen geliefert werden. Lapidot *et al.* isolierten CD34+/CD38-Zellen von AML Patienten, übertrugen diese Zellpopulation auf Mäuse mit einem schweren kombinierten Immundefekt (*severe combined Immunodeficiency, SCID*) und lösten dadurch eine Proliferation von leukämischen Blasten aus (Bonnet & Dick, 1997; Lapidot *et al.*, 1994). In der Folge konnten auch in diversen soliden Tumoren mögliche Tumorstammzellen, basierend auf der Expression von CD44, CD24, CD133, EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*, CD326), THY1, ALDH und ABCB5 (*ATP-binding cassette B5*), isoliert werden (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003; Chan *et al.*, 2009; Visvader & Lindeman, 2012).

Die Tumorstammzell-Hypothese entwickelte sich zur Tumorstammzell-Theorie. Danach gibt es innerhalb von Tumoren eine geringe Anzahl an Tumorzellen, die sogenannten Tumorstammzellen, welche die Fähigkeit der Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung besitzen. Sie können somit sowohl den Tumorstammzell-Pool erhalten beziehungsweise vergrößern und sich gleichzeitig in alle Tumorzelllinien differenzieren und damit das Tumorstammzellwachstum fördern (Clarke *et al.*, 2006; Visvader & Lindeman, 2012). Der Ursprung der Tumorstammzellen ist bislang unklar. Möglich wäre die Entwicklung aus normalen Stammzellen oder aus Vorläuferzellen durch Mutationen. Außerdem wird die Entstehung aus entdifferenzierten Tumorzellen diskutiert (Ohishi, Koga, & Migita, 2016; J. Zhou & Zhang, 2008). Eine relative Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie und Tumorrezidive nach erfolgreicher Therapie werden auf das Vorhandensein von Tumorstammzellen zurückgeführt (M. Dean, T. Fojo, & S. Bates, 2005). Sehr wahrscheinlich sind Tumorstammzellen auch die Ursache für die Metastasierung von Tumoren (Hermann *et al.*, 2007; Yu, Pestell, Lisanti, & Pestell, 2012). Die Identifikation und Charakterisierung von Tumorstammzellen bietet daher die Chance eine gezielte Therapie gegen Tumorstammzellen zu entwickeln (Clarke *et al.*, 2006).

### **1.2.2 Identifikation von Tumorstammzellen**

Zur Identifikation von Tumorstammzellen werden Strategien verwendet, die auch zur Identifikation von normalen Stammzellen verwendet werden. Eine Strategie ist die Identifikation über den Nachweis bestimmter Oberflächenmarker (Keysar & Jimeno, 2010). Dabei inkubiert man Zellpopulationen mit Antikörpern, die gegen Oberflächenmarker (*Cluster of Differentiation, CD*) gerichtet sind. Durchflusszytometrisch können die Zellen nachfolgend identifiziert und isoliert werden. Idealerweise sollten diese Marker nur auf Tumorstammzellen zu finden sein und diese eindeutig von gesundem Gewebe abgrenzen. Die bisherige Forschung hat jedoch gezeigt, dass es nicht ausreicht Tumorstammzellen alleine durch einen Oberflächenmarker zu definieren (Skowron et al., 2015). Die bisher isolierten Oberflächenmarker sind nicht exklusiv auf den Tumorstammzellen zu finden, sondern lassen sich auch auf Stammzellen oder anderen Zellen des Normalgewebes nachweisen (Karsten & Goletz, 2013). Zudem ist das Markerprofil auch innerhalb einer Tumorentität sehr wahrscheinlich nicht identisch (Visvader & Lindeman, 2012). Um Oberflächenmarker als therapeutisches Ziel nutzen zu können, müssen diese sicher maligne und benigne Zellen unterscheiden. Aufgrund dieser Problematik wird zunehmend versucht, die gefundenen Oberflächenmarker auf Tumorstammzellen von denen auf Stammzellen des Normalgewebes zu differenzieren. Dies gelang unter anderem durch Nachweis von unterschiedlichen Isotypen der Oberflächenmarker, zum Beispiel CD44v oder auch durch Nachweis verschiedener Isoenzyme der ALDH1 (Gunthert et al., 1991; Marcato, Dean, Giacomantonio, & Lee, 2011; Tomita, Tanaka, Tanaka, & Hara, 2016). Auch an der Abgrenzung durch eine unterschiedliche Glykosylierung der Tumorstammzellmarker wird geforscht (Karsten & Goletz, 2013).

Bei einer weiteren Methode werden Tumorstammzellen über die Identifikation einer sogenannten *side population* in der Durchflusszytometrie identifiziert. Bei der *side population* handelt es sich um eine Zellpopulation, die den fluoreszierenden DNA bindenden Farbstoff Hoechst 33342 aktiv aus der Zelle pumpt. Die Zellen der *side population* exprimieren in einem hohen Ausmaß Transporter der ABC-Familie (*ATP-binding-casette*), wie MDR1 und ABCG2 (CD338), die für den Efflux von Hoechst 33342 ursächlich sind (Moserle, Ghisi,

Amadori, & Indraccolo, 2010). Der Nachweis einer *side population* beweist jedoch nicht die Präsenz von Tumorstammzellen, so finden sich in einigen Geweben trotz *side population* keine Tumorstammzellen (Clarke et al., 2006; Golebiewska, Brons, Bjerkvig, & Niclou, 2011).

Durch ihre Fähigkeit der Selbsterneuerung und Proliferation lassen sich Tumorstammzellen in Transplantations-Assays identifizieren. Diese Methode gilt derzeit als Goldstandard zur Identifikation von Tumorstammzellen (Rycaj & Tang, 2015). Dabei werden die Tumorzellpopulationen mittels Marker sortiert, nachfolgend wird ein *Limiting Dilution Assay* durchgeführt, bei dem eine Verdünnungsreihe zur Vereinzelnung der Zellen durchgeführt wird. Anschließend folgt das Transplantations-Assay mit mehrfacher Übertragung der Zellen auf Mäuse mit Immundefizienz. Zellpopulationen, die auch nach mehrfacher Transplantation zum Wachstum von Tumoren führen, die histologisch dem Ursprungstumor entsprechen, werden als Tumorstammzellen bezeichnet (Rycaj & Tang, 2015).

Eine weitere Methode, um Zellen mit Stammzeleigenschaften zu identifizieren, ist der Nachweis einer erhöhten Aldehyddehydrogenase (ALDH)-Aktivität. Ursprünglich wurde der Nachweis einer ALDH-Aktivität zur Identifikation von hämatopoetischen Stammzellen genutzt, mittlerweile dient sie dem Nachweis von Tumorstammzellen (Cheung et al., 2007; Marcato et al., 2011). Insgesamt sind 19 Isoformen der ALDH bekannt. Welche Isoform für die ALDH-Aktivität verantwortlich ist, scheint abhängig von der Tumorentität und vom Ursprungsgewebe zu sein (Marcato et al., 2011; Rodriguez-Torres & Allan, 2016). Vor allem die Isoformen ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3 konnten als potentielle Tumorstammzellmarker identifiziert werden (Flahaut et al., 2016).

Daneben wird auch die Identifikation von Tumorstammzellen durch *in vitro*-Assays erforscht, wie das *Colony-Forming-Assay* oder *Sphere-Assay*. Im Rahmen des *Sphere-Assay* werden Stamm- und Progenitorzellen in Suspension kultiviert und können dort kugelige Konglomerate, sogenannte Sphären, ausbilden (Sukach & Ivanov, 2007). Auf diese Weise können diese angereichert werden (Dontu et al., 2003).

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt ist, durch genetische und epigenetische Veränderungen Tumorstammzellen zu identifizieren (Toh, Lim, & Chow, 2017). Es konnte zwar nachgewiesen werden, dass einige Gene und Signalwege wie Bmi-1, Tie-2, Shh, Notch und Wnt/ $\beta$ -catenin wichtige regulatorische Funktionen in einigen Stammzellen ausführen, allerdings wirken diese Gene auch in anderen Zellen und sind damit nicht Stammzellspezifisch (Clarke et al., 2006; Clarke & Fuller, 2006; A. Liu, Yu, & Liu, 2013). Eine wichtige Rolle scheinen auch die Transkriptionsfaktoren NANOG, SOX2 und OCT4 zu spielen und wurden daher als Tumorstammzellmarker beschrieben (You, Guo, & Huang, 2018).

### **1.2.3 Charakterisierung und Forschungsstand spezifischer Oberflächenmarker**

CD44 ist ein transmembranes Glykoprotein, welches als Rezeptor Hyaluronsäure und andere Liganden wie Osteopontin, Kollagene und Matrix-Metalloproteinasen bindet. Durch alternatives *Splicing* gibt es verschiedene Isoformen, man unterscheidet dabei die Standardform CD44s (*standard*) und verschiedene Isoformen CD44v (*variant*). CD44 wird von embryonalen Stammzellen und von vielen verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel der Lunge, der Haut und von der Blase, exprimiert (Chen, Zhao, Karnad, & Freeman, 2018; Sneath & Mangham, 1998). Es spielt eine Rolle in vielen zellulären Funktionen, einschließlich der zellulären Adhäsion, Zellproliferation, bei der Aktivierung von Lymphozyten, der Hämatopoese und Angiogenese (Sneath & Mangham, 1998). Die verschiedenen Isoformen besitzen dabei überlappende und eigene Funktionen. Eine erhöhte Expression von CD44 konnte in vielen Tumoren gefunden werden, zudem wurde eine erhöhte Expression von CD44 als Marker für Tumorstammzellen, unter anderem des Mammakarzinoms und des Harnblasenkarzinoms, beschrieben (Chen et al., 2018; Ricardo et al., 2011; Wasfy & El-Guindy, 2017). In malignen Tumoren wird CD44 eine wichtige Rolle in der Tumorprogression, Metastasierung und Resistenz gegen Chemotherapeutika zugeschrieben (Chen et al., 2018). Eine gezielte Krebstherapie gegen CD44 ist seit einigen Jahren Thema der Forschung. Es wurden bereits Therapien mit unterschiedlichen Angriffspunkten entwickelt.

Studien hierzu befinden sich in unterschiedlichen präklinischen und klinischen Stadien (Chen et al., 2018).

CD47 ist ein transmembraner Zellrezeptor, der mit Thrombospondin-1, SIRP $\alpha$  (*signal-regulatory protein alpha*) und verschiedenen Integrinen interagiert (Sick et al., 2012; Soto-Pantoja, Kaur, & Roberts, 2015). Diese Interaktion beeinflusst verschiedene Zellfunktionen, wie die Zelladhäsion, Migration, Zellproliferation und Apoptose (Sick et al., 2012). Exprimiert wird CD47 von allen Zellen (Sick et al., 2012). SIRP $\alpha$  wird unter anderem von Makrophagen exprimiert. Bindet der Ligand SIRP $\alpha$  an den Rezeptor CD47 wird die Phagozytose, Zell-Zell Fusion und T-Zell Aktivierung verhindert (E. J. Brown & Frazier, 2001; Toledano, Gur-Wahnon, Ben-Yehuda, & Rachmilewitz, 2013). Eine erhöhte Expression von CD47 konnte in vielen Tumoren, wie im Non-Hodgkin-Lymphom, im Mammakarzinom und im Blasenkarzinom nachgewiesen werden (X. Liu, Kwon, Li, & Fu, 2017). Zudem ließ sich auch eine erhöhte Expression von CD47 in Tumorstammzellen darstellen (Y. Li et al., 2017; Zhao et al., 2016). Im Tumorgewebe ist das Oberflächenprotein an Metastasierung, Zellinvasion und Tumorrezidiven beteiligt. Eine wichtige Rolle spielt vor allem seine Interaktion mit SIRP $\alpha$ , die in der Inhibition der Phagozytose resultiert. Diese Funktion als möglicher Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie wird von vielen Forschungsgruppen untersucht. In präklinischen Studien zeigten CD47 blockierende monoklonale Antikörper unter anderem überzeugende Ergebnisse in der Therapie der AML und solider Tumore (Jaiswal et al., 2009; Majeti et al., 2009; Willingham et al., 2012). Klinische Studien werden aktuell durchgeführt (X. Liu et al., 2017).

CD133 ist ein transmembranes Glykoprotein, welches von hämatopoetischen Stammzellen und endothelialen Vorläuferzellen exprimiert wird (Peichev et al., 2000; Yin et al., 1997). Die biologische Funktion von CD133 ist noch nicht ausreichend geklärt. Das Molekül alleine oder in Kombination mit anderen Markern wird zur Isolation von Stammzellen aus verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel dem Gehirn (Uchida et al., 2000) und der Leber (Kordes et al., 2007), genutzt. Zudem dient CD133 auch als Marker zur Identifikation von Tumorstammzellen in bösartigen Hirntumoren (Singh et al., 2003), im

hepatozellulären Karzinom (Suetsugu et al., 2006) und im Lungenkarzinom (Eramo et al., 2007). In einer Studie von Huang und Kollegen zeigten die CD133 positiven Zellen in der Harnblasenkarzinom-Zelllinie J82 einige stammzelltypische Eigenschaften. CD133 wurde als möglicher Tumorstammzellmarker im Harnblasenkarzinom beschrieben (Huang et al., 2013).

Das Oberflächenmolekül CD326 (EpCAM) spielt bei vielen zellulären Funktionen, wie der Zell-Zell Adhäsion, Proliferation, Migration und Differenzierung, eine Rolle. (S. V. Litvinov et al., 1996; S V Litvinov, Velders, Bakker, Fleuren, & Warnaar, 1994; Osta et al., 2004). Es wird von verschiedenen Epithelien, embryonalen Stammzellen und von Tumoren epithelialen Ursprungs exprimiert, unter anderem zeigen auch das *Carcinoma in situ* des Harnblasenkarzinoms und *high-grade* Harnblasenkarzinome eine erhöhte Expression (Imrich, Hachmeister, & Gires, 2012; C. Patriarca et al., 2009; Carlo Patriarca, Macchi, Marschner, & Mellstedt, 2012). Zudem wurde die erhöhte Expression von CD326, in Kombination mit zusätzlichen Markern, als Tumorstammzellmarker in Karzinomen der Brust (Al-Hajj et al., 2003) und des Pankreas (C. Li et al., 2007) beschrieben (Imrich et al., 2012). Allerdings ist die eigentliche Funktion im Tumor noch nicht ausreichend erforscht. Es wurde eine Beteiligung an der Transformation von malignen Zellen und der Regulation der Selbsterneuerung und Pluripotenz beschrieben (Bryan, 2015; Imrich et al., 2012). CD326 könnte ein möglicher Angriffspunkt in der Krebstherapie sein. Über die letzten Jahrzehnte wurden bereits zielgerichtete Therapien mit unterschiedlichen Angriffspunkten entwickelt. Allerdings werden noch weitere klinische Studien benötigt (Eyvazi et al., 2018).

CD338 (ABCG2) ist ein Membranprotein, welches zur Familie der ABC- (*ATP-binding cassette*) Transporter gehört. Wie die Superfamilie transportiert CD338 verschiedene endogene und exogene Substrate aktiv durch die Zellmembran, limitiert dadurch die Aufnahme von Substraten und eliminiert andere Substrate durch Exkretion, zum Beispiel in das biliäre System und das intestinale Lumen (Nakanishi & Ross, 2012; Vlaming, Lagas, & Schinkel, 2009). Es ist zudem an der Blut-Hirn-Schranke und Plazentaschranke beteiligt (Vlaming et al., 2009).

Darüber hinaus wurden noch viele andere Funktionen beschrieben. Von Doyle *et. al* wurde 1998 CD338 erstmals in einer multiresistenten Brustkrebszelllinie isoliert, weshalb es den Namen *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP) erhielt (Doyle *et al.*, 1998). In vielen Krebsarten konnte in der Zwischenzeit eine erhöhte Expression von CD338 als eine Ursache der Resistenz gegen Chemotherapeutika identifiziert werden. Zu diesen Krebsarten zählen unter anderem die AML und solide Tumore der Brust (H. Burger *et al.*, 2003), des Ösophagus (Tsunoda *et al.*, 2006) und der Lunge (Y. H. Kim *et al.*, 2009; Nakanishi & Ross, 2012). Wie bereits unter Abschnitt 1.2.2 beschrieben, wird CD338 als ursächlich für den *side population* Phenotyp angesehen, welcher als charakteristisches Merkmal von Stammzellen gesehen wird (Ding, Wu, & Jiang, 2010). Außerdem wurden stammzelltypische Eigenschaften der CD338 positiven Zellen, unter anderem im Kolonkarzinom und im Pankreaskarzinom, beschrieben (Ding *et al.*, 2010; Feng, Wu, & Yi, 2015; Niess *et al.*, 2015). Im nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom konnten den Zellen mit erhöhter CD338 Expression Stammzeleigenschaften *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden (Hepburn *et al.*, 2012).

#### **1.2.4 Forschungsergebnisse zu Tumorstammzellen im Harnblasenkarzinom**

Im Jahr 2009 wurden erstmals Tumorstammzellen im Harnblasenkarzinom beschrieben (Chan *et al.*, 2009). Chan *et al.* isolierte aus Harnblasenkarzinomen Tumorzellen anhand von Stammzellmarkern, wie CD44, CD133, CD49f/Integrin $\alpha$ 6, CD166, CD105 und anhand von Markern, die eine epitheliale Differenzierung anzeigen. Die positiv selektierten Tumorzellen wurden nachfolgend Mäusen intradermal injiziert, denen das Rag 2 Gen (*recombinase-activating gene 2*) und die Zytokin Rezeptor  $\gamma$  Kette fehlte. Diesen Mäusen fehlen T-, B- und NK-Zellen. Im Anschluss an die intradermale Injektion wurde beobachtet, ob es zur Ausbildung neuer Tumore kommt. Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen aus der Basalzellschicht (CD44+, CK5+, CK20-) nach der Transplantation Tumore mit der gleichen Heterogenität des ursprünglichen Tumors bilden konnten. Die Zellen mit dieser Oberflächensignatur wurden Tumor

initiierende Zellen genannt. Allerdings fanden sich auch Tumore die CD44 negativ waren, sodass nicht von einem universellen Marker auszugehen war (Chan et al., 2009). Die meisten Tumorstammzellen konnten aus metastasierten muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen isoliert werden, eine Isolation aus nicht invasiven Blasenkarzinomen war dagegen nicht möglich (Chan et al., 2009; He et al., 2009). Eine Forschungsgruppe konnte durch *in vitro* Tests bei CD44v6 positivem und *epithelial membrane Antigene* (EMA) negativem Markerprofil Stammzeleigenschaften der Zellen nachweisen (Yang & Chang, 2008).

Ein weiterer Oberflächenmarker der gehäuft auf Tumorstammzellen und damit auch im Harnblasenkarzinom zu finden ist, ist CD47 (siehe Abschnitt 1.2.3) (Chan et al., 2009).

Darüber hinaus wurden noch einige andere Marker für Tumorstammzellen im Harnblasenkarzinom beschrieben. Hierzu zählen unter anderem der 67-kDa Lamininrezeptor (67LR) (He et al., 2009), CD49 (Peek et al., 2012) und Keratin 14 (KRT14) (Volkmer et al., 2012) sowie die Transkriptionsfaktoren OCT4 (Atlasi, Mowla, Ziaee, & Bahrami, 2007; Sedaghat et al., 2017) und SOX2 (Zhu et al., 2017). CD133 wurde als möglicher Stammzellmarker beschrieben (Bentivegna et al., 2010; Huang et al., 2013).

Zudem scheinen die Signalwege Hedgehog, Wnt, JAK-STAT und Notch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften zu spielen (Y. Li et al., 2017).

Forschungsergebnisse zum Harnblasenkarzinom deuten darauf hin, dass Zellpopulationen mit Nachweis der ALDH1A1 vermehrt Tumorstammzellen enthalten (Su et al., 2010). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte ALDH1A1 Expression mit einem fortgeschrittenen Stadium und einem schlechten Differenzierungsgrad korreliert. Patienten mit einer erhöhten ALDH1A1 Expression zeigten zudem eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit und eine kürzere Überlebenszeit. Andere Forschungsergebnisse konnten die erhöhte ALDH1A1 Expression als einen unabhängigen Prognosefaktor für die Tumor-assoziierte Überlebenszeit und die Gesamtüberlebenszeit nachweisen (Su et al., 2010).

Eine weitere wichtige Methode zur Gewinnung von Harnblasentumorstammzellen ist die Isolierung der *side population* (siehe Abschnitt 1.2.2). Nach Isolierung der *side population* der Blasenkarzinomzelllinien SW780 und T24 konnte diesen Zellen Stammzeleigenschaften nachgewiesen werden (Ning et al., 2009; She, Zhang, Wang, Gan, & Che, 2008; J. Zhou & Zhang, 2008).

### 1.3 Zielsetzung

Insgesamt starben 2014 868.356 Menschen in Deutschland. Davon starben 222.972 Menschen an malignen Tumorerkrankungen, das heißt etwa ein Viertel (Statistisches Bundesamt, 2017). Krebs steht damit an Platz 2 der Todesursachen. Durch die erhöhte Lebenserwartung hat sich seit 1970 die Zahl der Betroffenen fast verdoppelt. Zwar haben sich seitdem auch die Heilungschancen durch verbesserte Therapiemöglichkeiten erhöht, trotzdem ist mit einem weiteren Anstieg der Krebserkrankungen zu rechnen (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017). Trotz neuester diagnostischer und therapeutischer Mittel stellt das Harnblasenkarzinom, aufgrund seiner Progressionshäufigkeit und Rezidivneigung ein klinisches Problem dar (Falso, Buchholz, & White, 2012). Die Therapie des Harnblasenkarzinoms gehört zu den teuersten onkologischen Therapien in den USA mit direkten Kosten von etwa 3,7 Mrd. US\$ (2009 AUA News 14(4):1-3) (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinien 2016). In absehbarer Zukunft wird durch den demographischen Wandel mit einer deutlichen Zunahme der Neuerkrankungen gerechnet. Im Verhältnis dazu ist das Harnblasenkarzinom in klinischen Studien und der Grundlagenforschung stark unterrepräsentiert (Kunath et al., 2013). Dieser Zusammenhang macht die Bedeutsamkeit weiterer Forschung in diesem Gebiet deutlich.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Tumorzellen aus Operationspräparaten zu isolieren und diese anschließend phänotypisch mittels der Oberflächenmarker CD44, CD47 und CD326 zu charakterisieren. Zudem sollte das Verhalten der

Tumorzellen in der Kultur untersucht werden. Im Verlauf der Dissertation kam als weitere Zielsetzung die Charakterisierung der in den Vorversuchen isolierten Zellpopulationen hinsichtlich einer ALDH-Aktivität hinzu. Da sich die Messung der ALDH als erfolgreiche Methode zum Nachweis funktioneller Stammzellcharakteristika erwiesen hat, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Messung der ALDH-Aktivität mit dem Nachweis von Oberflächenmarkern auf der Zelloberfläche zu kombinieren (Falso et al., 2012). Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob sich mit Hilfe der ALDH-Aktivität weitere Oberflächenmarker als mögliche Stammzellmarker des Harnblasenkarzinoms identifizieren lassen. Das ALDH-Assay sollte zudem auch an den Zelllinien R11, R28, A1207, MB3W1, J82, T24, RT4, TCCSUP angewendet werden. Um diese Ziele zu erreichen, war darüber hinaus die Anwendung (und Etablierung) einiger Methoden nötig:

1. Die Anwendung des *gentleMACS™ Dissociators* zur Überführung der Operationspräparate in eine geeignete Einzelzellsuspension mit einer ausreichenden Anzahl an lebenden Zellen.
2. Die magnetisch-aktivierte Zellsortierung zur Depletion von Zellen des Normalgewebes und Gewinnung von Tumorzellen.
3. Die Anwendung des ALDEFUOR®-Assays zur Messung der ALDH-Aktivität.
4. Die Färbung der gewonnenen Zellpopulationen mit Fluoreszenzfarbstoffen und deren Sortierung und graphische Darstellung mit Hilfe eines *Fluorescence-activated cell sorting- (FACS)* Gerätes.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Laborgeräte

Tabelle 5: Die verwendeten Laborgeräte im urologischen Forschungslabor

Laborgerät	Hersteller/Hauptsitz
Reinraumwerkbank LAF V-48	Laminar Air Flow
CO <sub>2</sub> Inkubator CB150	Binder GmbH, Tuttlingen
Mini Laborpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg

Kühlschrank, Liebherr Premium	LIEBHERR International AG, Bulle, Schweiz
Zentrifuge, Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Mikroskop Diavert	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar
Pipettierhelfer, Accu-jet® pro	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim
Mikroliterpipetten	Eppendorf AG, Hamburg Brand GmbH und Co. KG, Wertheim

*Tabelle 6: Die verwendeten Laborgeräte im Forschungslabor der Kinderklinik*

<b>Laborgerät</b>	<b>Hersteller/Hauptsitz</b>
Reinraumwerkbank Herasafe™	Heraeus Holding GmbH, Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator Heracell™	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Analysenwaage, Kern EMB 200-2	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Gefrierschrank -20°C	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Kühlschrank, Liebherr Premium	Liebherr-International AG, Bulle FR, Schweiz
Mini-Laborpumpe, Laboport®	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Mikrozentrifuge, MiniSpin®	Eppendorf AG, Hamburg
Durchflusszytometer, BD FACSCanto™ II	BD Biosciences, Heidelberg
Vortexer, MS I Minishaker	IKA®-Labortechnik GmbH und Co. KG, Staufen
Zentrifuge, Rotanta 460 RS	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Mehrkanalpipette, Acura® 855	Socorex Isba S.A., Ecublens, Schweiz
Pipettierhelfer, Accu- jet® pro	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim
Mikroliterpipette, Eppendorf Research®	Eppendorf AG, Hamburg

Zellzählgerät, Countess™ Automated Cell Counter	Invitrogen AG, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham Massachusetts, Vereinigte Staaten
Zählkammern Neubauer-improved	Superior Marienfeld, Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
Deckgläser	Superior Marienfeld, Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS® Manuel Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

*Tabelle 7: Die verwendeten Verbrauchsmaterialien*

<b>Verbrauchsmittel</b>	<b>Hersteller/Hauptsitz</b>
Einweg-Skalpell	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Pasteurpipette	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim
Serologische Pipette 5 ml/10 ml/25 ml, Cell Star	Greiner bio-one GmbH, Frickenhäuser
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht Biozym Biotech Trading GmbH
Reaktionsgefäß 1,5 ml/15 ml/50 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht; Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Kulturplatten 6/12/96 Well Format, CELLSTAR®	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Gewebekulturflaschen, CELLSTAR®	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

Filterspitzen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
gentleMACS C Tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Laborhandschuhe, gentle Skin®	Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Filteraufsätze Reaktionsgefäß, Falcon™ Cell Strainers	BD Biosciences, Heidelberg
MACS Separationssäulen MS/LD Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

### 2.3 Medien, Puffer und Lösungen

*Tabelle 8: Die verwendeten Medien, Puffer und Lösungen*

<b>Medien, Puffer und Lösungen</b>	<b>Hersteller/Hauptsitz</b>
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham Massachusetts, Vereinigte Staaten
RPMI-1640 Medium	Biochrom GmbH, Berlin
Penicillin und Streptomycin	SIGMA-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Trypanblau, 0,4 %	SIGMA-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Aldefluor Puffer	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada
DMEM / high Glucose (4.5 g/l) Medium	GIBCO® by life Technologies™, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham Massachusetts, Vereinigte Staaten
McCoy's 5A Medium	GIBCO® by life Technologies™, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham Massachusetts, Vereinigte Staaten

GlutaMAX™	GIBCO® by life Technologies™, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham Massachusetts, Vereinigte Staaten
Fibroblast growth factor (FGF)	SIGMA-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Epidermal growth factor (EGF)	SIGMA-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
MEM Vitamin Solution (100x)	GIBCO® by life Technologies™, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham Massachusetts, Vereinigte Staaten
HEPES-Puffer	SIGMA-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Fetales Kälberserum (FBS)	GIBCO® by life Technologies™, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham Massachusetts, Vereinigte Staaten
B-27®Supplement (50x)	GIBCO® by life Technologies™, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham Massachusetts, Vereinigte Staaten
DMEM/ F-12-GlutaMAX™ Medium	GIBCO® by life Technologies™, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham Massachusetts, Vereinigte Staaten
Natriumpyruvat	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham Massachusetts, Vereinigte Staaten
L-Glutamin	SIGMA-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten

Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Essigsäure	SIGMA-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Aquadest	SIGMA-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Rinderserumalbumin (BSA)	GIBCO® by life Technologies™, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham Massachusetts, Vereinigte Staaten
Ethanol 70%	Otto Fischer GmbH & Co.KG, Saarbrücken

## 2.4 Zellkulturmedien

Zellmedium für die Zelllinien TCCSUP und J82:

DMEM High Glucose (mit Phenolrot)

- + 20% FBS
- + 1% Natriumpyruvat
- + 1% L-Glutamin
- + 1% HEPES

Zellmedium für die Zelllinien RT4 und T24:

McCoy Medium

- + 10% FBS
- + 1% Penicillin/ Streptomycin100x
- + 1% L-Glutamin
- + 1% HEPES

Stammzellmedium für die Zelllinien R11 und MB3W1:

DMEM/ F-12-Gluta (Max) Medium (500 ml)

- + 10 ml B27 Supplement (50x)

- + 5 ml 1% MEM Vitamins
- + 500 µl FGF
- + 500 µl EGF
- + 2 ml Penicillin/Streptomycin

## 2.5 Kits

*Tabelle 9: Die verwendeten Kits*

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Aldehyde Dehydrogenase-Based Cell Detection Kit	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada
Tumor Dissociation Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

## 2.6 Microbeads

*Tabelle 10: Die verwendeten Microbeads*

<b>Microbeads</b>	<b>Hersteller/Hauptsitz</b>
CD31	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD45	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD44	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

## 2.7 Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle

*Tabelle 11: Die verwendeten Antikörper*

<b>Epitop</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Wirt</b>	<b>Reaktivität</b>	<b>Hersteller</b>
CD31	APC- eFluor® 780	WM- 59	IgG1k	Maus	Mensch	eBioscience Affymetrix, Inc.
CD44	PE	IM7	IgG2bk	Ratte	Mensch, Maus	eBioscience Affymetrix, Inc.

CD45	eFluor® 450	HI30	IgG2bk	Maus	Mensch	eBioscience Affymetrix, Inc.
CD47	APC	B6H1 2	IgG1k	Maus	Mensch	eBioscience Affymetrix, Inc.
CD133/ 2	PE- Vio®770	293C 3	IgG2bk	Maus	Mensch	Miltenyi Biotec
CD326	PerCP- eFluor® 710	1B7	IgG1k	Maus	Mensch	eBioscience Affymetrix, Inc.
CD338	Pacific blue	5D3	IgG2bk	Maus	Mensch	BioLegend
Isotyp- kontrolle	PE	MOP C-21	IgG1k	Maus	Mensch	BioLegend

## 2.8 Software

*Tabelle 12: Die angewendeten Softwares*

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
BD FACSDiva	BD Biosciences, Heidelberg
Microsoft Word 2013	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten
EndNote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Flowjo-Single Cell Analysis Software	FlowJo LLC, Ashland, Oregon, Vereinigte Staaten
GraphPad Software	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Excel	Microsoft Cooperation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten

Adobe Illustrator CC 2019	Adobe Systems, San José, Kalifornien, Vereinigte Staaten
---------------------------	---

## 2.9 Zelllinien

Humane Harnblasenkarzinomzellen: Die Zellen wurden aus Operationspräparaten gewonnen, welche von der urologischen Universitätsklinik Würzburg zur Verfügung gestellt wurden.

RT4: Die Zellen wurden 1968 aus dem Resektat eines papillären Urothelkarzinomrezidivs eines 63-jährigen männlichen Patienten gewonnen. Histopathologisch *Grading* G1, *Staging* T2 (Rigby & Franks, 1970).

T24: Bei dieser Zelllinie handelt es sich um schlecht differenzierte humane Urothelkarzinomzellen einer 82-jährigen Frau. Histopathologisch *Grading* G3 *Staging* T3 (Bubeník et al., 1973).

J82: Die Zellen stammen aus einem schlecht differenzierten invasiven Urothelkarzinom eines 58-jährigen männlichen Patienten. Histopathologisch *Grading* G3, *Staging* T3 (O'Toole, Price, Ohnuki, & Unsgaard, 1978).

TCCSUP: Hierbei handelt es sich um undifferenzierte humane Urothelkarzinomzellen aus einem anaplastischen Tumor einer 67-jährigen Patientin. Bei Diagnose lagen bereits Knochenmetastasen vor. Histopathologisch *Grading* G4, *Staging* T3b (Nayak, O'Toole, & Price, 1977).

R11: Es handelt sich um eine Glioblastom-Zelllinie, die unter Konditionen für Tumorstammzellen und neuralen Stammzellen etabliert wurde (Beier et al., 2007).

R28: Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Glioblastom-Zelllinie (Lottaz et al., 2010).

A1207: Hierbei handelt es sich um eine humane Glioblastom-Zelllinie (Israel, Blass, Reiners, & Samnick, 2011).

MB3W1: Hierbei handelt es sich um eine anaplastische Medulloblastom-Zelllinie, die aus dem Pleuraerguss eines 22-Monate alten Kindes gewonnen wurde (Dietl et al., 2016).

## **2.10 Patientenkollektiv und Probenmaterial**

Die Gewebeproben stammen von Patienten, bei denen aufgrund eines Harnblasenkarzinoms an der Universitätsklinik Würzburg eine Zystoprostatektomie beziehungsweise bei Frauen eine vordere Exenteration durchgeführt wurde. Die Operationen erfolgten zwischen 2014 und 2015. Die Patienten wurden bezüglich der Probenentnahme aufgeklärt und erklärten sich einverstanden. Die Entnahme der Gewebeproben und diese Forschungsarbeit wurden durch die Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Aktenzeichen zum Ethikvotum 7/14). Insgesamt wurden Gewebeproben von 4 Frauen und 10 Männern mit einem mittleren Alter von 63,7 und einer Altersspanne von 46 bis 80 Jahren untersucht. Nach der Organentnahme erfolgte durch das pathologische Institut der Universität Würzburg die makroskopische Identifikation des Karzinoms und die Entnahme einer Gewebeprobe für die weiteren Untersuchungen. Die Gewebeproben wurden bis zum Versuchsbeginn in PBS bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Zudem wurden die Operationspräparate vom pathologischen Institut histologisch untersucht und nach der TNM-Klassifikation charakterisiert (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Charakteristika der Gewebeproben

Probe	Alter	Geschlecht m/w	Histologie	TNM	Grading	Metastasen	Resektions- status	Vor- behandlung	Nach- behandlung	Risiko- faktor
Pilot 1	67	m	Urothel- carcinom	pT3a pN1 (1/17) L1 V0 Pn1	G3	Lymphknoten	R0	TUR-B	Adjuvante Chemotherapie (Gemcitabin/ Cisplatin)	
Pilot 2	56	m	Urothel- Carcinom, multilokulär	pT1 pTis pN0 (0/22) pM0 L0 V0 Pn0	G3		R0	TUR-B	keine	Nikotin: 25py
Pilot 3	57	m	Urothel- carcinom	pT2a pN1 (0/21) pM1 L1 V0 Pn0	G3	Peritoneale, Pankreas- kopf	R0	TUR-B	Adjuvante Chemotherapie (Gemcitabin/ Cisplatin)	Nikotin
Versuch 1	46	m	Urothel- carcinom	pT3a pN1 (1/36) L0 V0 Pn0	G3	Lymphknoten	R0		Adjuvante Chemotherapie (Gemcitabin/ Cisplatin)	
Versuch 2	71	m	Papilläres Urothel- carcinom	pT3b pN2 (5/6) L1 V0 Pn1	G3	Pulmonale, Retro- peritoneale, Ossäre, Lymphknoten	R1		Chemotherapie	Nikotin

Versuch 3	80	m	Urothel- carcinom	pT4a pN2 (9/16) pM1 L1 V1 Pn1	G3	Lymphknoten	R1	TUR-B 11x zwischen 2007-2014	Keine, Exitus letalis	
Versuch 4	72	m	Urothel- carcinom	pT3b, pN0 (0/12) L1 V1 Pn0	G3		R0	TUR-B		
Versuch 5	47	w	Sarkomatoides Plattenepithel- carcinom,	pT3a pN0 (0/17) L0 V1 Pn0	G3		R0	TUR-B		Nikotin: 33 py
Versuch 6	73	m	Urothel- carcinom	pT4 pN0 (0/22) L1 V1 Pn1	G3		R0	TUR-B		
Versuch 7	56	m	Urothel- carcinom	pT3a pN2 (3/8) pM1 L1 V1 Pn0	G3	Lymphknoten	R0	TUR-B	Adjuvante Chemotherapie (Gemcitabin/ Cisplatin)	
Versuch 8	62	w	Urothel- carcinom	pT3a pN0 (0/23) L0 V0 Pn1	G3		R0	TUR-B	Adjuvante Chemotherapie (Gemcitabin/ Cisplatin)	
Versuch 9	72	weiblich	Urothel- carcinom	pT3b pN0 L1 V1 Pn1	G3		R0	TUR-B	Adjuvante Chemotherapie (Gemcitabin/ Cisplatin)	

									Cisplatin)	
Versuch 10	58	männlich	Urothel- carcinom	pT4b pN2 (3/14) L1 V1 Pn1	G3	Lymphknoten	R1	TUR-B	Adjuvante Chemotherapie (Gemcitabin/ Cisplatin)	
Versuch 11	75	weiblich	Urothelcarcinom mit ausgedehnter platten- epithelialer Differenzierung	pT4a pNX L1 V1 Pn0	G3		RX	TUR-B	Adjuvante Chemotherapie (Gemcitabin/ Cisplatin)	

## 2.11 Herstellung der Einzelzellsuspension

Zur Herstellung der Einzelzellsuspension wurde der *gentleMACS™ Dissociator* und das *Tumor Dissociation Kit* von *Miltenyi Biotec* verwendet. Diese Methode überführt das Gewebe in eine Einzelzellsuspension durch Kombination einer chemischen Komponente, in Form von drei Enzymlösungen, und einer mechanischen Komponente, in Form des *gentleMACS™ Dissociators*. Die Dissoziation des Gewebes erfolgte gemäß dem Protokoll für Tumore mit harter Konsistenz von *Miltenyi Biotec*.

Zuerst wurde in einem *C-Tube* der Enzymmix vorbereitet, hierfür wurden 4,7 ml RPMI 1640, 200 µl von Enzym H, 100 µl von Enzym R und 25 µl von Enzym A in das *C-Tube* pipettiert. Nach der manuellen Zerkleinerung des Gewebes mit Hilfe eines Einwegskalpells erfolgte die Überführung der etwa 2-4 mm großen Gewebeteile in das, den Enzymmix enthaltende, *C-Tube*. Die *C-Tubes* wurden auf den *gentleMACS™ Dissociator* gesteckt und das Programm *h\_Tumor\_01* wurde gestartet. Nachfolgend wurden die *C-Tubes* bei 37 °C im Brutschrank für 30 Minuten inkubiert. Im Abstand von jeweils 10 Minuten wurde die Tumor-Enzymmixlösung manuell gemischt und zurück in den Inkubator gestellt. Dieser Zyklus wurde zwei weitere Mal wiederholt. Bei einer nicht ausreichenden Dissoziation wurde das Programm ein viertes Mal gestartet. Die Zelllösung wurde nachfolgend durch einen 70 µm Zellfilter gefiltert, anschließend wurde der Zellfilter mit 20 ml RPMI gespült und die Zellsuspension bei 300 g für 7 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde je nach Größe in 3-5 ml PBS resuspendiert.

## 2.12 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte bei den ersten beiden Zellseparationen mittels einer elektrischen Zählkammer. Hierfür wurde die Zelllösung mit Trypanblau in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. In der Regel wurden jeweils 20 µl Trypanblau mit 20 µl Zellsuspension gemischt und in die Zählkammer gegeben.

Bei den nachfolgenden Versuchen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Für die lichtmikroskopische Zählung ist ein 10:1 Verhältnis von Trypanblau und Zelllösung notwendig. Es wurden 90 µl Trypanblau mit 10 µl Zellsuspension gemischt und in die Neubauer Zählkammer gegeben. Trypanblau dient der Bestimmung der Vitalität. Abgestorbene Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau, lebende Zellen dagegen nehmen den Farbstoff nicht auf und erscheinen hell. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden daher nur die lebenden, hellen Zellen berücksichtigt. Es wurden mindestens zwei Kammern gezählt und mit der nachfolgenden Gleichung wurde auf die Gesamtzellzahl in der Lösung geschlossen.

**Gesamtzellzahl= (gezählte Zellzahl/Anzahl der gezählten Kammern) x 10<sup>4</sup> x Volumen in ml**

### **2.13 Magnet-assoziierte Zellsortierung**

Zur Isolierung der Zellpopulationen wurde das Magnet-assoziierte Zellsortierungssystem *MACS® (Magnetic Activated Cell Sorting)* von *Miltenyi Biotec* verwendet. Das Prinzip dieser Trennmethode beruht auf der Kopplung von etwa 50 nm großen superparamagnetischen Partikeln, den *MACS Microbeads*, an Antikörper, welche gegen spezifische Oberflächenmoleküle der Zellen gerichtet sind. Die Zellsuspension, bestehend aus magnetisch markierten und unmarkierten Zellen, wird über eine Trennsäule gegeben, die ein ferromagnetisches Umfeld enthält. Befindet sich die Säule am magnetischen Separator, verstärkt das ferromagnetische Umfeld das magnetische Feld um das 10.000-fache und bildet dadurch einen starken magnetischen Gradienten innerhalb der Säule. Auf diese Weise bleiben die markierten Zellen als Positivfraktion in der Säule und die unmarkierten Zellen durchlaufen als Negativfraktion die Säule (Abb. 1). Die Positivfraktion kann im Anschluss außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden (Abb. 2).

Auf diese Weise kann eine Depletion einer Zellpopulation und eine Anreicherung von spezifischen Zellen aus einer Zellsuspension erreicht werden. Die einzelnen Schritte der magnetischen Zellsortierung wurden entsprechend der Herstellerprotokolle der CD45, CD44 und CD31 *Microbeads* von *Miltenyi Biotec* durchgeführt.

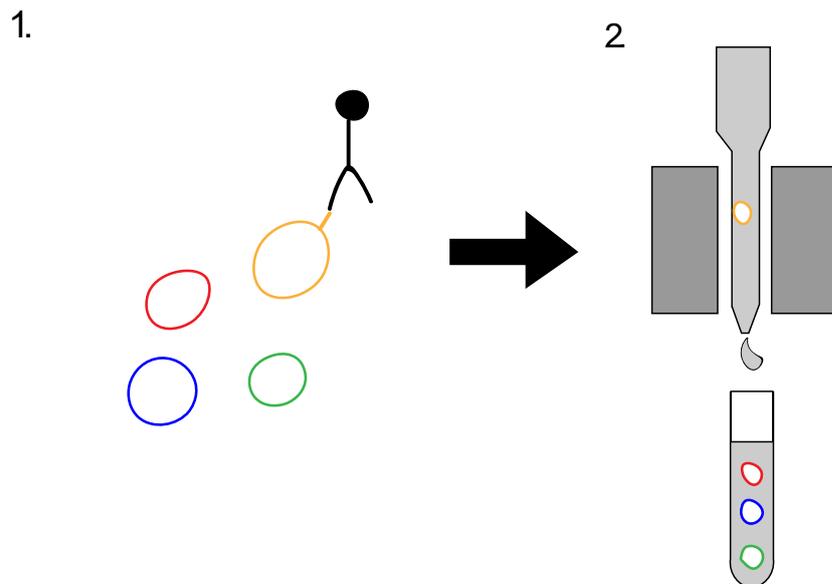


Abbildung 1: Prinzip der Depletion. Die erste Abbildung links zeigt die Markierung der Zelle. Die zweite Abbildung rechts soll das Prinzip der Depletion darstellen. Die magnetisch markierte Zelle wird bei Passage über eine magnetisierte Säule in der Säule zurückgehalten (Miltenyi Biotec: *Magnetic cell separation* (Stand 19.11.2018)).

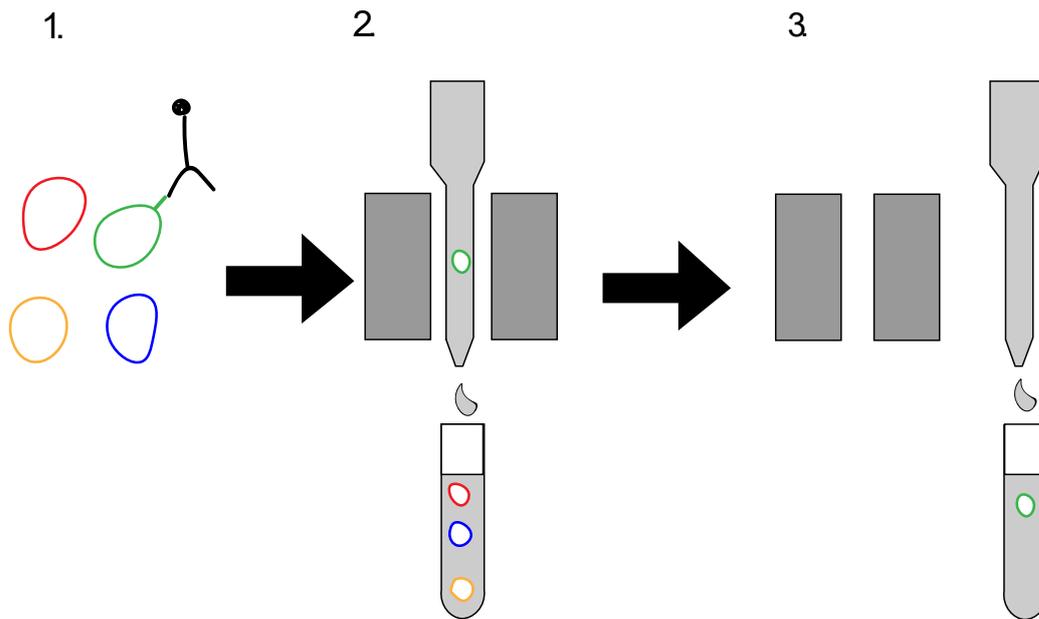


Abbildung 2: Prinzip der Positivselektion. Die erste Abbildung zeigt die magnetische Markierung. Die zweite, mittlere Abbildung zeigt das Prinzip der Depletion. Die dritte Abbildung zeigt das Prinzip der Positivselektion (Miltenyi Biotec: Magnetic cell separation (Stand 19.11.2018)).

## 2.14 Depletion von CD45 und CD31 positiven Zellen

In einem ersten Schritt wurden die CD45 und CD31 positiven Zellen aus der Einzelzellsuspension herausgelöst. Nachdem die Zellen gezählt wurden, wurde die Zellsuspension für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Die nachfolgenden Maßangaben beziehen sich jeweils auf  $1 \times 10^7$  Zellen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 60  $\mu$ l PBS resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 20  $\mu$ l CD45 *Microbeads*, von 20  $\mu$ l *FcR Blocking Reagent* und die Zugabe von 20  $\mu$ l CD31 *Microbeads*. Anschließend wurde die Zellsuspension für 15 Minuten auf Eis inkubiert und regelmäßig manuell durchmischt. Das *FcR Blocking Reagent* verhindert das unerwünschte Binden der Antikörper an Zellen, unter anderem B-Zellen, Monozyten und Makrophagen, die den Fc-Rezeptor exprimieren. Nach Zugabe von 2 ml PBS wurde die Zellsuspension bei 300 g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die Depletion erfolgte über eine *MS Säule* (Kapazität  $2 \times 10^8$  Zellen), welche am *OctoMACS™* Magneten befestigt wurde. Die MS-Säule wurde zuvor mit 500  $\mu$ l PBS vorgespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und mit 3 x 500  $\mu$ l PBS nachgespült. Die Zellen der

Negativfraktion wurden gezählt und bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Positivfraktion wurde verworfen.

### **2.15 Gewinnung einer CD44 positiven und negativen Zellfraktion**

Die nachfolgenden Maßangaben beziehen sich, wie im vorhergehenden Abschnitt, auf  $1 \times 10^7$  Zellen. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet mit 80  $\mu$ l PBS resuspendiert und es wurden 20  $\mu$ l CD44 *Microbeads* hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde daraufhin für 15 Minuten auf Eis inkubiert und regelmäßig manuell bewegt. Nach der Inkubation wurden, je nach Pelletgröße, 1-2 ml PBS hinzugefügt und die Zellsuspension bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde mit 500  $\mu$ l PBS resuspendiert. Die MS-Säule wurde mit 500  $\mu$ l PBS vorgespült, nachfolgend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und die Säule mit 3 x 500  $\mu$ l PBS nachgespült. Nachdem die Zellsuspension durchgelaufen war, wurde die MS Säule vom Magneten genommen und die magnetisch markierten CD44 positiven Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml PBS mittels Stempel aus der Säule eluiert. Der Durchfluss wurde als CD44 negative Zellpopulation aufgeführt. Beide Zellpopulationen wurden gezählt.

### **2.16 Durchflusszytometrie**

Verwendet wurde das Durchflusszytometer *BD FACSCanto™ II* von *BD Biosciences*. Die Durchflusszytometrie oder auch FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*, geschützte Handelsmarke der Firma *Becton Dickinson*) erlaubt die Analyse von Einzelzellen hinsichtlich Zelleigenschaften, wie der Zellgröße, intrazellulärer Bestandteile, der Zelloberfläche und Fluoreszenzeigenschaften. Die zu analysierende Zellsuspension wird mittels hydrodynamischer Fokussierung (siehe Abbildung 3) in einen Strom einzelner Zellen überführt, welche einzeln nacheinander an einem Laser vorbeigeführt werden. Passieren die Zellen den Laser wird das auftreffende Licht gestreut. Man unterscheidet dabei Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter, FSC*) und Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter, SCC*). Das Vorwärtsstreulicht entsteht durch

Beugung des Lichts im Winkel des ursprünglichen Laserstrahls und hängt primär von der Größe der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht wird in einem 90° Winkel zum ursprünglichen Lasersignal gemessen und hängt, neben der Größe der Zelle, vor allem von der Granularität der Zelle ab. Das verwendete *FACS Canto II* besitzt drei Laser, einen blauen (488-nm, Festkörperlaser), einen roten (633-nm, HeNe) und einen violetten-Laser (405-nm, Festkörperlaser). Gleichzeitig können mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen spezifische Zellen markiert werden und anhand der emittierten Fluoreszenzsignale zusätzlich charakterisiert werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind an Antikörper gekoppelt, welche gegen Oberflächenantigene der Zielzellen gerichtet sind. Die emittierte Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge der gebundenen Antikörper. Die ausgesendeten Signale werden durch Lichtreflexion zu den Detektoren geleitet und in elektrische Signale umgewandelt. Das *FACS Canto II* besteht aus zwei Detektionssystemen, die die Signale detektieren. Das *Octagon* leitet die Signale des blauen Lasers an fünf photosensitive Detektoren, den sogenannten Photomultiplern weiter. Das *Trigon* leitet die Signale des roten und violetten Lasers an zwei Photomultiplier weiter. Die Tabelle 14 zeigt die Emissions-, Absorptionsspektren und Epitope der verwendeten Fluorochrome.

Die Ergebnisse wurden in einem Punktediagramm (*Dot-plot*) dargestellt, die x-Achse wird üblicherweise zur Darstellung des Vorwärtsstreulicht (*FSC*) und die y-Achse zur Darstellung des Seitwärtsstreulicht verwendet. Jede analysierte Zelle erscheint als Punkt in dieser zweidimensionalen Darstellung. Durch Setzen von Gates, das heißt von Fenstern im *Dot-plot*, können spezifische Zellpopulationen ausgewählt werden. Gleichzeitig können Zellen, welche nicht von Interesse sind, eliminiert werden. Durch Gates können Zellpopulationen quantifiziert und weiter erforscht werden. Analog können auch die Fluoreszenzsignale dargestellt werden. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der *FlowJo-Single Cell Analysis Software* ausgewertet.

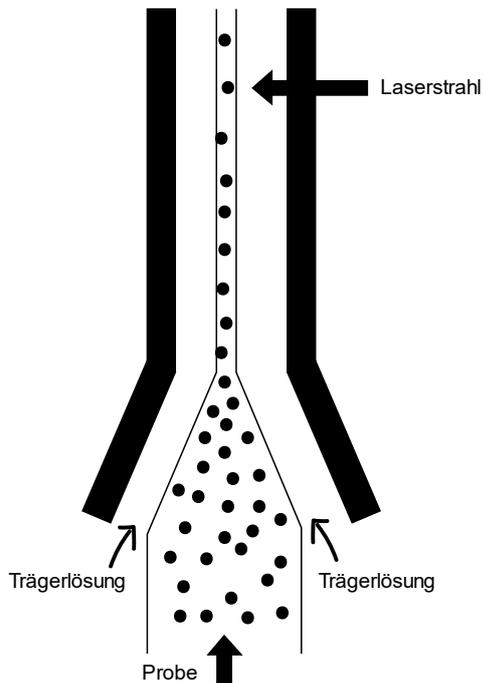


Abbildung 3: Hydrodynamische Fokussierung (Becton Dickinson: BD FACS Canto II (Stand 18.11.2018)).

Tabelle 14: Emissions- und Absorptionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe

Epitop	Fluoreszenzfarbstoffe	Emissionsmaximum	Absorptionsmaximum
CD31	APC-eFluor® 780	780 nm	633-647 nm
CD44	PE	575 nm	488-561 nm
CD45	eFluor® 450	450 nm	405 nm
CD47	APC	660 nm	633-647 nm
CD133	PE-Vio770	775 nm	565 nm
CD326	PerCP-eFluor® 710	710 nm	488 nm
CD338	Pacific blue	455 nm	405 nm

## 2.17 Bestimmung der viablen Zellen mittels 7-Aminoactinomycin

Um die Qualität der Aufreinigung zu bewerten, wurde die Vitalität mittels des Zellfarbstoffes 7-Aminoactinomycin (7AAD) bestimmt. 7AAD ist ein Peptid, welches spezifisch zwischen Cytosin und Guanin in die DNA interkaliert und dabei seine Fluoreszenzeigenschaften verändert. Der Zellfarbstoff kann dabei

nur in tote Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen (Schmid, Krall, Uittenbogaart, Braun, & Giorgi, 1992).

## **2.18 Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen**

Vor Beginn der Versuche wurde für jede Probe 50 µl PBS in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte vorgelegt und diese während der Versuche bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Je nach Zellzahl wurden 20-60 µl der Zellsuspensionen in die Kavitäten hinzugefügt. In jede Kavität wurden am Ende 100 µl PBS hinzugefügt und die Mikrotiterplatte bei 1700 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und in jede Kavität 50 µl PBS und jeweils 1 µl der Antikörpersuspension hinzugefügt. Anschließend folgte eine Inkubation über 15 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss. Nach der Inkubation wurden 100 µl PBS in die Kavitäten pipettiert, die Mikrotiterplatte wurden bei 1700 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dieser Durchlauf wurde zur Entfernung der nicht gebundenen Antikörper insgesamt drei Mal wiederholt. Am Ende wurden die Zellpellets in etwa 200 µl PBS resuspendiert und in die Mikrotiter-FACS Röhrchen überführt.

## **2.19 Isotypenkontrolle**

Um das Ausmaß der unspezifischen Bindung eines Antikörpers an die Zelle und damit die Hintergrundsignale abschätzen zu können werden Isotypenkontrollen verwendet. Hierfür werden entweder Antikörper mit unbekannter Spezifität verwendet oder Antikörper gegen ein Antigen, von dem man annimmt, dass es nicht auf den untersuchten Zellen zu finden ist. Die Antikörper sind dabei ebenso an Fluoreszenzfarbstoffe gebunden. Wichtig ist dabei, dass der Fluoreszenzfarbstoff der Isotypenkontrolle und der Fluoreszenzfarbstoff des spezifischen Antikörpers exakt der gleiche ist. Die perfekte Isotypenkontrolle sollte hinsichtlich der schweren Kette und der leichten Kette exakt übereinstimmen, das Verhältnis zwischen Fluorochrom und Protein sollte ebenso übereinstimmen und zudem sollte der Antikörper und die Isotypenkontrolle auf

die gleiche Weise hergestellt werden (Andersen, Al-Karradi, Kragstrup, & Hokland, 2016).

## **2.20 Fluorescence Minus One (FMO)-Methode**

Da die Isotypenkontrolle mittlerweile von vielen Forschern kritisch diskutiert wird (vgl. Abschnitt 4.4), wurde in den letzten zwei Versuchen die FMO-Methode angewendet. Diese Methode dient ebenfalls der Identifikation und *Gating* der zu messenden Zellen. Bei dieser Kontrolle werden in einer Probe alle, bis auf einen, Antikörper eines Panels zu der Zellsuspension hinzugefügt. Eine zweite Probe enthält dagegen alle Antikörper eines Panels. Durch Vergleich der FMO-Kontrolle mit dem Ergebnis bei Zugabe des Antikörpers kann zwischen den positiven und negativen Zellen unterschieden werden.

## **2.21 Zellkultur der Tumorproben**

Um das Verhalten der Zellen in Kultur zu beobachten, wurden aus der CD44 positiven Zellfraktion und der CD31/CD45 negativen Zellfraktion jeweils etwa 1 Millionen Zellen mit Stammzellmedium kultiviert. Es wurden etwa 2 ml Stammzellmedium pro 1 Millionen Zellen verwendet. Die Zellen wurden in eine 12-Well-Platte pipettiert und bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank aufbewahrt. Die Zellsuspensionen wurden täglich begutachtet und jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt.

## **2.22 Zellkultur der Zelllinien**

Die Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen, mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> und einem Volumen von 250 ml, inkubiert. Beim Arbeiten an der Zellkultur wurde auf eine aseptische Arbeitsweise geachtet. Gesplittet wurden die Zelllinien etwa zwei Mal in der Woche, spätestens aber wenn die Zellen ein konfluentes Wachstum erreicht hatten. Bevor die Zellen subkultiviert wurden, wurde ihr Wachstum und ihre

Morphologie lichtmikroskopisch beurteilt. Die Zelllinien RT4, T24, TCCSUP und J82 wuchsen alle adhärent. Für diese gelten die nachfolgenden Schritte zur (Sub-)kultivierung. Die Zelllinien R11, R28, A1207, MB3W1 wuchsen überwiegend nicht adhärent.

Zu Beginn wurde das alte Medium abgesaugt. Um überschüssiges Material zu entfernen wurden die Zellen mit 5 ml PBS benetzt, dieses wurde nachfolgend wieder entfernt. Mit Hilfe des Enzyms Trypsin wurden die Zellen vereinzelt. Es wurden etwa 2 ml Trypsin hinzugefügt und die Zellkulturflaschen fünf Minuten in den Inkubator gestellt. Nach fünf Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml des entsprechenden Mediums gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde je nach Größe mit 2-5 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und je nach gewünschter Zellzahl pro Zellkulturflasche ausgesät und 15 ml Medium hinzugefügt. Zur Subkultivierung der Zelllinien wurden jeweils 1 Millionen Zellen in neue Zellkulturflaschen überführt.

Bei den Zelllinien R11, R28, A1207 und MB3W1 wurde das alte Medium nicht abgesaugt, sondern in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1700 rpm 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml Medium resuspendiert. Die weiteren Schritte zur Lösung der Zellverbände wurden analog zu denen, der adhären Zellen durchgeführt.

### **2.23 Messung der Aldehyddehydrogenase-Aktivität**

Der *ALDEFLUOR*<sup>™</sup>(ALDH)-Assay dient dem Nachweis von menschlichen Stammzellen beziehungsweise von Vorläuferzellen durch Messung ihrer ALDH-Aktivität. Eine hohe ALDH-Aktivität weist auf Stammzeleigenschaften von gesunden und neoplastischen Zellen hin. Es gibt insgesamt 19 Isoformen der ALDH. Initial wurde der ALDH-Assay zur Messung der ALDH1-Aktivität entwickelt. Neuere Forschungsergebnisse legen allerdings nahe, dass deutlich mehr ALDH-Isoformen beim ALDH-Assay eine Rolle spielen (vgl. Abschnitt 4.6). Die ALDH1 ist ein Enzym, welches intrazelluläre Aldehyde oxidiert und auf diese

Weise detoxifiziert. Das aktive Substrat der ALDH ist bei dieser Methode das nicht toxische BODIPY-Aminoacetaldehyd (BAAA). BAAA gelangt durch freie Diffusion in die Zelle und wird dort bei Vorhandensein der ALDH in das fluoreszierende BODIPY-Aminoacetat (BAA) umgewandelt. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zu der Enzym-Aktivität. Zur Kontrolle der Hintergrundfluoreszenz wird der ALDH-Hemmstoff Diethylaminobenzaldehyd (DEAB) verwendet. Durch Verwendung des *ALDEFLUOR*<sup>™</sup>-Assay Puffers wurde der aktive Efflux des Reaktionsproduktes aus der Zelle verhindert. Vor Beginn der Versuche musste das *ALDEFLUOR*<sup>™</sup> Reagenz aktiviert werden. Dazu wurden zu dem trockenen Pulver-Reagenz 25 µl DMSO hinzugefügt und diese Suspension wurde für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 25 µl 2N HCL-Lösung dazugegeben und es erfolgte eine weitere Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Abschließend wurden 360 µl *ALDEFLUOR*<sup>™</sup>-Assay Puffer ergänzt und ein Endvolumen von 400 µl erreicht. Das aktivierte Reagenz wurde zu Einheiten je 12 µl aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Als Vorlage für den Ablauf diente das Herstellerprotokoll von *Stemcell*<sup>™</sup> *Technologies*. Für den ALDH-Assay werden eine Millionen Zellen benötigt. Die entsprechende Zellsuspension wurde bei 250 g 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 1 ml *ALDEFLUOR*<sup>™</sup>-Assay Puffer resuspendiert. Für jede Probe wurde jeweils ein Test- und ein Kontroll-Reaktionsgefäß vorbereitet und beschriftet. Anschließend wurden 5 µl des aktivierten *ALDEFLUOR*<sup>™</sup> Reagenz in die Zellsuspension des Test-Gefäßes pipettiert. Unmittelbar danach wurden 500 µl aus dem Test-Gefäß in das Kontroll-Gefäß übertragen, in welches 5 µl DEAB vorgelegt wurde. Die Zellsuspensionen wurden für 45 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zentrifugation bei 250 g für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 200 µl *ALDEFLUOR*<sup>™</sup>-Assay Puffer resuspendiert und jede Probe auf zwei weitere Reaktionsgefäße aufgeteilt. In den ersten Proben wurde nur die ALDH-Aktivität gemessen. Zu den Proben wurden 300-400 µl Puffer hinzugefügt und die Proben wurden bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt. Der zweite Teil der Proben wurde zusätzlich mit den Antikörpern gefärbt. Hierfür wurde pro Probe 100 µl Puffer und jeweils 4 µl aller Antikörper hinzugefügt. Die Proben wurden

anschließend für 15 Minuten auf Eis inkubiert und nachfolgend bei 250 g 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Puffer resuspendiert. Der ALDH-Assay wurde in den Versuchen 7-11 an den Gewebeproben angewendet. Zudem wurde der ALDH-Assay zwei Mal an den vorbeschriebenen Zelllinien angewendet.

## 2.24 Statistische Analyse

Der t-Test ist ein Hypothesentest für t-verteilte Testprüfgrößen. Er kann verwendet werden, um zu überprüfen, ob sich zwei Stichproben signifikant unterscheiden. Der gepaarte t-Test wurde für die Ergebnisse der Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen angewendet. Der t-Test wurde mit Hilfe der *GraphPad Software* ermittelt und die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software graphisch dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde dabei 5% als Grenze angenommen. In der Tabelle 15 ist die Einteilung des Signifikanzniveaus dargestellt (*GraphPad Software Inc.*, Stand 26.11.2018).

Tabelle 15: Einteilung des Signifikanzniveaus

Irrtumswahrscheinlichkeit	Bedeutung	Symbol
p-Wert > 0,05	nicht signifikant	<i>ns (not significant)</i>
p-Wert ≤ 0,05	Signifikant	*
p-Wert ≤ 0,01	sehr signifikant	**
p-Wert ≤ 0,001	höchst signifikant	***

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension und Aufreinigung mittels Magnet-aktivierter Zellsortierung

#### 3.1.1 Herstellung der Einzelzellsuspension, Gewicht, Vitalität und Zellzahl

Das Gewicht der Präparate variierte, je nach Tumorgröße, zwischen 0,29 g und 2,66 g (siehe Tabelle 16). Zur Etablierung der Methode wurden zu Beginn drei Testläufe (Pilot 1-3) durchgeführt. Um die Qualität der Aufreinigung zu bestimmen, wurde die Vitalität durchflusszytometrisch, durch den Totfarbstoff 7AAD (7-Aminoactinomycin) bestimmt. Zudem wurden die Zellen im Verlauf auch mit Trypanblau gefärbt und gezählt. Durchflusszytometrisch konnten zwischen 89% und 96,4% (Mittelwert: 92,9%) vitale Zellen ermittelt werden. Die Abbildung 4 zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Vitalitätsbestimmung von Pilot 1. Da die ersten fünf Versuche eine gute Vitalität der Einzelzellsuspension zeigten, wurde die Vitalität in den weiteren Versuchen nicht mehr bestimmt. Die Zellzahl belief sich nach Überführung der Gewebeproben in eine Einzelzellsuspension zwischen  $1,05 \times 10^7$ /g Tumor und  $5,44 \times 10^7$ /g. Anhand der Daten (Vitalität, Zellzahl) ist ersichtlich, dass sich die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Operationspräparaten dieser Tumorart, mit Hilfe des *gentleMACS™ Dissociator* von *Miltenyi Biotec*, als gut funktionierende Methode erwiesen hat.

Tabelle 16: Probengewicht, Zellzahl und Vitalität der Versuchsreihen. Aufgrund der geringen Materialmenge im 10. und 11. Versuch, wurde auf das Zählen und Wiegen der Zellen in diesen Versuchen verzichtet.

Probennummer	Probengewicht	Zellzahl insgesamt	Zellen/g Tumor	Vitalität	Zellzahl CD31- /CD45- (Anteil an Gesamtzahl)	Zellzahl CD44+ (Anteil an Gesamtzahl)	Zellzahl CD44- (Anteil an Gesamtzahl)
Pilot 1	-	-		Trypanblau/FACS	-	-	-
Pilot 2	0,29 g			-/96,4%	-	-	-
Pilot 3	0,19 g	1,98x10 <sup>6</sup>	1,05x 10 <sup>7</sup> /g	-/94,2%	-	-	-
Versuch 1	0,14 g	10 <sup>7</sup>	7,14x10 <sup>7</sup> /g	94%/92,1%	3,3x10 <sup>6</sup> (33%)	2,9x10 <sup>6</sup> (29%)	5,25x10 <sup>6</sup> (52%)
Versuch 2	0,58 g	3,2x10 <sup>7</sup>	5,44 x 10 <sup>7</sup> /g	95%/92,7%	2,49x10 <sup>7</sup> (77,81%)	1,5x10 <sup>6</sup> (4,69%)	1,63x10 <sup>7</sup> (50,93%)
Versuch 3	0,55 g	2,68x10 <sup>7</sup>	4,77x10 <sup>7</sup> /g	95%/89%	7,35x10 <sup>6</sup> (27,43%)	1,63x10 <sup>6</sup> (6,08%)	3,25x10 <sup>6</sup> (12,13%)
Versuch 4	0,65 g	1,46x10 <sup>7</sup>	2,19x10 <sup>7</sup> /g	-	9,6x10 <sup>6</sup> (65,75%)	0,75x10 <sup>6</sup> (5,14%)	5,6x10 <sup>6</sup> (38,36%)
Versuch 5	0,7 g	1,18x10 <sup>7</sup>	1,65x10 <sup>7</sup> /g	-	1,07x10 <sup>7</sup> (90,68%)	1,13x10 <sup>6</sup> (9,58%)	3,6x10 <sup>6</sup> (30,51%)
Versuch 6	0,19 g	1,13x10 <sup>7</sup>	5,94x10 <sup>7</sup> /g	-	9,75x10 <sup>6</sup> (86,67%)	1,8x10 <sup>6</sup> (15,93%)	2,03x10 <sup>6</sup> (17,96%)
Versuch 7	2,04 g	5,16x10 <sup>7</sup>	2,53x10 <sup>7</sup> /g	-	1,77x10 <sup>7</sup> (34,30%)	1,5x10 <sup>6</sup> (2,91%)	5x10 <sup>6</sup> (9,69%)

Versuch 8	2,66 g	$7,44 \times 10^7$	$2,83 \times 10^7/g$	-	$2,06 \times 10^7$ (27,69%)	$3,24 \times 10^6$ (4,35%)	$5,44 \times 10^6$ (7,31%)
Versuch 9	0,56 g	$1,13 \times 10^7$	$2,02 \times 10^7/g$	-	$5,44 \times 10^6$ (48,14%)	$0,75 \times 10^6$ (6,64%)	$3,44 \times 10^6$ (30,44%)
Versuch 10	-	-	-	-	-	-	-
Versuch 11	-	-	-	-	-	-	-

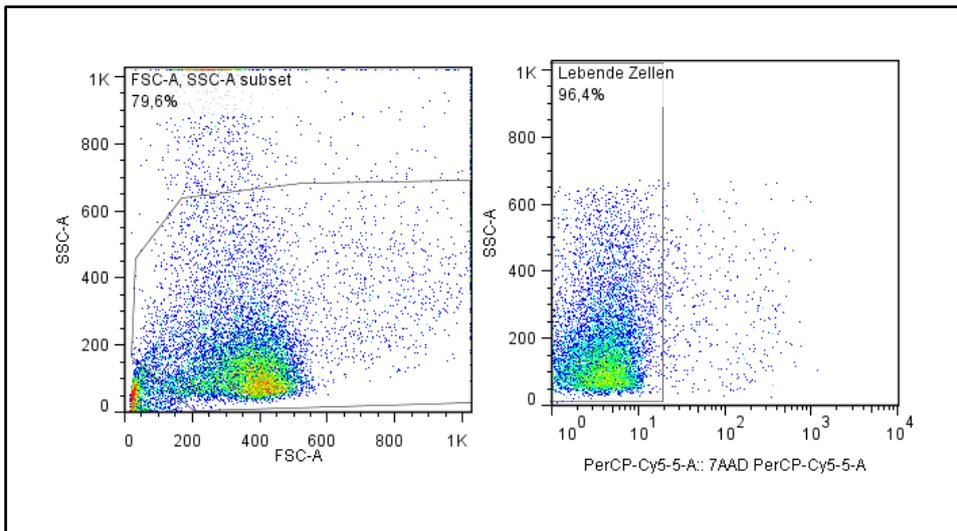


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Vitalitätsbestimmung mit dem Zellfarbstoff 7-AAD. Die toten Zellen sind dabei 7-AAD positiv, hier also außerhalb des Gates zu sehen.

### 3.1.2 Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen

Der Oberflächenmarker CD31 wird von Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten und teilweise auch von zirkulierenden Lymphozyten exprimiert (Righi et al., 2003). Das Antigen CD45 wird von nahezu allen hämatopoetischen Zellen, außer von reifen Erythrozyten, exprimiert (Nakano, Harada, Morikawa, & Kato, 1990). Beide Marker werden nicht auf Blasenkarzinomzellen exprimiert. Durch Inkubation der Einzelzellsuspension mit CD31 und CD45 *Microbeads* und anschließender Passage über eine magnetisierte Säule, sollte somit ein Großteil der hämatopoetischen Zellen und der Endothelzellen eliminiert werden und die Suspension für Tumorzellen angereichert werden. Nach Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen waren im Durchfluss noch zwischen 27,43% und 90,68% der Gesamtzellzahl vorhanden (siehe Tabelle 16). Durch die Anwendung von Gates bei der Analyse der FACS-Ergebnisse, wurden die CD31 und CD45 negativen Zellpopulationen vor und nach Depletion dieser Zellen quantifiziert. Auf diese Weise konnte die Qualität der Aufreinigung bestimmt werden. Die Abbildung 5 zeigt exemplarisch eine Auswertung von Versuch 1. Die obere Zeile zeigt dabei die Ergebnisse vor Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen und die untere Zeile zeigt die

Ergebnisse nach Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen. Die Gates umschließen hier die CD31 beziehungsweise CD45 negativen Zellpopulationen, welche für den weiteren Versuchsablauf von Interesse waren. Es ist zu sehen, dass die CD31 negative Zellpopulation vor der Aufreinigung 98,6% betrug und danach 99,7%, die CD45 negative Zellpopulation betrug vor der Aufreinigung 97,7%, nach der Aufreinigung 99,2%. Die Abbildungen 6 und 7 sollen die Wirksamkeit der Aufreinigungen graphisch veranschaulichen, indem die CD31 (Abb. 6) bzw. die CD45 (Abb. 7) negativen Zellpopulationen vor und nach Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen dargestellt werden und miteinander verglichen werden können. Die Punkte in der Graphik stellen dabei die einzelnen Werte der CD31 bzw. CD45 negativen Zellpopulationen dar und die Balken den Mittelwert.

Der Anteil an CD31 negativen Zellen lag vor der Aufreinigung zwischen 65,80% und 98,60%. Aus den einzelnen Werten lässt sich ein Mittelwert von 89,27% mit einer Standardabweichung von 10,54% berechnen. Nach der ersten Aufreinigung mittels der MACS-Technologie lag der Anteil an CD31 negativen Zellen zwischen 91% und 99,70%. Der Mittelwert beträgt hier 97,46% mit einer Standardabweichung von 3,12%. Das bedeutet, dass vor der Aufreinigung der Anteil an CD31 positiven Zellen bei 10,73% und nach der Aufreinigung bei 2,54% lag, was einer Reduktion um 76,33% entspricht. Durch einen gepaarten t-Test lässt sich ein p-Wert von 0,0179 berechnen, das heißt der Anteil an CD31 positiven Zellen konnte durch die Methode signifikant reduziert werden.

Der Anteil an CD45 negativen Zellen lag vor der Aufreinigung zwischen 51,60% und 96,30%. Aus den einzelnen Werten lässt sich ein Mittelwert von 80,62% (Standardabweichung 15,82%) ermitteln. Nach der Aufreinigung wurden Werte zwischen 97,60% und 99,70% erreicht. Hier lässt sich ein Mittelwert von 99,10% (Standardabweichung 0,71%) berechnen. Das heißt, hier lag der Anteil an CD45 positiven Zellen vor der Aufreinigung bei 19,38% und nach der Aufreinigung nur noch bei 0,9%, was einer Reduktion um 95,36% entspricht. Durch einen gepaarten t-Test lässt sich ein p-Wert von 0,0074 berechnen. Das bedeutet, der Anteil an CD45 positiven Zellen konnte signifikant reduziert werden. Bei der

ersten Aufreinigung resultierte ein Zellverlust von durchschnittlich 42,7% (Standardabweichung 24,63%) der Zellen.

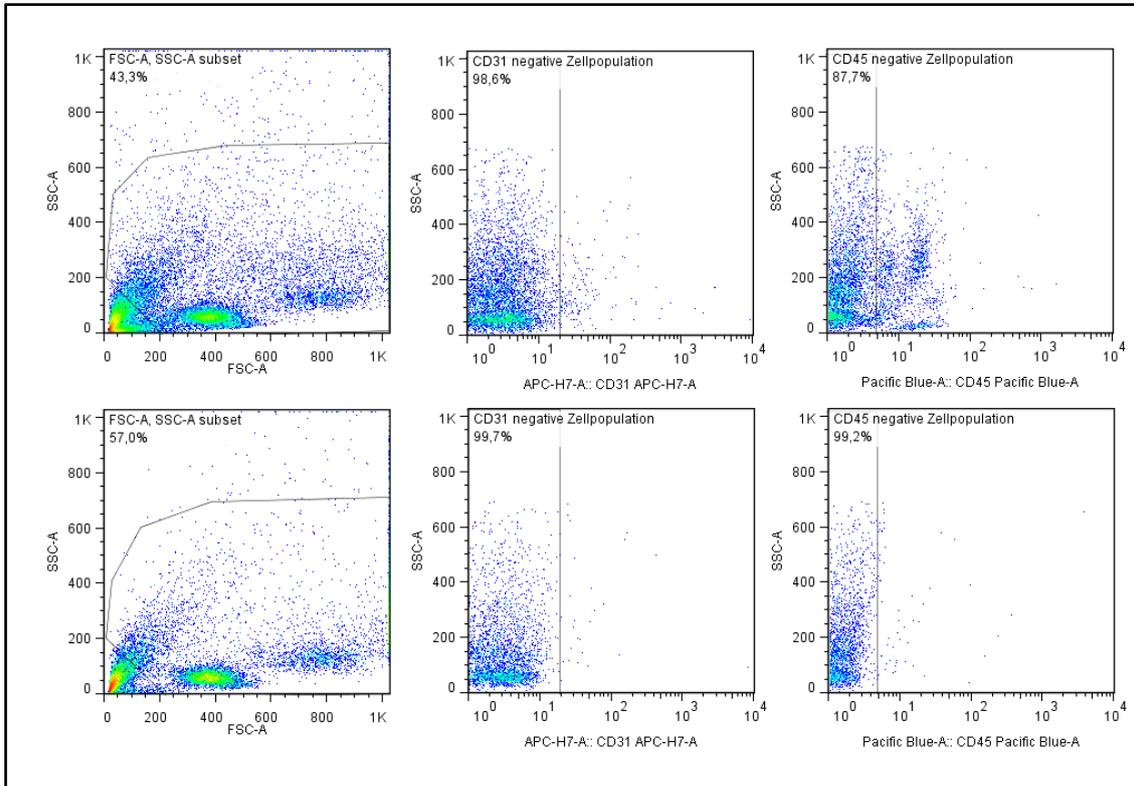


Abbildung 5: Vergleich der CD31 bzw. CD45 negativen Zellpopulation vor Depletion (obere Zeile) und nach Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen (untere Zeile). Das Dot-Plot zeigt die Ergebnisse aus Versuch 1.

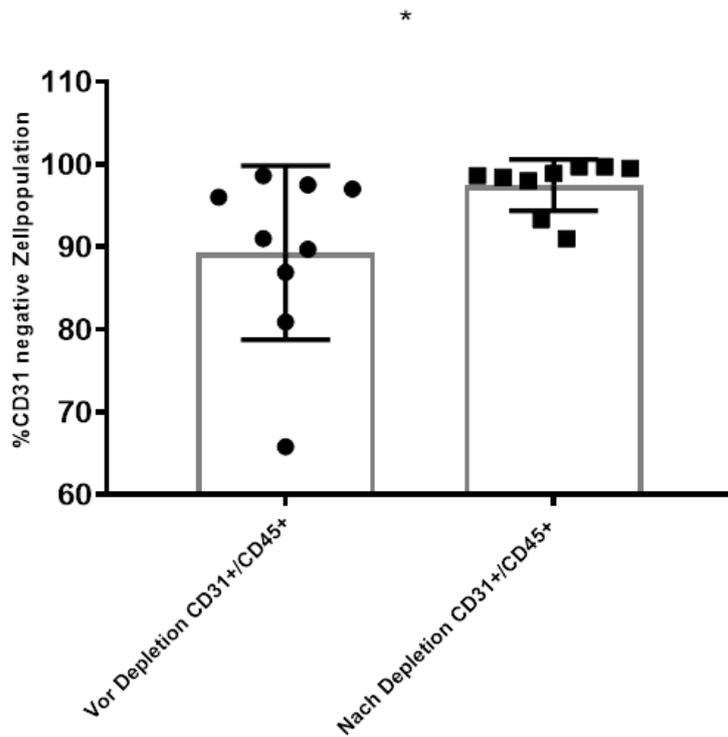


Abbildung 6: Graphische Darstellung und Vergleich der einzelnen Werte (Punkte) der CD31 negativen Zellpopulationen und des Mittelwertes (Balken) vor und nach Depletion der CD31/CD45 positiven Zellen. Zudem Darstellung der Standardabweichungen vor Depletion (10,54%) und nach Depletion (3,12%) der CD31/CD45 positiven Zellen. Die Sternchen kennzeichnen den Grad der Signifikanz  $* = p\text{-Wert} \leq 0,05$ . Angewendet wurde ein gepaarter t-Test.

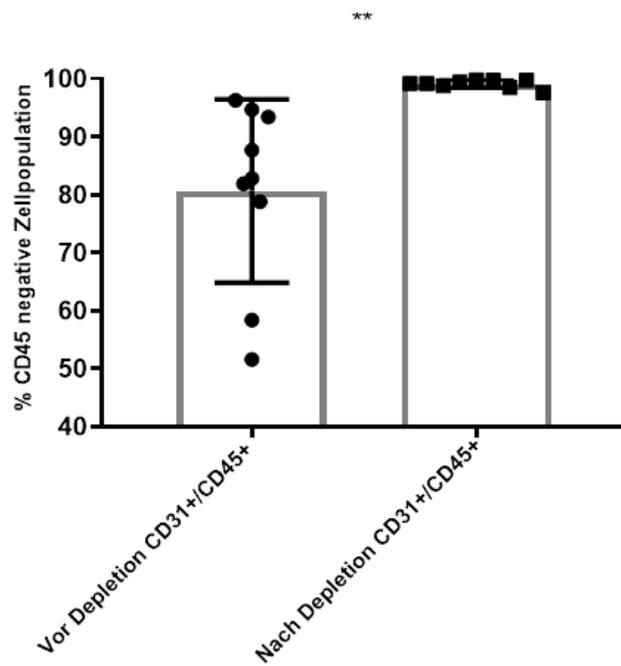


Abbildung 7: Graphische Darstellung und Vergleich des Mittelwertes (Balken) und der einzelnen Werte (Punkte) der CD45 negativen Zellpopulationen vor und nach Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen. Zudem Darstellung der Standardabweichungen vor Depletion (15,82%) und nach Depletion (0,71%) der CD31/CD45 positiven Zellen. Die Sternchen kennzeichnen den Grad der Signifikanz \*\*= p- Wert  $\leq 0,01$ . Angewendet wurde ein gepaarter t-Test.

### 3.1.3 Anreicherung der CD44 positiven Zellen, Vergleich mit der CD44 negativen Zellfraktion

CD44 ist ein transmembranes Glykoprotein, welches als Rezeptor Hyaluronsäure und andere Liganden wie Osteopontin, Kollagene und Matrix-Metalloproteinasen bindet. Durch alternatives *Splicing* gibt es verschiedene Isoformen. Eine erhöhte Expression von CD44 konnte in vielen Tumorarten gefunden werden und gilt als Marker für Tumorstammzellen, unter anderem des Harnblasenkarzinoms (siehe auch Abschnitt 1.2.3) (Chen et al., 2018; Ricardo et al., 2011; Wasfy & El-Guindy, 2017). Um die Tumorzellen anzureichern, wurden die Zellsuspensionen mit CD44 *Microbeads* inkubiert. Die Zellsuspension sollte dann über eine magnetisierte Säule in eine CD44 angereicherte Zellpopulation und in eine CD44 depletierte Zellpopulation aufgeteilt werden. Nach den Pilotversuchen stellten wir allerdings fest, dass durch unspezifische Bindungen durch Zellen der Suspension (unspezifischer Hintergrund) eine korrekte Lagebestimmung der CD44 positiven Zellpopulation in der durchflusszytometrischen Analyse erschwert wird. Folglich entschieden wir uns dazu, eine Isotypenkontrolle als Vergleichsfärbung und Negativkontrolle zu ergänzen. Diese Kontrolle erfolgte in den Versuchen 1-9. Exemplarisch ist der *Dot-Plot* der Isotypenkontrolle von Versuch 6 in Abbildung 8 aufgeführt. Mit Hilfe der Isotypenkontrolle wurden die Gates für die Versuche festgelegt und auf diese Weise der Anteil an CD44 positiven Zellen bestimmt. Da die Verwendung von Isotypenkontrollen kontrovers diskutiert wird (siehe auch Abschnitt 4.4), wurde in den Versuchen 10 und 11 statt der Isotypenkontrolle, eine *fluorescence-minus-one* (FMO)-Kontrolle angewendet. Bei dieser Kontrolle werden in eine Probe alle Antikörper hinzugefügt während in eine zweite Probe alle Antikörper, bis auf den, der untersucht werden soll, hinzugefügt werden (siehe auch Abschnitt 2.21). Durch Vergleich der zwei Proben können die positiven Zellen identifiziert werden. Abbildung 9 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der FMO-Kontrolle des Oberflächenproteins CD44 aus Versuch 10. Abbildung 10 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Auftrennung mittels CD44 *Microbeads*. Die obere Zeile soll die CD44 angereicherte Zellpopulation darstellen und die untere Zeile zeigt die CD44 depletierte Zellpopulation. Das Säulendiagramm in Abbildung 11 zeigt den Anteil der CD44 positiven Zellen im

Ausgangsmaterial und den Anteil dieser Zellen in der Zellsuspension, welche mittels CD44 *Microbeads* für CD44 angereichert werden sollte. Abbildung 12 zeigt das mittels *Microbeads* erreichte Ergebnis der Auftrennung in eine CD44 angereicherte und in eine CD44 depletierte Zellsuspension. Das heißt, hier ist vergleichend der Anteil an CD44 positiven Zellen in der angereicherten Zellsuspension und in der depletierten Zellsuspension aufgeführt. Die Daten zeigen, dass im Vergleich zum Ausgangsmaterial keine Anreicherung der CD44 positiven Zellen erreicht wurde. Zudem waren, nach Auftrennung in eine CD44 angereicherte Zellfraktion und in eine CD44 depletierte Zellfraktion, in der positiv selektierten Zellsuspension durchschnittlich nur 37,44% (Standardabweichung 28,05%) CD44 positive Zellen enthalten und das Eluat enthielt noch durchschnittlich 13,39% (Standardabweichung 19,64%) CD44 positive Zellen. In einzelnen Versuchen, wie z.B. in Versuch 7, konnte eine gute Auftrennung mittels CD44 *Microbeads* erzielt werden. Allerdings war in mehreren Versuchen die Auftrennung nicht erfolgreich. Am deutlichsten ist dies in Versuch 1. Hier enthielt die CD44 depletierte Zellsuspension noch 61,20% CD44 positive Zellen. Bei der Auftrennung in eine CD44 angereicherte und in eine CD44 depletierte Zellsuspension resultierte ein durchschnittlicher Verlust von etwa 44,59% (Standardabweichung 15,3%) der Zellen. Alle Daten berücksichtigend, hat die Magnet-assoziierte Zellsortierung zu guten Ergebnissen in der Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen geführt, für eine CD44 Positiv- und Negativselektion konnte die Methode keine ausreichend guten Ergebnisse erzielen.

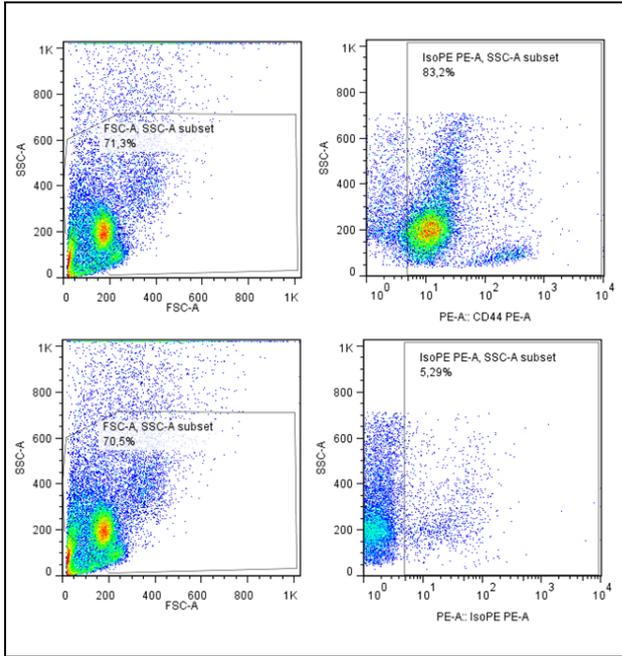


Abbildung 8: Isotypenkontrolle CD44. Die obere Zeile zeigt die Färbung mit CD44-PE. Für die untere Zeile wurde statt CD44-PE Iso-PE verwendet. Anhand der Isotypenkontrolle wurde das Gate festgelegt und damit die CD44 positiven Zellen bestimmt. Die Daten wurden aus Versuch 6 entnommen.

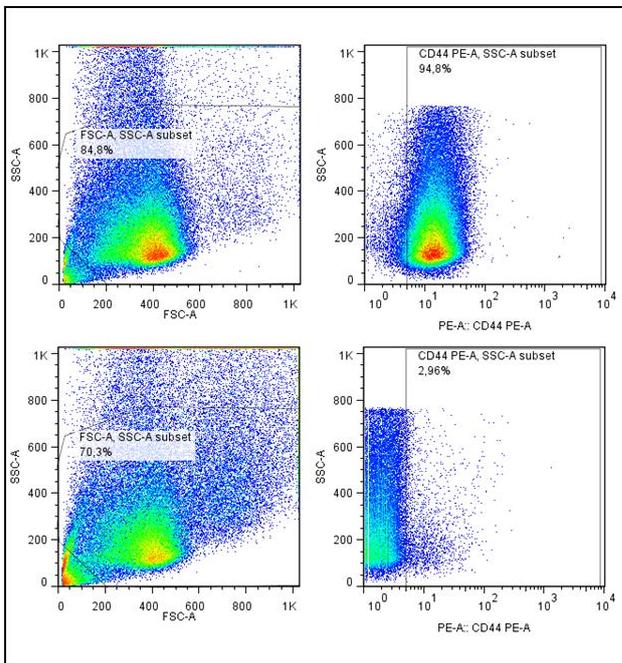


Abbildung 9: FMO-Kontrolle. Für die obere Zeile wurden alle Antikörper des Panels zur Zellsuspension hinzugefügt. Für die untere Zeile wurden alle Antikörper bis auf CD44 hinzugefügt. Anhand der unteren Zeile ohne CD44 wurden die CD44 positiven Zellen identifiziert und das verwendete Gate ausgewählt. Die Daten wurden aus Versuch 10 entnommen.

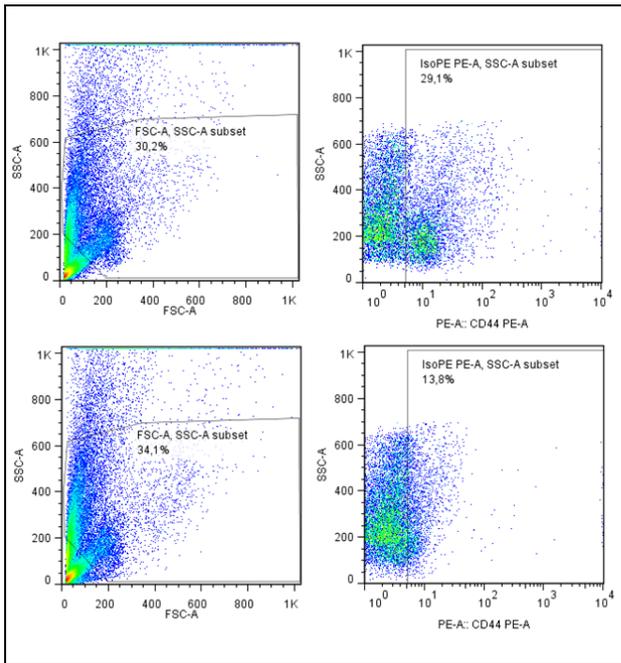


Abbildung 10: FACS- Ergebnis nach Anreicherung der CD44 positiven Zellen durch Beads (oben). Die untere Zeile zeigt die FACS-Auswertung des Durchflusses. Die Daten wurden Versuch 4 entnommen.

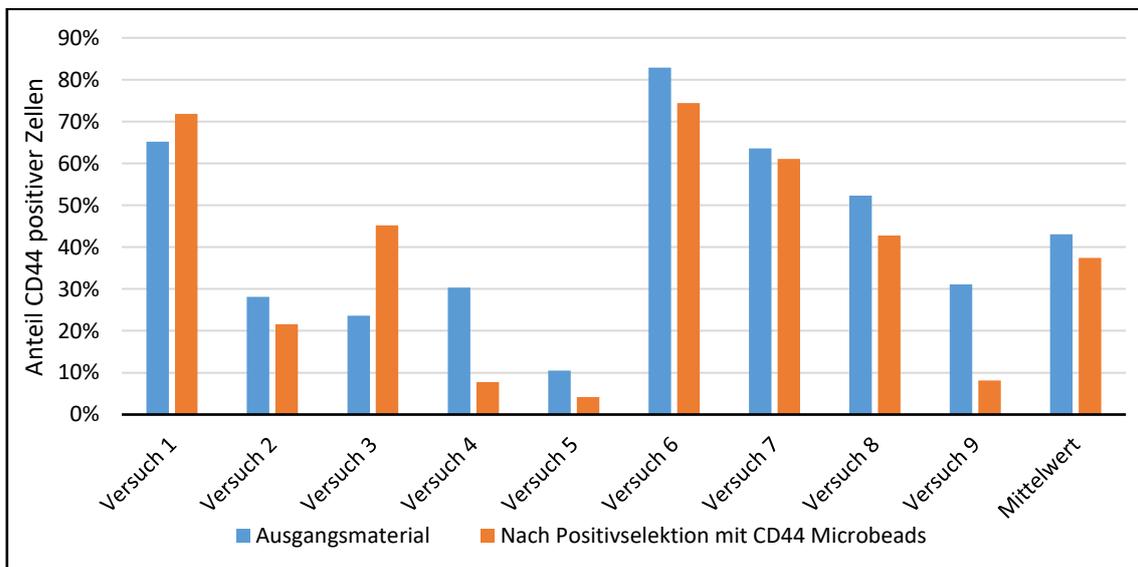


Abbildung 11: Anteil an CD44 positiven Zellen im Ausgangsmaterial (blau) und in der Zellsuspension, die durch CD44 Microbeads für CD44 angereicht werden sollte.

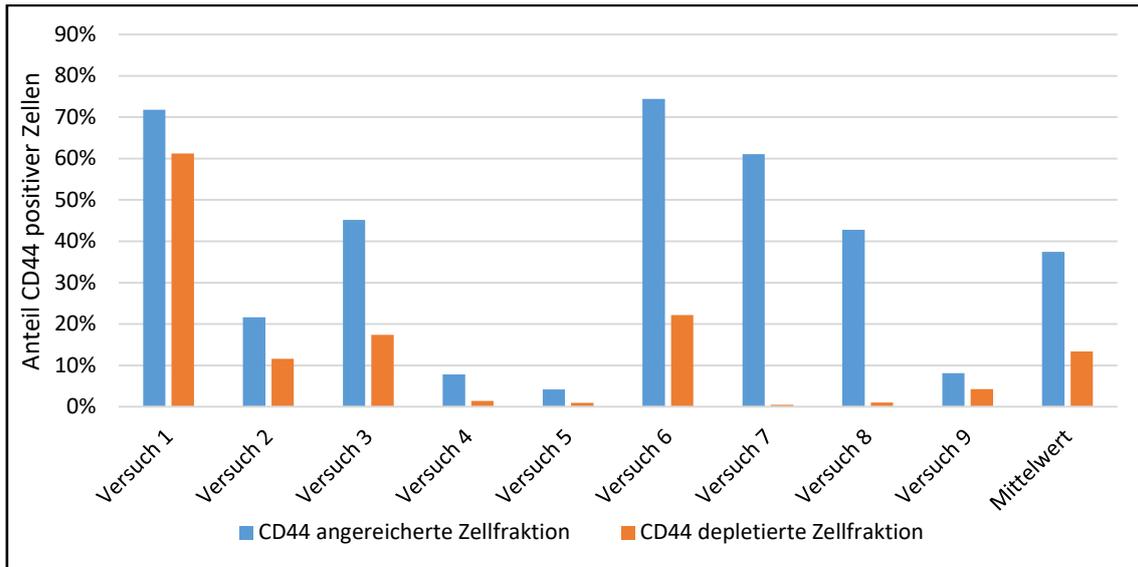


Abbildung 12: Anteil an CD44 positiven Zellen in der durch Microbeads angereicherten Population (blau) und der depletierten Population (orange). Zudem Angabe des Mittelwertes.

### 3.2 Identifikation von CD47 und CD326 positiven Zellpopulationen

In insgesamt elf (CD47) bzw. neun Versuchen (CD326) wurde die Expression von CD47 und CD326 in Zellsuspensionen, die aus Operationspräparaten generiert wurden, untersucht.

CD326 wird von verschiedenen Epithelien, embryonalen Stammzellen und von Tumoren epithelialen Ursprungs exprimiert. Unter anderem zeigen auch das *Carcinoma in situ* der Harnblase und *high-grade* Harnblasenkarzinome eine erhöhte Expression (Imrich et al., 2012; C. Patriarca et al., 2009; Carlo Patriarca et al., 2012). Zudem wurde in Karzinomen der Brust und des Pankreas eine erhöhte Expression von CD326 in Kombination mit anderen Oberflächenproteinen als Tumorstammzellmarker beschrieben (Al-Hajj et al., 2003; C. Li et al., 2007).

CD47 ist ein transmembraner Zellrezeptor, welcher mit Thrombospondin-1, SIRP $\alpha$  und verschiedenen Integrinen interagiert (Soto-Pantoja et al., 2015). Vor allem die Interaktion mit SIRP $\alpha$ , die in einer Inhibition der Apoptose resultiert, ist auch hinsichtlich einer gezielten Krebstherapie äußerst interessant. Eine erhöhte Expression von CD47 konnte in vielen Tumoren sowie Tumorstammzellen, unter anderem des Harnblasenkarzinoms, nachgewiesen werden (Y. Li et al., 2017;

Zhao et al., 2016). Eine ausführlichere Darstellung der Oberflächenproteine findet sich auch unter Abschnitt 1.2.3. Für das Oberflächenprotein CD47 erfolgte in den Versuchen 10 und 11 eine FMO-Kontrolle. Abbildung 13 zeigt exemplarisch die FMO-Kontrolle aus Versuch 10. Anhand dieser Kontrolle wurde das Gate zur Bestimmung der CD47 positiven, beziehungsweise der CD47 negativen Zellen gesetzt. Für den Antikörper CD326 wurde keine FMO-Kontrolle durchgeführt, sodass die CD326<sup>high</sup> Zellen anhand der sich darstellenden Populationen ausgewählt wurden. Eine exemplarische Darstellung der Auswertung für den Antikörper CD326 zeigt die Abbildung 14. Tabelle 17 zeigt alle Ergebnisse zusammengefasst, mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung. Verwendet wurde das Ausgangsmaterial, das heißt die Einzelzellsuspension, die mittels *gentleMACS™ Dissociator* aus den Operationspräparaten gewonnen wurde. Durchschnittlich fanden sich in den Operationspräparaten also 75,45% (Standardabweichung 20,97%) CD47 positive Zellen und 19,73% (Standardabweichung 16,66%) CD326<sup>high</sup> Zellen.

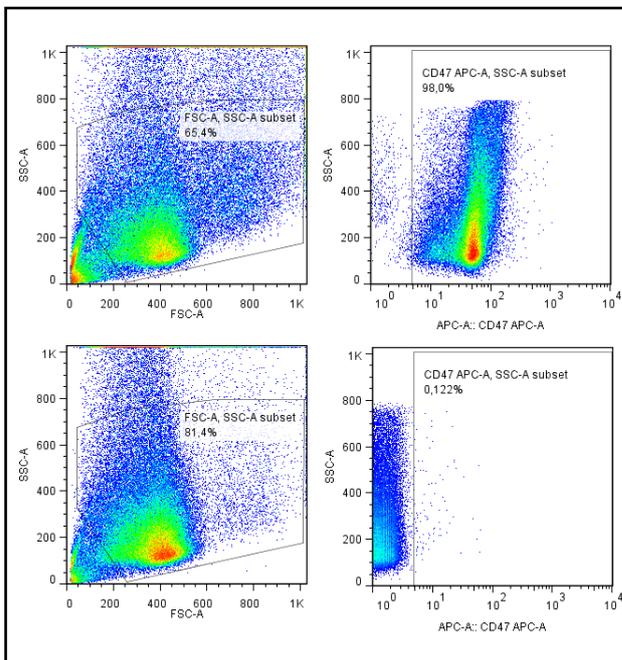


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der FACS-Ergebnisse der FMO-Kontrolle für den Oberflächenmarker CD47. Für die obere Zeile wurden alle Antikörper hinzugefügt, für die untere wurden alle Antikörper, bis auf den gegen CD47 gerichteten hinzugefügt. Die Daten wurden aus Versuch 10 entnommen.

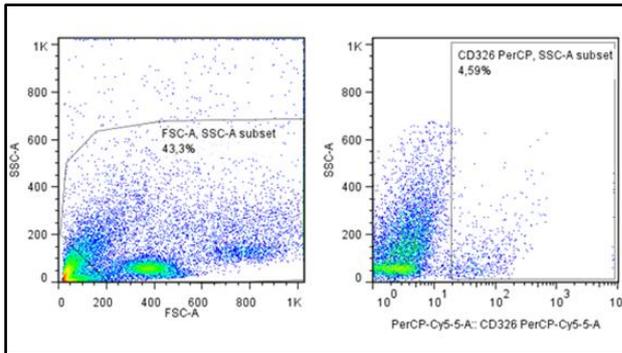


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der FACS-Ergebnisse für den Oberflächenmarker CD326. Die Daten wurden aus Versuch 1 entnommen.

Tabelle 17: Anteil an CD47 positiven und CD326<sup>high</sup> Zellen im Ausgangsmaterial

	CD47+	CD326+
Versuch 1	72,6%	4,59%
Versuch 2	91,7%	33,8%
Versuch 3	87,4%	57,7%
Versuch 4	75,4%	25,1%
Versuch 5	61,8%	19,6%
Versuch 6	88,3%	3,29%
Versuch 7	70,4%	11,2%
Versuch 8	73,5%	3,71%
Versuch 9	18,5%	18,6%
Versuch 10	98%	-
Versuch 11	92,4%	-
Mittelwert	75,45%	19,73%
Standardabweichung	20,97%	16,66%

### 3.3 Zellkultur

Um das Verhalten der CD44 positiven und der CD31/CD45 negativen Zellpopulationen sowie insbesondere möglicherweise enthaltener Stammzellen in der Kultur zu untersuchen, wurden die Zellen mit Stammzellmedium kultiviert und im Verlauf beobachtet. Vom fünften, sechsten und siebten Versuch wurden etwa eine Millionen CD44 positive Zellen und etwa eine Millionen Zellen der CD31/CD45 negativen Zellpopulation mit Stammzellmedium inkubiert. Allerdings

war der Versuch der Kultivierung leider nicht erfolgreich: Die Zellen des fünften Versuchs zeigten nach dem ersten erfolgten Mediumwechsel eine Kontamination. Die Zellen des sechsten und siebten Versuchs zeigten kein Wachstum in der Kultur. Der Versuchsansatz wurde daraufhin wieder verlassen.

### **3.4 Identifikation von Zellpopulationen mit Stammzellcharakter**

#### **3.4.1 Identifikation von ALDH<sup>high</sup> Zellpopulationen in den Operationspräparaten**

Nachdem die ersten sechs OP-Präparate dazu genutzt worden waren, die Zellseparation und phänotypische Charakterisierung der Subpopulationen zu optimieren und zu analysieren, sollte der *ALDEFLUOR*® (ALDH)-Assay in den folgenden Versuchen, eine Aussage darüber liefern, ob ein Teil der Zellen tatsächlich auch einige funktionelle Charakteristika von Tumorstammzellen zeigt. Wie bereits unter Abschnitt 1.2.2 und 2.4 beschrieben, detoxifiziert die Aldehyddehydrogenase intrazelluläre Aldehyde. Diese Funktion ist vor allem für die Selbsterneuerung von Stammzellen und Tumorstammzellen wichtig (L. Zhou et al., 2018). Es gibt insgesamt 19 verschiedene Isoformen. Abhängig von der Tumorentität und dem Ursprungsgewebe wurden, vor allem die Isoformen ALDH1A1, ALDH1A2 und ALDH1A3 als potenzielle Stammzellmarker identifiziert (Flahaut et al., 2016; Marcato et al., 2011; Rodriguez-Torres & Allan, 2016). Die Aldehyddehydrogenase-Aktivität wurde als Stammzellmarker in vielen Tumorarten, u. a. im Harnblasenkarzinom, erfolgreich verwendet (Marcato et al., 2011; Su et al., 2010). Für den Versuch wurde, wie bereits in Abschnitt 2.24 beschrieben, in eine Probe BAAA als Substrat hinzugegeben. Für die Kontrolle wurde der Aldehyddehydrogenase-Inhibitor DEAB hinzugefügt. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse des ALDH-Assays an der CD31/CD45 negativen Zellpopulation von Versuch 7-11. Die obere Zeile zeigt die Probe und die untere Zeile veranschaulicht die Negativkontrolle durch Zugabe des Inhibitors DEAB. Durch Vergleich der Probe mit der Negativkontrolle wurden die Aldehyddehydrogenase positiven Zellen identifiziert und mittels Gate markiert und gezählt. Die sich daraus ergebenden Prozentangaben sind in den

Abbildungen aufgeführt. Man kann erkennen, dass in den Versuchen 7-11 ALDH<sup>high</sup> Zellpopulationen abgrenzbar sind. Diese Zellen erfüllen somit einige Kriterien von Tumorstammzellen. Aus den Prozentangaben lässt sich ein Mittelwert von 9,12% (Standardabweichung 5,55%) ermitteln. Das heißt, durchschnittlich wiesen 9,12% der Zellen aus den Operationspräparaten eine erhöhte Aldehyddehydrogenase-Aktivität auf.

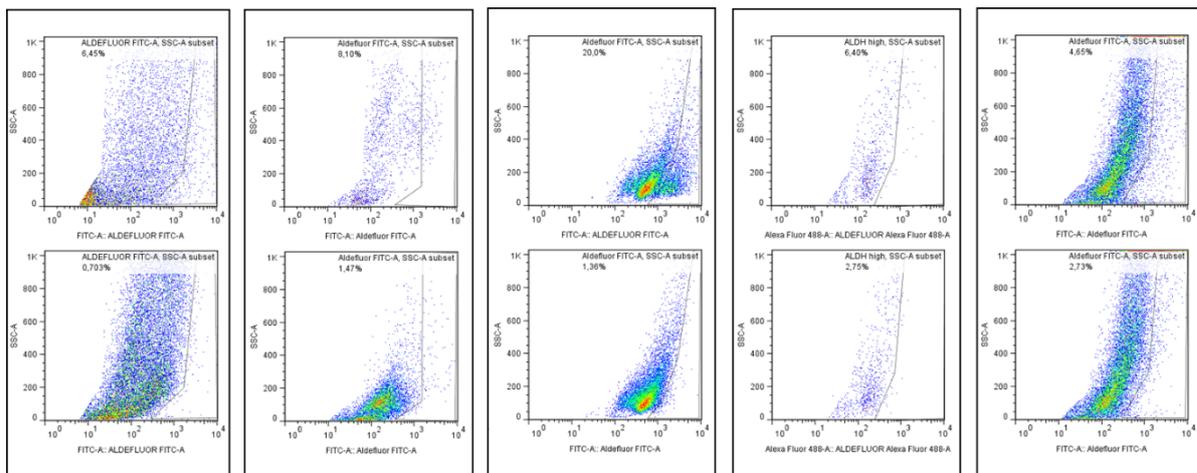


Abbildung 15: ALDH-Assay der Versuche 7-11 (von links nach rechts). In der oberen Reihe sind die Ergebnisse bei Messung der Probe aufgeführt (Versuch 7: 6,45%, Versuch 8: 6,10%, Versuch 9: 20%, Versuch 10: 6,40%, Versuch 11: 4,65%). Die untere Zeile veranschaulicht die Ergebnisse der Kontrolle, in die der Aldehyddehydrogenase-Inhibitor DEAB hinzugefügt wurde (Versuch 7: 0,703 %, Versuch 8: 1,47%, Versuch 9: 1,36%, Versuch 10: 2,75%, Versuch 11: 2,73%). Angewendet wurde der Assay an der CD31/CD45 negativen Zellsuspension.

### **3.4.2 Aldehyddehydrogenase-Aktivität im Harnblasenkarzinom, CD44, CD47, CD133, CD326 und CD338 Koexpression**

Zusätzlich wurde die Koexpression der ALDH und CD44 (Versuch 7-11) bzw. CD47 (Versuch 7,8,10 und 11), CD326 (Versuch 7 und 8), CD133 (Versuch 9-11) und CD338 (Versuch 9-11) untersucht. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der Doppelmarkierung der ALDH und CD44 aus den Versuchen 7-11 aufgeführt. Um die Zellen zu quantifizieren wurden erneut Gates gesetzt. Durchschnittlich konnten 5,57% (Standardabweichung 6,61%) CD44 positive Zellen mit erhöhter Aldehyddehydrogenase-Aktivität gefunden werden. Die Darstellung von Versuch 10 (Abbildung 16) erscheint hochverdächtig auf ein Kompensationsproblem. Dies erklärt auch die sehr unterschiedliche Darstellung der Population im Vergleich zu den anderen Versuchen und scheint nur bei der Färbung mit PE aufgetreten zu sein. Im Gegensatz zu dieser Auswertung, zeigt sich in den übrigen Auswertungen (siehe Abbildung 15, 17, 18, 20) von Versuch 10 kein so eindeutiges Kompensationsproblem. Daher wurde die Auswertung der Doppelmarkierung der ALDH und CD44 aus Versuch 10 aus der Wertung genommen. Versuch 9 wurde mit 0% CD44 positiven Zellen mit erhöhter Aldehyddehydrogenase-Aktivität gewertet, da sich im Vergleich zur Kontrolle keine Population mit Koexpression der ALDH und CD44 identifizieren lässt. Das heißt, dass in den Operationspräparaten, ausgenommen Versuch 9 und 10, Zellen mit Stammzellcharakter nachgewiesen werden konnten, die zudem den Oberflächenmarker CD44 exprimierten. Ebenso konnten CD47 positive Zellen mit erhöhter Aldehyddehydrogenase-Aktivität identifiziert werden (Abbildung 17). Durchschnittlich zeigten 10,45% der Zellen eine Koexpression der ALDH und CD47 (Standardabweichung 8,72%).

CD133 alleine oder in Kombination mit anderen Markern wird zur Isolation von Stammzellen aus verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel dem Gehirn (Uchida et al., 2000) und der Leber (Kordes et al., 2007), genutzt. Zudem dient CD133 auch als Marker zur Identifikation von Tumorstammzellen in bösartigen Hirntumoren (Singh et al., 2003), im hepatozellulären Karzinom (Suetsugu et al., 2006) und im Lungenkarzinom (Eramo et al., 2007). In Versuch 9 ließ sich keine CD133 positive Zellpopulation mit erhöhter Aldehyddehydrogenase-Aktivität

abgrenzen, in Versuch 10 dagegen konnte eine CD133 positive Zellpopulation mit erhöhter Aldehyddehydrogenase-Aktivität (5,59%) identifiziert werden. In Versuch 11 zeigte sich ebenfalls eine kleine Population (1,22%) mit Koexpression der ALDH und CD133 (siehe Abbildung 18).

In Versuch 8 und 9 konnten CD326 positive Zellpopulationen mit erhöhter Aldehyddehydrogenase-Aktivität identifiziert werden (siehe Abbildung 18). Diese Koexpression wiesen etwa 3,23% (Versuch 8) und 1,44% (Versuch 9) der Zellen auf. Auffallend ist, dass in Versuch 9 eine deutlich größere Population eine erhöhte Aldehyddehydrogenase-Aktivität aufweist, aber CD326 negativ ist.

CD338 (ABCG2) ist ein Membranprotein, welches zur Familie der ABC-Transporter gehört. Eine erhöhte Expression von ABCG2 konnte in vielen Krebsarten als eine Ursache der Resistenz gegen Chemotherapeutika identifiziert werden. Hierzu zählen unter anderem die akute myeloische Leukämie und Tumore der Brust, Ösophagus und der Lunge (H. Burger et al., 2003; Y. H. Kim et al., 2009; Nakanishi & Ross, 2012; Tsunoda et al., 2006). Außerdem gilt CD338 in zahlreichen Tumoren als Tumorstammzellmarker (Hu et al., 2017). Im nicht muskelinvasiven Urothelkarzinom konnten den Zellen mit erhöhter ABCG2 Expression Stammzeleigenschaften *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 1.2.3) (Hepburn et al., 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in den drei untersuchten Tumorproben keine CD338 positive Zellpopulation mit erhöhter Aldehyddehydrogenase-Aktivität abgegrenzt werden (siehe Abbildung 20).

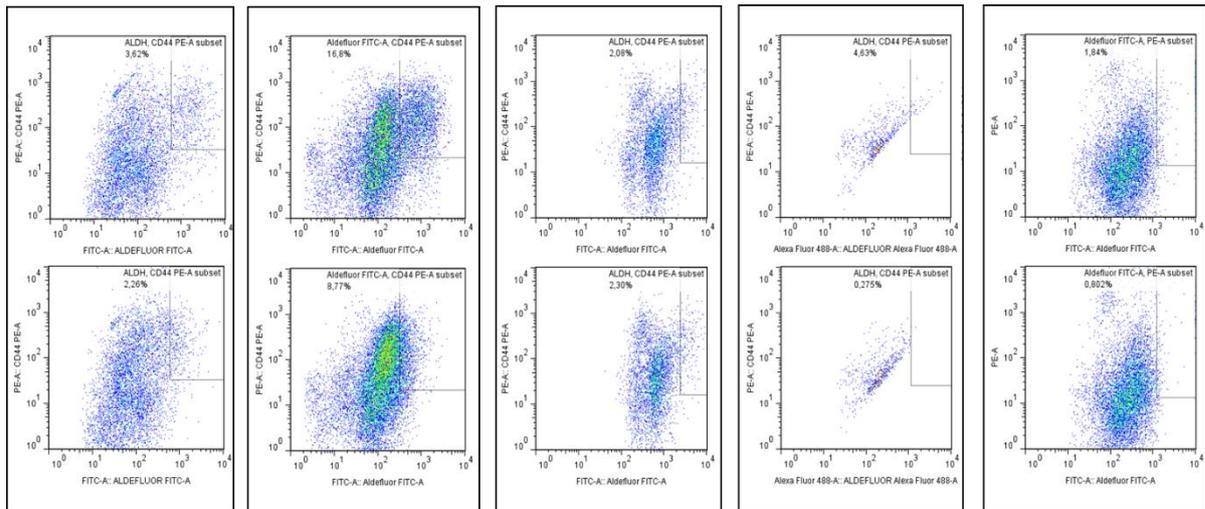


Abbildung 16: Darstellung der Expression von CD44 und der Aldehyddehydrogenase-Aktivität. Die obere Zeile zeigt dabei die Aldehyddehydrogenase-Aktivität an, bei der unteren Zeile handelt es sich um die Kontrolle mit DEAB. Die Daten wurden in den Versuchen 7-11 erhoben. Es wurden die CD31/CD45 depletierten Zellsuspensionen verwendet.

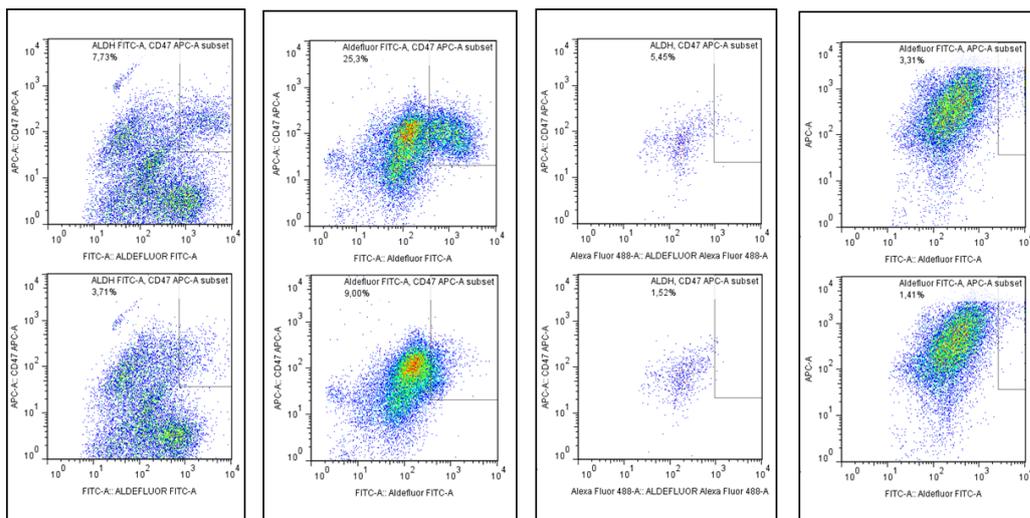


Abbildung 17: Darstellung der Expression von CD47 und der Aldehyddehydrogenase-Aktivität. Die obere Zeile zeigt dabei die Aldehyddehydrogenase-Aktivität an, bei der unteren Zeile handelt es sich um die Kontrolle mit DEAB. Die Daten wurden in den Versuchen 7,8,10,11 erhoben. Es wurden die CD31/CD45 depletierten Zellsuspensionen verwendet.

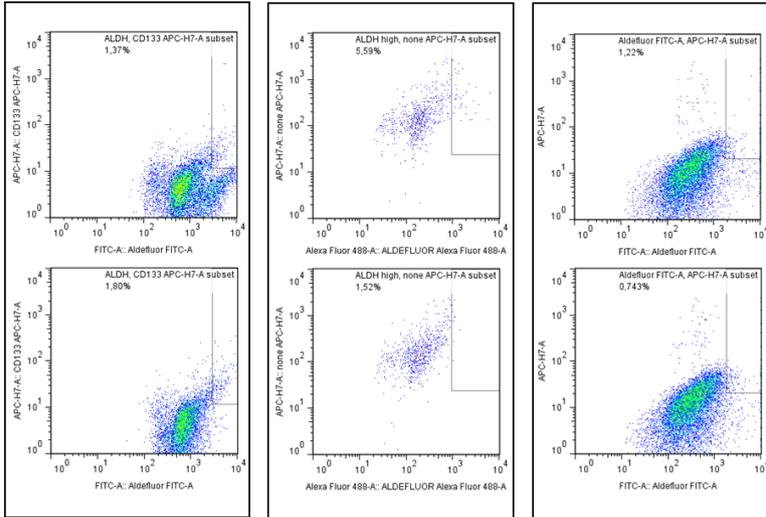


Abbildung 18: Darstellung der Expression von CD133 und der Aldehyddehydrogenase-Aktivität. Die obere Zeile zeigt dabei die Aldehyddehydrogenase-Aktivität an, bei der unteren Zeile handelt es sich um die Kontrolle mit DEAB. Die Daten wurden in den Versuchen 9-11 erhoben. Es wurden die CD31/CD45 depletierten Zellsuspensionen verwendet.

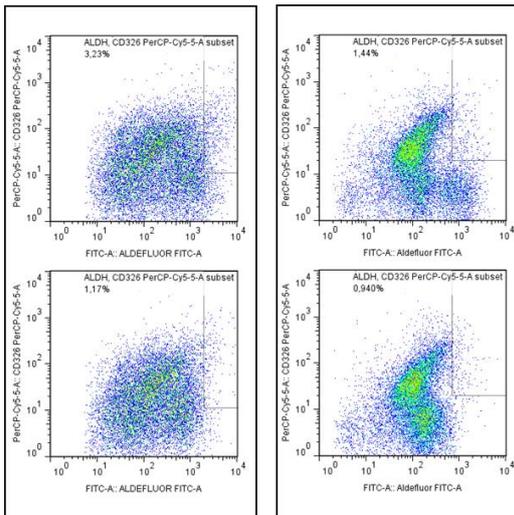


Abbildung 19: Darstellung der Expression von CD326 und der Aldehyddehydrogenase-Aktivität. Die obere Zeile zeigt dabei die Aldehyddehydrogenase-Aktivität an, bei der unteren Zeile handelt es sich um die Kontrolle mit DEAB. Die Daten wurden in den Versuchen 8 und 9 erhoben. Es wurden die CD31/CD45 depletierten Zellsuspensionen verwendet.

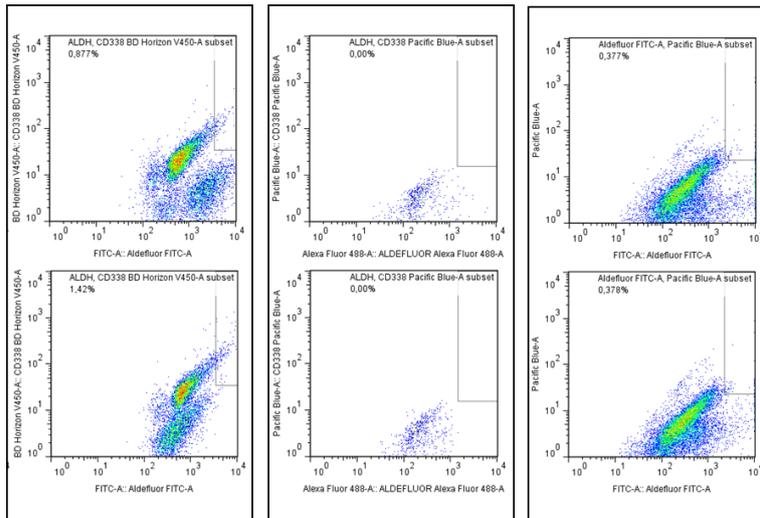


Abbildung 20: Darstellung der Expression von CD338 und der Aldehyddehydrogenase-Aktivität. Die obere Zeile zeigt dabei die Aldehyddehydrogenase-Aktivität an, bei der unteren Zeile handelt es sich um die Kontrolle mit DEAB. Die Daten wurden in den Versuchen 9-11 erhoben. Es wurden die CD31/CD45 depletierten Zellsuspensionen verwendet. Eine Population mit Coexpression stellt sich nicht dar. Allerdings fällt in den Versuchen 9 und 11 eine ALDH<sup>high</sup>/CD338 negative Population auf.

### 3.4.3 Aldehyddehydrogenase-Aktivität der Zelllinien RT4, J82T24, TCCSUP, R11, R28, A1207, MB3W1

Zudem wurde auch die Aldehyddehydrogenase-Aktivität in drei Glioblastom-Zelllinien (R11, R28, A1207) einer Medulloblastom-Zelllinie (MB3W1) und in vier Harnblasenkarzinom-Zelllinien untersucht (RT4, J82, T24, TCCSUP). Die Versuche wurden insgesamt zweimal durchgeführt. In den Abbildungen 21-28 sind die Auswertungen des ALDH-Assays der einzelnen Zelllinien aufgeführt. Die obere Zeile zeigt dabei die Proben an, für die untere Zeile wurde zur Kontrolle DEAB hinzugefügt. In einem ersten Schritt wurden hierfür im SSC vs. FSC Dot-Plot mit Hilfe von Gates die Zellpopulationen von Interesse ausgewählt. Verunreinigungen, wie zum Beispiel tote Zellen, sollten dabei möglichst ausgeschlossen werden. Danach wurden die ALDH<sup>high</sup> Zellpopulationen durch Vergleich mit der Kontrolle identifiziert. Anhand der Prozentangaben an ALDH<sup>high</sup> Zellen ist ersichtlich, dass die Zelllinien RT4, T24, TCCSUP, R11, R28 und MB3W1 Zellpopulationen mit erhöhter Aldehyddehydrogenase-Aktivität zeigen und somit Zellen mit Stammzeleigenschaften aufweisen. Die Zelllinie TCCSUP wies durchschnittlich 7,75% ALDH<sup>high</sup> Zellen auf, RT4 7,47%, T24 5,32%, R11

14,05% und R28 13,11%. Die Zelllinie J82 zeigt im Vergleich zur Negativkontrolle mit DEAB allenfalls nur einen geringen Anteil an ALDH<sup>high</sup> Zellen (0,81%). Die Zelllinie A1207 blieb in beiden Durchgängen ohne Nachweis einer Population mit erhöhter Aldehyddehydrogenase-Aktivität. Bei der Zelllinie MB3W1 ließ sich eine Population von 11,5% der Zellen abgrenzen, die in der Kontrolle durch Zugabe von DEAB nicht zur Darstellung kam (siehe Abbildung 28).

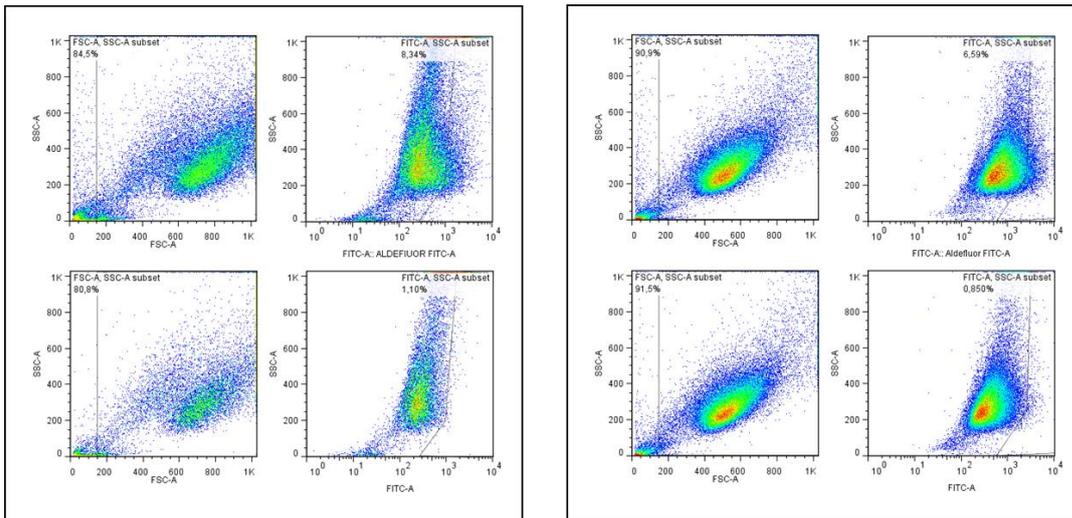


Abbildung 21: ALDH-Assay der Zelllinie RT4. Das obere Dot-Plot zeigt jeweils das Ergebnis der Probe, das untere zeigt die Kontrolle durch Hinzufügen des Inhibitors DEAB. Die Ergebnisse des ersten Durchgangs sind links aufgeführt, die des zweiten rechts.

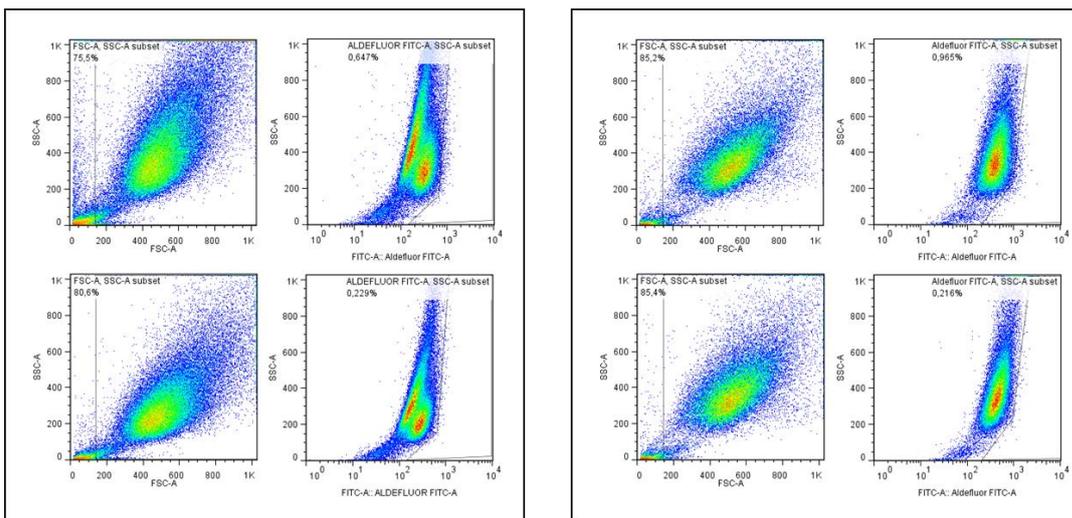


Abbildung 22: ALDH-Assay der Zelllinie J82. Das obere Dot-Plot zeigt jeweils das Ergebnis der Probe, das untere zeigt die Kontrolle durch Hinzufügen des Inhibitors DEAB. Die Ergebnisse des ersten Durchgangs sind links aufgeführt, die des zweiten rechts.

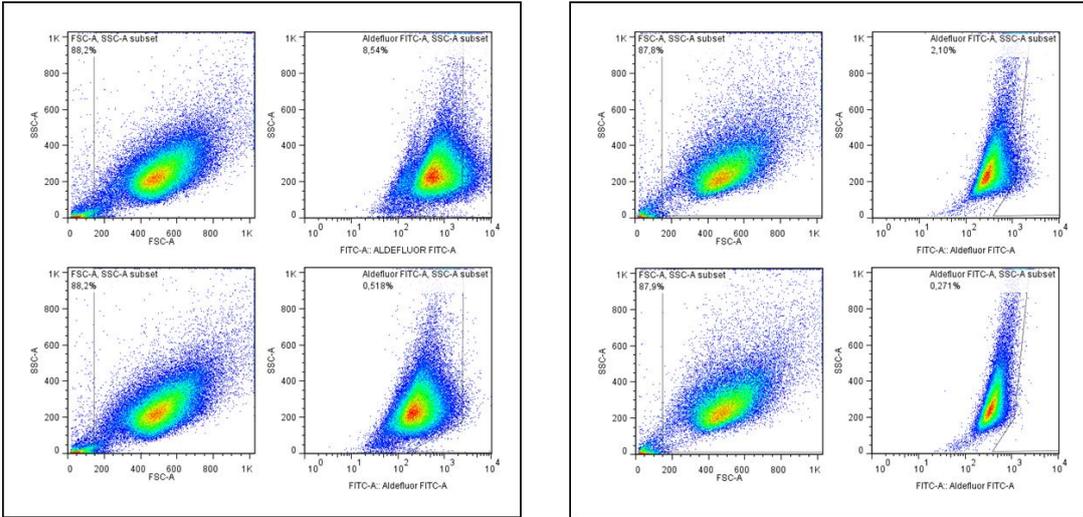


Abbildung 23: ALDH-Assay der Zelllinie T24. Das obere Dot-Plot zeigt jeweils das Ergebnis der Probe, das untere zeigt die Kontrolle durch Hinzufügen des Inhibitors DEAB. Die Ergebnisse des ersten Durchgangs sind links aufgeführt, die des zweiten rechts.

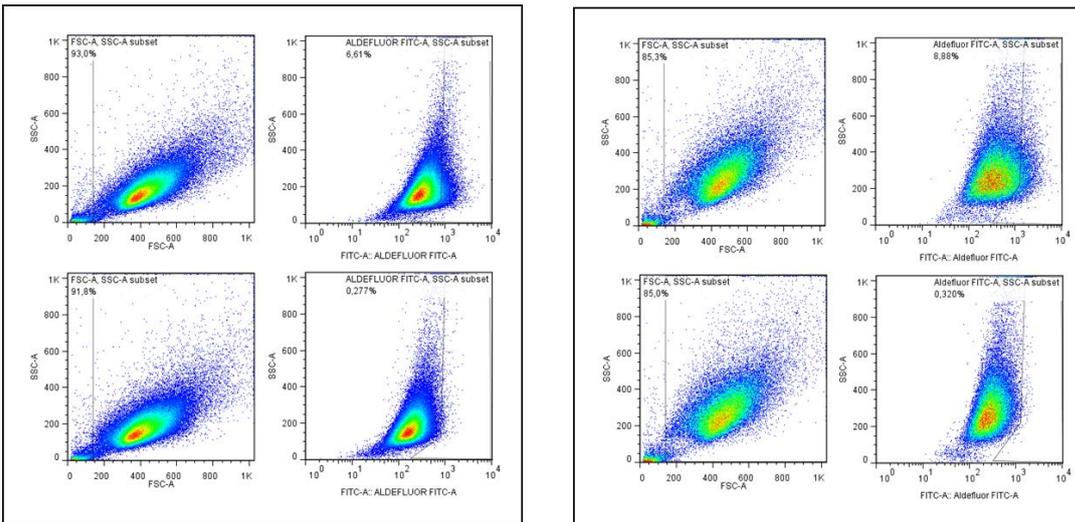


Abbildung 24: ALDH-Assay der Zelllinie TCCSUP. Das obere Dot-Plot zeigt jeweils das Ergebnis der Probe, das untere zeigt die Kontrolle durch Hinzufügen des Inhibitors DEAB. Die Ergebnisse des ersten Durchgangs sind links aufgeführt, die des zweiten rechts.

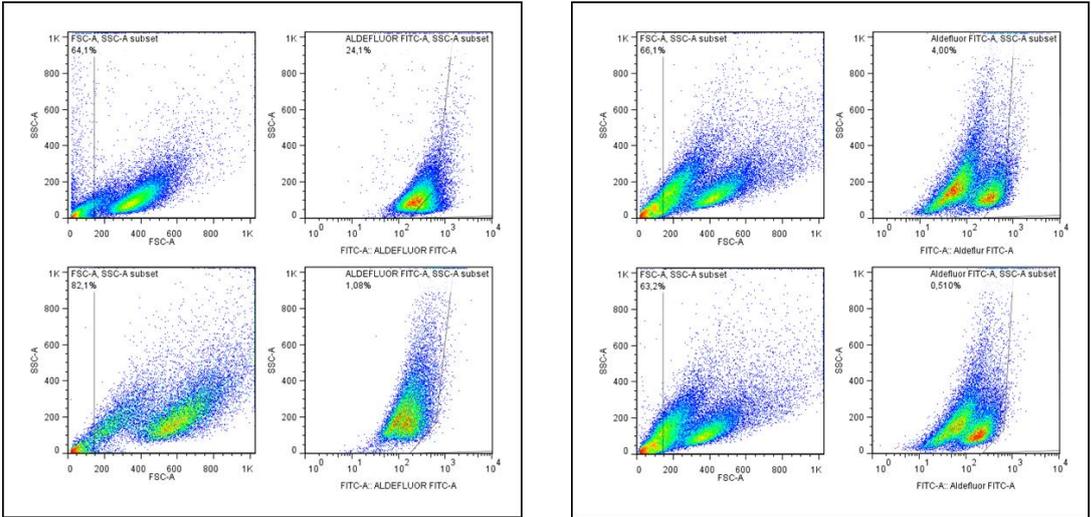


Abbildung 25: ALDH-Assay der Zelllinie R11. Das obere Dot-Plot zeigt jeweils das Ergebnis der Probe, das untere zeigt die Kontrolle durch Hinzufügen des Inhibitors DEAB. Die Ergebnisse des ersten Durchgangs sind links aufgeführt, die des zweiten rechts.

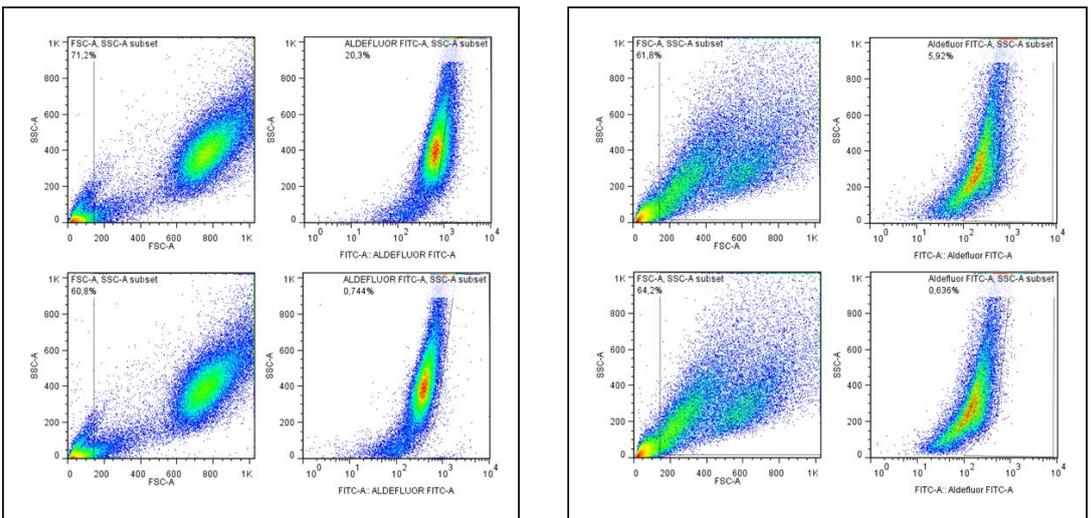


Abbildung 26: ALDH-Assay der Zelllinie R28. Das obere Dot-Plot zeigt jeweils das Ergebnis der Probe, das untere zeigt die Kontrolle durch Hinzufügen des Inhibitors DEAB. Die Ergebnisse des ersten Durchgangs sind links aufgeführt, die des zweiten rechts.

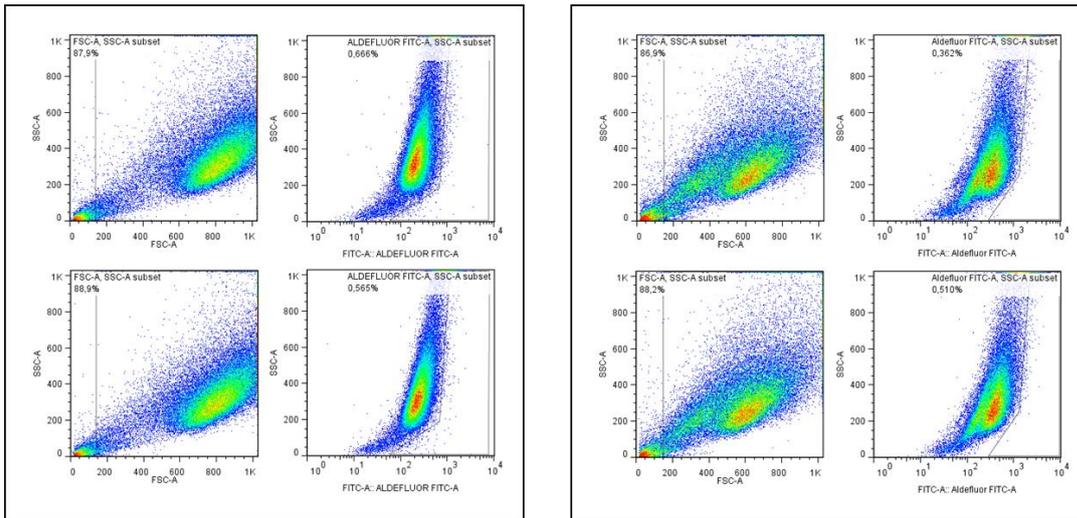


Abbildung 27: ALDH-Assay der Zelllinie A1207. Das obere Dot-Plot zeigt jeweils das Ergebnis der Probe, das untere zeigt die Kontrolle durch Hinzufügen des Inhibitors DEAB. Die Ergebnisse des ersten Durchgangs sind links aufgeführt, die des zweiten rechts.

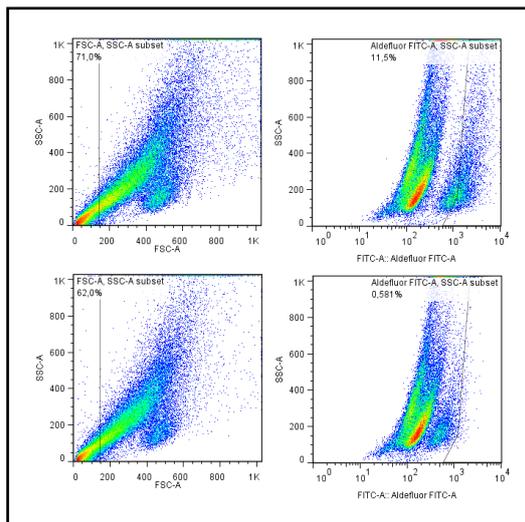


Abbildung 28: ALDH-Assay der Zelllinie MB3W1. Das obere Dot-Plot zeigt jeweils das Ergebnis der Probe, das untere zeigt die Kontrolle durch Hinzufügen des Inhibitors DEAB.

## 4. Diskussion

2014 waren in Deutschland bösartige Neubildungen die zweithäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, 2017). Durch die Erhöhung der Lebenserwartung hat sich seit 1970 die Zahl der Betroffenen fast verdoppelt. Zwar haben sich seitdem auch die Heilungschancen durch neue

Therapiemöglichkeiten verbessert, trotz dessen ist mit einem weiteren Anstieg der Krebserkrankungen zu rechnen (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017). Aufgrund der Häufigkeit von Progression und Rezidiven stellt das Harnblasenkarzinom weiterhin ein medizinisches Problem dar (Falso et al., 2012). In klinischen Studien und in der Grundlagenforschung ist das Harnblasenkarzinom, im Verhältnis dazu, jedoch unterrepräsentiert (Kunath et al., 2013).

Eine Therapie die gezielt gegen Tumorstammzellen gerichtet ist, die u. a. an der Resistenz gegen Chemo- und Radiotherapie beteiligt sind, eine Rolle bei Tumorrezidiven spielen und sehr wahrscheinlich auch der Grund für Metastasierung sind, könnte einen großen Fortschritt im Kampf gegen den Krebs bedeuten (Michael Dean, Tito Fojo, & Susan Bates, 2005; Yu et al., 2012). Grundlage hierfür ist die Identifikation und Charakterisierung von Tumorstammzellen.

#### **4.1 Bereitstellung der Tumorproben und Herstellung einer Einzelzellsuspension**

Voraussetzung für diese Arbeit war die einfache Beschaffung und der schonende Aufschluss von geeigneten Gewebeproben. Unser Ziel war es herauszufinden, ob es möglich ist, aus Cystektomiepräparaten eine Einzelzellsuspension herzustellen, die ausreichend viele lebende Zellen für die anschließenden Untersuchungen enthält.

Aus dem Probenmaterial wurde mit Hilfe des *gentleMACS™ Dissociators* von *Miltenyi Biotec* mit einer Kombination aus mechanischen Kräften sowie einer enzymatischen Wirkung eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese Art des Gewebeaufschlusses wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So wird unter anderem von Garaud und seinen Kollegen eine rein mechanische Behandlung verwendet, da durch die Enzyme sowohl die Vitalität signifikant reduziert werde als auch Oberflächenproteine zerstört würden (Garaud et al., 2014). Dagegen bevorzugen andere Autoren den enzymatischen Gewebeaufschluss, da durch die mechanische Einwirkung erhebliche Zellschädigungen aufträten und die Vitalität ebenfalls reduziert werden könnte (Camplejohn, 1992; Ljung et al., 1989;

Schneider et al., 2015). Zwar sei der mechanische Gewebeaufschluss einfach durchzuführen und meist auch günstiger, allerdings seien enzymatische Verfahren effektiver und die Ausbeute somit größer (Aronowitz, Lockhart, & Hakakian, 2015). Eine deutliche Steigerung der Ausbeute sei durch Kombination mechanischer und enzymatischer Verfahren möglich (Jager et al., 2016). Da für die Versuche dieser Dissertation eine große Ausbeute nötig war, erschien die Kombination einer schonenden enzymatischen und einer schonenden, aber effektiven, mechanischen Komponente am geeignetsten. Anhand der ermittelten Vitalität in den ersten vier Versuchen (Mittelwert von 92,9%) und der Zellzahlen (vgl. Tabelle 16) konnte gezeigt werden, dass durch diese einfach durchzuführende Methode gute Ergebnisse erzielt werden konnten.

Darüber hinaus stellte sich aber auch die Frage, ob die makroskopische Selektion der Tumorprobe für unsere Fragestellungen die geeignete Methode darstellt. Aufgrund der nur makroskopischen Beurteilung der Operationspräparate und Auswahl der Tumorproben aus den Operationspräparaten durch den Pathologen ist es möglich, dass auch gesundes Gewebe in den Tumorproben enthalten war. Außerdem ist es möglich, dass der Tumor nicht in der vollständigen Eindringtiefe erfasst wurde. Da allerdings beschrieben wurde, dass vor allem die Zellen der Basalzellschicht der Tumore bei Übertragung kanzerogene Eigenschaften zeigten, kann die Auswahl der Tumorprobe auch die Forschung bzw. die Ergebnisse beeinflussen (Chan et al., 2009). Um dieses Problem zu lösen, könnte für die Selektion der Tumorprobe zusätzlich eine histologische Begutachtung der Operationspräparate erfolgen. Auf diese Weise könnte die Qualität aber auch die Quantität der Tumorproben verbessert werden.

## **4.2 Magnet-assoziierte Zellsortierung**

Nach Herstellung der Einzelzellsuspension sollten die Zellsuspensionen für Tumorzellen angereichert werden. Hierfür sollte eine möglichst einfache und schnelle, aber effektive Methode angewendet werden. Zwei häufig verwendete Methoden zur Zellsortierung sind die Durchflusszytometrie-basierte Zellsortierung (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) und die Magnet-assoziierte Zellsortierung (MACS, *magnetic activated cell sorting*). De Wynter

und seine Kollegen verglichen fünf verschiedene Methoden zur Sortierung von CD34 positiven Zellen. Unter anderem wurden dabei die MACS-Methode und die FACS-Methode verglichen. Diese Studie postulierte, dass die Anreicherung durch das MACS-System den anderen Methoden überlegen sei (De Wynter et al., 1995). Miltenyi *et al.* zeigten, dass durch das MACS-System eine Reinheit von über 90% erreicht werden könnte (Miltenyi, Müller, Weichel, & Radbruch, 1990). Andere Autoren beschreiben zwar eine höhere Reinheit durch die FACS-Methode, allerdings sei der Einfluss auf die Zell-Aktivität durch die MACS-Methode geringer. So werde die Vitalität und die Chemotaxis der Zellen geringer beeinflusst (Q. Li et al., 2013). Die MACS-Technologie soll weder die interzelluläre Interaktion noch die Zelloberfläche signifikant beeinflussen, sodass dieses Verfahren bei nachfolgenden Untersuchungen sehr gut geeignet sei (Schmitz et al., 1994). Zudem ist diese Methode einfach durchzuführen, auch für größere Zellzahlen gut geeignet und im Vergleich zur FACS-Methode verhältnismäßig günstig und meist mit einem geringeren Zeitaufwand verbunden (Said et al., 2008). Beiden Verfahren gemeinsam ist, dass eine Markierung der Zellen notwendig ist (siehe auch Abschnitt 2.14 und 2.17). Die notwendige Markierung kann allerdings die Separationsmöglichkeiten limitieren (Tomlinson, Tomlinson, Yang, & Kirkham, 2012). Daher wird weiterhin an Methoden geforscht, die wenig kosten, keine Markierung der Zellen benötigen und zu einer guten Reinheit führen. Eine dieser neuen Methoden ist die Dielektrophorese-basierte Zellsortierung (Faraghat et al., 2017).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Magnet-assoziierte Zellseparation mehrfach angewendet. In einem ersten Schritt wurde eine Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen angestrebt. Diese Marker werden auf Blasenkarzinomzellen nicht exprimiert, sodass die Zellsuspensionen auf diese Weise für Blasenkarzinomzellen angereichert werden sollten (siehe auch Abschnitt 3.1.2). In dieser Dissertation konnte eine Reduktion von 76,3% CD31 positiver Zellen und eine Reduktion von 95,4% CD45 positiver Zellen erreicht werden. Anhand der Daten ist erkenntlich, dass die CD31 und CD45 positiven Zellen durch die Methode signifikant reduziert werden konnten. Zudem ist die

erreichte Reinheit vergleichbar mit der vorbeschriebenen Reinheit in der Literatur (Miltenyi et al., 1990).

In einem weiteren Schritt sollte die Zellsuspension in eine CD44 angereicherte und eine CD44 depletierte Zellsuspension aufgetrennt werden. Die Idee war, durch diese Auftrennung eine für Tumorstammzellen angereicherte Zellsuspension und eine depletierte Zellsuspension zu erhalten und diese Zellpopulationen zu charakterisieren. Wie in Abschnitt 1.2.4 dargelegt, wurde CD44 bereits 2009 als Tumorstammzellmarker im Harnblasenkarzinom beschrieben (Chan et al., 2009). Es wurden jedoch auch CD44 negative Tumore gefunden, sodass zu diesem Zeitpunkt nicht von einem universellen Tumorstammzellmarker im Harnblasenkarzinom ausgegangen wurde. Es findet sich allerdings auch eine Expression von CD44 im gesunden Urothel und in Stromazellen (Hofner et al., 2014). Daher wird CD44 alleine zur Anreicherung von Tumorstammzellen nicht mehr als ausreichend angesehen (Skowron et al., 2015).

In dieser Arbeit konnten in den eigentlich CD44 depletierten Zellsuspensionen noch durchschnittlich 13,4% CD44 positive Zellen nachgewiesen werden und die CD44 angereicherten Zellsuspensionen wiesen nur 37,4% CD44 positive Zellen auf, was einer gerade mal 2,8-fachen Anreicherung entspricht. Um die Reinheit der Zellsuspension zu erhöhen, wäre eine zweite beziehungsweise auch eine dritte Passage über die magnetisierte Säule möglich gewesen. Daneben wäre auch eine Kombination mit anderen Methoden, insbesondere eine Kombination mit der FACS-Methode, möglich gewesen. Da sich allerdings ein hoher Zellverlust bei der Auftrennung in eine CD44 angereicherte und eine CD44 depletierte Zellsuspension zeigte, mit einem durchschnittlichen Verlust von etwa 44,6% der Zellen in den Versuchen 2 bis 9, für die weiteren Versuche aber eine hohe Zellzahl nötig war, wurde auf weitere Aufreinigungsschritte verzichtet. In der Literatur wird beschrieben, dass sowohl die Magnet-assoziierte Zellsortierung als auch die Durchflusszytometrie- basierte Zellsortierung zu Zellverlusten von über 50% führen können. Als ursächlich hierfür werden Zellschädigungen durch das Verfahren und die Adhärenz von Zellen in den Säulen bzw. am Stempel angesehen. Zudem können Zellen auch in der residuellen Flüssigkeit in der Säule

zurückbleiben (Faraghat et al., 2017). Diese Zellverluste machen auch deutlich, dass die Anreicherung einer letztendlich sehr kleinen Population, wie Tumorstammzellen, durch diese Methode abhängig vom verwendeten magnetischen Feld zwar möglich, allerdings deutlich erschwert ist.

### **4.3 Zellkultur**

Um mikrobielle Verunreinigungen zu vermeiden, ist zur Kultivierung von Zellen eine aseptische Arbeitsweise wichtig. Zudem sind optimale Wachstumsbedingungen, wie das passende Nährmedium und die passende Temperatur, ein angemessener CO<sub>2</sub>-Gehalt und eine ausreichende Anzahl an Zellen, wichtig. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte das Verhalten der Zellen in der Kultur beobachtet werden. In drei Versuchen wurden jeweils eine Millionen Zellen für die Zellkultur verwendet. Allerdings blieb die Kultivierung in allen Versuchen erfolglos, sodass eine Kultivierung der Zellen nicht weiterverfolgt wurde. Die Zellen aus Versuch 5 zeigten nach dem ersten Mediumwechsel eine Kontamination und die Zellen aus den Versuchen 6 und 7 zeigten kein Wachstum in der Kultur. Da die Bearbeitung der Tumorproben durch den Pathologen nicht unter sterilen Bedingungen erfolgte, kann es bereits hier zu einer Kontamination gekommen sein. Hierfür spricht vor allem, dass die herkömmlichen in Kultur gehaltenen Tumorkulturen keine erhöhten Kontaminationsraten aufwiesen. Zwar wurde auf eine aseptische Arbeitsweise im Labor geachtet, trotzdem ist auch eine unsterile Arbeitsweise im Verlauf als Ursache für die Kontamination möglich. Durch die Zugabe von antimikrobiellen Substanzen, wie Penicillin und Streptomycin, in die verwendeten Medien versucht man einer Kontamination vorzubeugen. Tritt trotz dessen eine Kontamination auf, kann eine Resistenz vorliegen. Die Ursachen des fehlenden Wachstums in der Kultur können vielfältig sein. Unter anderem kann die ausgesäte Zellzahl das Wachstum negativ beeinflusst haben. Wird eine zu geringe Zellzahl ausgesät, können die Zellen nicht adhären und sterben ab. Da durch die Kultivierung vor allem die Stammzellen angereichert werden sollten, wurde ein spezielles Stammzellmedium verwendet (siehe Abschnitt 2.5 und 2.22). Es ist möglich, dass

die externen Faktoren (u. a. Temperatur, Licht) oder das verwendete Nährmedium keine optimalen Wachstumsbedingungen für die Zellen geboten haben. Solche Schwierigkeiten werden nicht selten bei der Verwendung von Primärkulturen beobachtet.

#### **4.4 Isotypenkontrolle**

Zellen und insbesondere Zellgemische können bei der FACS-Untersuchung unterschiedliche Autofluoreszenzen aufweisen und darüber hinaus Antikörper auch unspezifisch binden. Werden die Antigene stark exprimiert ist dies in der Regel weniger problematisch, da die Trennschärfe zwischen positiver und negativer Population erhalten bleibt. Schwieriger ist die Analyse allerdings bei nur schwach exprimierten Antigenen und wenn möglicherweise nur kleine Zellpopulationen betroffen sind. Zudem wird die standardisierte Analyse durch Variationen, welche von Präparat zu Präparat in heterogenen Zellsuspensionen aus Primärmaterial (wie in dieser Arbeit) auftreten, erschwert. Aufgrund dessen kamen zwei Kontrollmethoden zum Einsatz. Zum einen wurden klassische Isotypenkontrollen verwendet, die insbesondere die unspezifische Bindung eines Fluoreszenz markierten, aber irrelevanten Antikörpers der gleichen IG-Subklasse aufdecken sollen. Die Verwendung der Isoytpenkontrolle wird von Forschern jedoch kritisch diskutiert. Bei der perfekten Isotypenkontrolle sollten die Isotypenkontrolle und der Antikörper hinsichtlich der schweren Kette einschließlich des Subtyps und der leichten Kette exakt übereinstimmen. Das Verhältnis zwischen Fluorochrom und Protein sollte ebenso übereinstimmen und zusätzlich sollten der Antikörper und die Isotypenkontrolle auf die gleiche Weise hergestellt werden (Andersen et al., 2016). Die in dieser Arbeit verwendete Isotypenkontrolle bestand zwar aus der gleichen leichten Kette (Kappa), der Subtyp der schweren Kette unterschied sich allerdings (CD44-PE: IgG2b, Iso-PE: IgG1) (siehe auch Abschnitt 2.8 und 2.20). Es wird argumentiert, dass sich durch die unterschiedlichen Antigenbindestellen auch das Ausmaß an unspezifischen Bindungen unterscheidet (Hulspas, O'Gorman, Wood, Gratama, & Sutherland, 2009). Aber selbst ideal passende Antikörper/ Isotypenkontrollen

könnten ein unterschiedliches Ausmaß an unspezifischen Bindungen zeigen (Andersen et al., 2016). Daher überwiegt zunehmend die Meinung, dass Isotypenkontrollen zur Bestimmung des unspezifischen Hintergrunds und als *Gating*-Kontrolle nicht zu empfehlen sind (Andersen et al., 2016).

Zum anderen wurden für ausgewählte Antigene eine *fluorescence- (or full-)minus-one* (FMO)-Kontrolle eingeführt. Bei der FMO-Methode werden die positiven Zellen durch Vergleich von zwei Proben identifiziert. Eine Probe enthält dabei das vollständige Antikörper-*Panel* und die Vergleichsprobe enthält alle Antikörper bis auf den, der untersucht werden soll. Auf diese Weise soll die Autofluoreszenz der Zellen und das Einstrahlen von Signalen anderer Fluorochrome in den Detektionskanal kontrolliert werden. Vorteil dieser Methode ist, dass sie kostengünstig ist und überall angewendet werden kann.

#### **4.5 Nachweis der Expression von CD44, CD47 und CD326 im Harnblasenkarzinom**

Ein Ziel dieser Dissertation war es, die Tumorzellen phänotypisch zu charakterisieren. Dazu wurde die Expression der Oberflächenmarker CD44, CD47 und CD326 untersucht.

Eine Expression von CD44 konnte in allen Proben (11/11) gefunden werden. Eine Studie aus dem Jahr 2017 konnte eine Expression in 57,1% der Fälle ermitteln, bei einer anderen Studie wurde von 92,9% der untersuchten Proben CD44 exprimiert (Chan et al., 2009; Wasfy & El-Guindy, 2017). Zudem wurde eine Assoziation der CD44 Expression mit *high-grade* Tumoren und muskelinvasiven Tumoren beschrieben (Wasfy & El-Guindy, 2017). Bei allen Tumoren dieser Dissertation handelte es sich um *high-grade* Tumore und bis auf eine Tumorprobe, bei der es sich um einen multilokulären Tumor (pT1 pTis pN0 (0/22) pM0, L0 V0 Pn0) handelte, waren alle Tumorproben als pT2a bis pT4b eingestuft worden.

Des Weiteren wurde auch eine erhöhte Expression von CD47 als Tumorstammzellmarker im Harnblasenkarzinom identifiziert (Y. Li et al., 2017). In dieser Arbeit konnte in allen untersuchten Proben (11/11) eine Expression von CD47 nachgewiesen werden. Durchschnittlich waren bei 75,5%

(Standardabweichung: 21%) der Zellen eine Expression von CD47 nachweisbar. In einer Studie von Chan *et al.* wurde eine Expression von CD47 in mindestens 80% der Tumorzellen gefunden (Chan et al., 2009). Eine Korrelation zwischen der Expression von CD47 und dem Tumorstadium konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Die Expression unterscheidet sich nur zwischen Ta und T1 Tumoren signifikant (Olcucuoglu et al., 2017).

Ein weiteres Oberflächenprotein, welches in dieser Dissertation untersucht wurde, ist CD326 (EpCAM). CD326 wird von Tumoren epithelialen Ursprungs exprimiert, u. a. zeigen auch das *Carcinoma in situ* der Harnblase und *high-grade* Harnblasenkarzinome eine erhöhte Expression (Carlo Patriarca et al., 2012). Eine erhöhte Expression von CD326 wurde vor allem in pT2 bis pT4 Tumoren gefunden. In der Literatur konnte eine CD326 Positivität in 38,5% der pTa-pT4 Tumore gefunden werden. Im Tumorstadium pT2-pT4 zeigten 52% der Zellen eine Expression von CD326 (Went et al., 2004). In dieser Arbeit war in allen untersuchten Proben (9/9) eine Expression von CD326 nachweisbar. Durchschnittlich konnten 19,7% (Standardabweichung 16,7%) CD326 positive Zellen gefunden werden.

Bisher gibt es keinen universalen Oberflächenmarker. Bei der FACS-Analyse würde man die Blasenkarzinomstammzellen aber vermehrt im Bereich der CD44 bzw. CD47 positiven Zellen erwarten (Chan et al., 2009; Y. Li et al., 2017; C. T. Wu, Lin, Chen, & Chen, 2018).

#### **4.6 Identifikation von ALDH<sup>high</sup> Zellpopulationen in den Operationspräparaten**

Wie bereits in Abschnitt 1.2.2 aufgeführt, wurde die ALDH-Aktivität in verschiedenen Tumorarten als Stammzellmarker beschrieben. Der ALDH-Assay sollte zeigen, ob sich in den Operationspräparaten auch tatsächlich Zellen mit einem funktionellen Charakteristikum von Tumorstammzellen nachweisen lassen. Es konnten in allen (5/5) untersuchten Tumorproben Zellen mit erhöhter ALDH-Aktivität identifiziert werden. Durchschnittlich wiesen dabei 9,12% (Standardabweichung 5,55%) der Zellen eine erhöhte ALDH-Aktivität auf. Xu *et al.* fanden bei 29,1% (66/227) der untersuchten Proben eine erhöhte ALDH-

Expression. Zudem beschrieb diese Arbeitsgruppe eine Assoziation der ALDH-Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium (Xu et al., 2015). Die Daten aus dieser Arbeit und der Literatur sind allerdings nur eingeschränkt vergleichbar, da in dieser Arbeit nur fünf Tumorproben untersucht wurden, die alle in höhere Tumorstadien eingeordnet wurden (G3 Tumore, pT3a - pT4). Um die Aussagekraft zu erhöhen und die Daten besser mit der Literatur vergleichen zu können, müsste also die Probenzahl erhöht werden. Ein wichtiger Punkt ist allerdings, dass es insgesamt 19 verschiedene ALDH-Isoformen gibt, wobei abhängig von der Tumorentität und dem Ursprungsgewebe, vor allem die Isoformen ALDH1A1, ALDH1A2 und ALDH1A3 als potentielle Stammzellmarker identifiziert wurden (Flahaut et al., 2016; Marcato et al., 2011; Rodriguez-Torres & Allan, 2016). Im Harnblasenkarzinom wurde beschrieben, dass Zellpopulationen mit Nachweis der ALDH1A1 Stammzeleigenschaften aufweisen (Su et al., 2010). Für die Isoformen ALDH1A2 und ALDH2 wurde eine Funktion als Tumorsuppressor im Prostatakarzinom und im hepatozellulären Karzinom beschrieben (Jin et al., 2015; M. P. Kim et al., 2011). Initial wurde der ALDH-Assay zwar zum Nachweis der ALDH1-Aktivität entwickelt, neue Forschungsergebnisse beschreiben allerdings, dass deutlich mehr Isoformen bei Verwendung des ALDH-Assays eine Rolle spielen. Zhou und seine Kollegen konnten die Aktivität von neun Isoformen durch Verwendung des ALDH-Assays nachweisen. Da eine begrenzte Anzahl an Zelllinien untersucht wurden, könnten in anderen Tumorzelllinien auch andere Isoformen zur ALDH-Aktivität im ALDH-Assay beitragen (L. Zhou et al., 2018). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die mit Hilfe des ALDH-Assays identifizierten Zellpopulationen mit Nachweis einer erhöhten ALDH-Aktivität nicht ausschließlich Tumorstammzellen sein müssen (L. Zhou et al., 2018). Darüber hinaus wäre möglich, dass auch Isoformen, die nicht mittels ALDH-Assay detektiert werden, eine Rolle in der Tumorstammzellregulation spielen. Weiterführende Untersuchungen zur Identifikation der Isoformen, die im Harnblasenkarzinom durch den ALDH-Assay detektiert werden, könnten ergänzt werden. Zudem könnten auch die Isoformen untersucht werden, die nicht durch den ALDH-Assay erfasst werden.

Möglicherweise sind auch diese Isoformen, auf eine andere Weise, an der Tumorstammzellregulation beteiligt (L. Zhou et al., 2018).

#### **4.7 ALDH-Aktivität im Harnblasenkarzinom, CD44, CD47, CD133, CD326 und CD338 Koexpression**

Nach Untersuchung der ALDH-Expression in den Tumorproben wurde untersucht, ob sich auch eine Koexpression mit den Oberflächenmarkern CD44, CD47, CD133, CD326 und CD338 findet. In 75% (3/4) der Tumorproben konnten Populationen mit einer Koexpression von CD44 und ALDH identifiziert werden. Bei der Auswertung von Versuch 10 konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es auf Grund unzureichender Kompensation zu einem falsch positiven Signal (Leakage aus einem anderen Fluoreszenzkanal) gekommen ist. Da das nachträglich nicht eindeutig zu klären war, wurde der Versuch aus der Wertung genommen. In den Proben fanden sich durchschnittlich 5,6% (Standardabweichung 6,6%) CD44 positive Zellen mit erhöhter ALDH-Aktivität. Keymoosi *et al.* konnten in 30% (47/159) der untersuchten Proben eine Koexpression von CD44 und ALDH finden. Es konnte eine Korrelation zwischen der Koexpression von CD44 und ALDH sowie der Tumorgröße, dem *Grading* (*high-grade* Tumore), der Eindringtiefe des Tumors und Tumorrezidiven nachgewiesen werden (Keymoosi, Gheytauchi, Asgari, Sharifabrizi, & Madjd, 2014).

In allen vier untersuchten Proben konnten CD47 positive Zellen mit erhöhter ALDH-Aktivität identifiziert werden. Durchschnittlich zeigten dabei 10,5% (Standardabweichung 8,7%) der Zellen eine Koexpression von CD47 und ALDH. Dieser Oberflächenmarker wurde bereits als Tumorstammzellmarker im Harnblasenkarzinom beschrieben, sodass der Nachweis einer erhöhten ALDH-Aktivität dieser Zellen zu den Ergebnissen der Literatur passen könnte (Chan et al., 2009).

Eine Koexpression von CD326 und ALDH wurde nur in zwei Proben untersucht. In beiden Versuchen konnten CD326 positive Zellpopulationen mit erhöhter Aldehyddehydrogenase-Aktivität identifiziert werden. Diese Koexpression wiesen etwa 3,2% (Versuch 8) und 1,4% (Versuch 9) der Zellen auf. Auffallend

ist, dass in Versuch 9 eine deutlich größere Population eine erhöhte Aldehyddehydrogenase-Aktivität aufweist, aber CD326 negativ ist. Wie in Abschnitt 2.3 aufgeführt, wurde CD326 in verschiedenen Tumorarten als Tumorstammzellmarker beschrieben, jedoch nicht im Harnblasenkarzinom.

CD133 allein oder in Kombination mit anderen Markern wird zur Isolation von Stammzellen in gesundem Gewebe und von Tumorstammzellen genutzt (Eramo et al., 2007; Kordes et al., 2007). CD133 wurde als möglicher Tumorstammzellmarker im Harnblasenkarzinom beschrieben (Huang et al., 2013). Wir fanden in 66,6% (2/3) der untersuchten Proben CD133 positive Zellen mit erhöhter ALDH-Aktivität. In Versuch 10 zeigten 5,6% der Zellen eine Expression von CD133 und eine erhöhte ALDH-Aktivität, Versuch 11 zeigte eine sehr kleine Population (1,22%) mit Koexpression von ALDH und CD133. Das heißt, die Ergebnisse dieser Arbeit könnten darauf hindeuten, dass die CD326 und CD133 positiven Zellen im Harnblasenkarzinom funktionelle Stammzellcharakteristika aufweisen. Diese These müsste allerdings in erster Linie an einer größeren Probenzahl überprüft werden. Anschließend könnten weitere Versuche zum Nachweis stammzelltypischer Eigenschaften ergänzt werden.

Es wurde beschrieben, dass CD338 (ABCG2) positive Zelle in einigen Tumoren Tumorstammzellcharakteristika zeigen (Ding et al., 2010; Feng et al., 2015; Niess et al., 2015). Im nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom konnten den Zellen mit erhöhter CD338 Expression Stammzeleigenschaften *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden (Hepburn et al., 2012). In dieser Arbeit konnte in den drei untersuchten Proben keine Population identifiziert werden, die eine Expression von CD338 und eine erhöhte ALDH-Aktivität zeigt. In der Literatur konnten keine Daten bezüglich einer Koexpression von CD338 und einer erhöhten ALDH-Aktivität im Harnblasenkarzinom gefunden werden. Bei vorbeschriebenen Stammzeleigenschaften im nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom ist eine erhöhte ALDH-Aktivität auch im muskelinvasiven Harnblasenkarzinom durchaus möglich und müsste anhand einer höheren Probenzahl überprüft werden. Die vorliegende Studie bezieht sich zudem auf das nicht-muskelinvasive

Urothelkarzinom, die Koexpression von CD338 und ALDH wurde nur in muskelinvasiven Tumoren untersucht.

#### **4.8 Identifikation von ALDH<sup>high</sup> Zellpopulationen in den Zelllinien**

Die ALDH-Aktivität wurde zudem in drei Glioblastom-Zelllinien (R11, R28, A1207), einer Medulloblastom-Zelllinie (MB3W1) und in vier Harnblasenkarzinom-Zelllinien untersucht (RT4, J82, T24, TCCSUP). Alle Zelllinien bis auf die Zelllinie A1207 und fraglich auch die Zelllinie J82 zeigten Zellpopulationen mit erhöhter ALDH-Aktivität. Die untersuchte Zelllinie J82 zeigte allenfalls einen geringen Anteil an ALDH<sup>high</sup> Zellen (0,81%). In der Literatur konnten in einer untersuchten Probe der Zelllinie J82 1,4% Zellen mit erhöhter ALDH-Aktivität identifiziert werden (Inoue et al., 2017). Tumorstammzellen in der Zelllinie A1207 wurden bisher nicht beschrieben (Jeon et al., 2014). Vereinbar damit ließ sich auch in dieser Arbeit keine erhöhte ALDH-Aktivität, als funktionelles Stammzellcharakteristikum, nachweisen. In dieser Arbeit fanden sich in der Zelllinie TCCSUP bzw. T24 durchschnittlich 7,75% bzw. 5,32% Zellen mit erhöhter ALDH-Aktivität. Falso *et al.* konnten bei 3,3% (Standardabweichung 1,9%) der Zellen der Zelllinie TCCSUP und bei 8,8% (Standardabweichung 1,8%) der Zellen der Zelllinie T24 eine erhöhte ALDH-Aktivität finden (Falso et al., 2012). Zellen mit stammzelltypischen Eigenschaften wurden für die Zelllinie RT4 beschrieben (Jinesh et al., 2013). Der Nachweis einer erhöhten ALDH-Aktivität von einem Teil der Zellen, wie in dieser Arbeit bei 7,47% der Zellen, könnte also zu den Ergebnissen der Literatur passen. Ebenso wurde bereits beschrieben, dass die Glioblastom-Zelllinien R11 und R28 Zellen mit Stammzeleigenschaften aufweisen. So konnte als funktionelles Charakteristikum auch eine erhöhte ALDH-Aktivität von Zellen der Zelllinien R11, R28 und zudem von Zellen der Zelllinie MB3W1 nachgewiesen werden (Beier et al., 2007; S. Dietl et al., 2016). In dieser Arbeit konnten bei durchschnittlich 14,05% bzw. 13,11% der Zellen der Zelllinie R11 bzw. R28 eine erhöhte ALDH-Aktivität nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit den Literaturergebnissen. Bei 11,5% der Zellen der Zelllinie MB3W1 konnte eine

erhöhte ALDH-Aktivität dargestellt werden. Auffallend ist, dass die ALDH<sup>high</sup>-Populationen der Zelllinie T24 und vor allem der Zelllinie R11 in den zwei Versuchen sehr unterschiedlich ausfielen. Im ersten Versuch konnte in der Zelllinie R11 eine ALDH<sup>high</sup>-Population mit 24,1% der Zellen identifiziert werden während im zweiten Versuch eine ALDH<sup>high</sup>-Population mit nur 4% der Zellen gefunden wurde. Zudem unterscheiden sich auch die von uns ermittelten Werte für die Zelllinien TCCSUP und T24 von denen der Literatur. Eine ähnliche Beobachtung mit variierenden Messwerten in verschiedenen Arbeitsgruppen und auch innerhalb der gleichen Arbeitsgruppe wurde in der Literatur beschrieben. Opdenaker und seine Kollegen vermuteten als eine erklärende Ursache die unterschiedlichen Kulturbedingungen. Sie zeigten, dass unterschiedliche Zelldichten in der Kultur zu unterschiedlichen Messwerten führten (Opdenaker, Modarai, & Boman, 2015).

#### **4.9 Fazit**

Der *gentleMACS™ Dissociator* und die MACS-Methode zur Herstellung und Aufbereitung von Operationspräparaten haben sich als gut funktionierende und einfach durchzuführende Methoden erwiesen. Verbesserungen durch eine histologische Begutachtung der Präparate und eine sterile Arbeitsweise bei der Bereitstellung der Proben durch den Pathologen könnten die Quantität und die Qualität der Tumorproben verbessern, sodass zusätzliche Schritte, wie zum Beispiel eine weitere Passage über eine magnetisierte Säule, möglich wären. Die Auftrennung in eine CD44 angereicherte und eine CD44 depletierte Zellsuspension hat in dieser Arbeit nicht ausreichend funktioniert. In Kenntnis der in der Zwischenzeit publizierten Forschungsergebnisse kann dieser Schritt aber auch vernachlässigt werden. Aktuelle Forschungsergebnisse legen nahe, dass es sehr wahrscheinlich nicht möglich ist, durch eine einzige Methode Tumorstammzellen mit hoher Reinheit zu isolieren (Awad et al., 2010). Vielmehr könnte die Reinheit einer Tumorstammzellpopulation durch die Kombination von mehreren Methoden verbessert werden, z. B. könnte der Nachweis von spezifischen Oberflächenmarkern mit dem Nachweis einer erhöhten ALDH-

Aktivität kombiniert werden. Mit Hilfe des ALDH-Assays konnte in allen (5/5) untersuchten Operationspräparaten ALDH<sup>high</sup>-Zellpopulationen identifiziert werden. Das heißt, in diesen Proben weist zumindest ein Teil der Zellen funktionelle Stammzellcharakteristika auf. Zusätzlich zu den im Harnblasenkarzinom bereits vorbeschriebenen Tumorstammzellmarkern CD44, CD47 und dem möglichen Tumorstammzellmarker CD133, zeigten in zwei untersuchten Proben zumindest ein kleiner Anteil der Zellen eine Koexpression von ALDH und CD326. Möglicherweise ist dieser Oberflächenmarker ebenfalls ein Tumorstammzellmarker im Harnblasenkarzinom. Diese Hypothese müsste an einer größeren Stichprobe bestätigt werden. Nachfolgend könnten weitere *in vivo*- und *in vitro*-Tests zum Nachweis von stammzelltypischen Eigenschaften erfolgen. Weitere Untersuchungen der ALDH-Isoformen könnten zum Verständnis der Regulation von Tumorstammzellen beitragen.

## **5. Zusammenfassung**

Nach der Tumorstammzell-Theorie gibt es in Tumoren eine geringe Anzahl an Zellen, die sogenannten Tumorstammzellen, welche die Fähigkeiten der Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung besitzen. Diese Zellen werden unter anderem für die Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapien verantwortlich gemacht und sollen auch sehr wahrscheinlich an der Metastasierung von Tumoren beteiligt sein (Michael Dean et al., 2005; Yu et al., 2012). Eine Therapie, die direkt gegen die Tumorstammzellen gerichtet ist, könnte einen großen Fortschritt im Kampf gegen den Krebs bedeuten.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Operationspräparaten und die anschließende phänotypische Charakterisierung mit Nachweis der Oberflächenmarker CD44, CD47 und CD326. Ein weiteres Ziel war es zu überprüfen, ob es in den Operationspräparaten und in den Zelllinien T24, RT4, J82, TCCSUP, MB3W1, R11, R28 und A1207 Zellen gibt, die funktionelle Stammzellcharakteristika aufweisen. Um diese Ziele zu erreichen waren die Anwendung und Etablierung einiger Methoden notwendig.

Die Einzelzellsuspensionen wurden mit Hilfe des *gentleMACS™ Dissociators* durch Kombination mechanischer Kräfte und einer enzymatischen Komponente hergestellt. Das Verfahren zeigte gute Ergebnisse mit einer Vitalität zwischen 89% und 96,4%. Die Zellsuspensionen wurden nachfolgend mittels magnetisch-aktivierter Zellsortierung für Tumorzellen angereichert. Im ersten Schritt sollten die CD31 und CD45 positiven Zellen entfernt werden. Nachfolgend sollte eine Auftrennung in eine CD44 angereicherte und eine CD44 depletierte Zellsuspension erfolgen. Hier zeigte sich allerdings, dass im Vergleich zum Ausgangsmaterial keine Anreicherung dieser Zellen erreicht wurde. In allen untersuchten Proben konnten Zellen nachgewiesen werden die CD44 (11/11), CD47 (11/11) und CD326 (9/9) exprimieren. Der ALDH-Assay diente dem Nachweis funktioneller Stammzellcharakteristika. In allen untersuchten Proben (5/5) konnten ALDH<sup>high</sup>-Populationen identifiziert werden. Anschließend wurde untersucht, ob sich Zellpopulationen finden, die eine Expression von CD44 bzw. CD47, CD133, CD326, CD338 zeigen und gleichzeitig eine erhöhte ALDH-Aktivität aufweisen. In 75% (3/4) bzw. 100% (4/4) konnte eine Expression von CD44 bzw. CD47 und eine erhöhte ALDH-Aktivität gefunden werden. Eine Koexpression der ALDH und CD326 konnte in beiden untersuchten Proben gefunden werden, eine Koexpression der ALDH und CD133 fand sich in 66,6% (2/3). Eine Koexpression von CD338 und ALDH konnte in den untersuchten Proben (0/3) nicht gefunden werden. Den Zellen der Zelllinie A1207 konnte im Rahmen dieser Dissertation keine erhöhte ALDH-Aktivität zugeordnet werden. Die untersuchte Zelllinie J82 zeigte allenfalls nur einen geringen Anteil an ALDH<sup>high</sup> Zellen. In den übrigen Zelllinien (TCCSUP, MB3W1, T24, R11, R28, RT4) konnten Zellen mit erhöhter ALDH-Aktivität identifiziert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass sich das muskelinvasive Harnblasenkarzinom aus einer heterogenen Tumorzellpopulation zusammensetzt, in der sich auch Subpopulationen finden lassen, denen Stammzellcharakteristika zugeschrieben werden können. Damit lassen sich Arbeitshypothesen entwickeln, inwieweit diese Populationen einen diagnostischen Stellenwert bzw. ein therapeutisches Target darstellen. Zukünftige Projekte könnten so beispielsweise die geschilderten Aufreinigungsmethoden über phänotypische und funktionelle

Marker mit neuen Technologien der Einzelzellsequenzierung kombinieren, um so zu neuen Erkenntnissen zur Biologie dieser Tumorentität zu gelangen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Butz, M.: Beruflich verursachte Krebserkrankungen. 10. Auflage. DGUV 2012 ([http://publikationen.dguv.de/dguv/pdf/10002/berufl\\_krebs-07-14-06.pdf](http://publikationen.dguv.de/dguv/pdf/10002/berufl_krebs-07-14-06.pdf))
- Virchow, R., Editorial. Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med 1855,3:23  
Cohnheim, J., ueber entzundung und eiterung. Path Anat Physiol Klin Med 1867; 40:1-79
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
- Alfred Witjes, J., Lebet, T., Comperat, E. M., Cowan, N. C., De Santis, M., Bruins, H. M., Ribal, M. J. (2017). Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol*, 71(3), 462-475. doi:10.1016/j.eururo.2016.06.020
- Alfred Witjes, J., Lebet, T., Comp rat, E. M., Cowan, N. C., De Santis, M., Bruins, H. M., Ribal, M. J. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *European Urology*, 71(3), 462-475. doi:10.1016/j.eururo.2016.06.020
- Allard, Bernard, Fradet, & T tu. (1998). The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer a proposed prognostic index, British Journal of Urology Volume 81, Issue 5. *British Journal of Urology*, 81(5), 692-698. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1464-410x.1998.00628.x/abstract>
- Andersen, M. N., Al-Karradi, S. N. H., Kragstrup, T. W., & Hokland, M. (2016). Elimination of erroneous results in flow cytometry caused by antibody binding to Fc receptors on human monocytes and macrophages. *Cytometry Part A*, 89(11), 1001-1009. doi:10.1002/cyto.a.22995
- Andriole, G. L., Sandlund, J. T., Miser, J. S., Arasi, V., Linehan, M., & Magrath, I. T. (1987). The efficacy of mesna (2-mercaptoethane sodium sulfonate) as a uroprotectant in patients with hemorrhagic cystitis receiving further oxazaphosphorine chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 5(5), 799-803. doi:10.1200/jco.1987.5.5.799
- Aronowitz, J. A., Lockhart, R. A., & Hakakian, C. S. (2015). Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *SpringerPlus*, 4, 713. doi:10.1186/s40064-015-1509-2
- Atlasi, Y., Mowla, S. J., Ziaee, S. A. M., & Bahrami, A.-R. (2007). OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer International Journal of Cancer Volume 120, Issue 7. *International Journal of Cancer*, 120(7), 1598-1602. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.22508/abstract>
- Awad, O., Yustein, J. T., Shah, P., Gul, N., Katuri, V., O'Neill, A., Loeb, D. M. (2010). High ALDH activity identifies chemotherapy-resistant Ewing's sarcoma stem cells that retain sensitivity to EWS-FLI1 inhibition. *PLOS ONE*, 5(11), e13943-e13943. doi:10.1371/journal.pone.0013943
- Azoulay, L., Yin, H., Filion, K. B., Assayag, J., Majdan, A., Pollak, M. N., & Suissa, S. (2012). The use of pioglitazone and the risk of bladder cancer in people

- with type 2 diabetes: nested case-control study. *BMJ British Medical Journal*, 344. doi:10.1136/bmj.e3645
- Babjuk, M., Bohle, A., Burger, M., Capoun, O., Cohen, D., Comperat, E. M., Zigeuner, R. (2017). EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*, 71(3), 447-461. doi:10.1016/j.eururo.2016.05.041
- Baris, D., Waddell, R., Beane Freeman, L. E., Schwenn, M., Colt, J. S., Ayotte, J. D., Silverman, D. T. (2016). Elevated Bladder Cancer in Northern New England: The Role of Drinking Water and Arsenic. *J Natl Cancer Inst*, 108(9). doi:10.1093/jnci/djw099
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., Beier, C. P. (2007). CD133 and CD133 Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles. 67(9), 4010-4015. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4180 %J Cancer Research
- Bentivegna, A., Conconi, D., Panzeri, E., Sala, E., Bovo, G., Viganò, P., Dalprà, L. (2010). Biological heterogeneity of putative bladder cancer stem-like cell populations from human bladder transitional cell carcinoma samples Cancer Science Volume 101, Issue 2. *Cancer Science*, 101(2), 416-424. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2009.01414.x/abstract>
- Bohle, A., Jocham, D., & Bock, P. R. (2003). Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol*, 169(1), 90-95. doi:10.1097/01.ju.0000039680.90768.b3
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3(7), 730-737.
- Brennan, P., Bogillot, O., Cordier, S., Greiser, E., Schill, W., Vineis, P., Boffetta, P. (2000). Cigarette smoking and bladder cancer in men: A pooled analysis of 11 case-control studies. 86(2), 289-294. doi:10.1002/(sici)1097-0215(20000415)86:2<289::Aid-ijc21>3.0.Co;2-m
- Brierley, J. D., Gospodarowicz, M.K. and Wittekind, C. (2017). Introduction. In *TNM Online* (pp. 1-16).
- Brown, E. J., & Frazier, W. A. (2001). Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in Cell Biology*, 11(3), 130-135. doi:https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01906-1
- Brown, F. M. (2000). Urine cytology. It is still the gold standard for screening? *Urol Clin North Am*, 27(1), 25-37.
- Bruemmer, B., White, E., Vaughan, T. L., & Cheney, C. L. (1997). Fluid intake and the incidence of bladder cancer among middle-aged men and women in a three-county area of western Washington. *Nutr Cancer*, 29(2), 163-168. doi:10.1080/01635589709514619
- Bryan, R. T. (2015). Cell adhesion and urothelial bladder cancer: the role of cadherin switching and related phenomena. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1661), 20140042. doi:10.1098/rstb.2014.0042

- Bubeník, J., Barešová, M., Viklický, V., Jakoubková, J., Sainerová, H., & Donner, J. (1973). Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *International Journal of Cancer*, *11*(3), 765-773. doi:10.1002/ijc.2910110327
- Burger, H., Foekens, J. A., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E., Klijn, J. G. M., Wiemer, E. A. C., Nooter, K. (2003). RNA Expression of Breast Cancer Resistance Protein, Lung Resistance-related Protein, Multidrug Resistance-associated Proteins 1 and 2, and Multidrug Resistance Gene 1 in Breast Cancer. *Correlation with Chemotherapeutic Response*, *9*(2), 827-836.
- Burger, M., Catto, J. W., Dalbagni, G., Grossman, H. B., Herr, H., Karakiewicz, P., Lotan, Y. (2013). Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*, *63*(2), 234-241. doi:10.1016/j.eururo.2012.07.033
- Camplejohn, R. S. (1992). Flow cytometry. *The Journal of Pathology*, *166*(3), 323-326. doi:10.1002/path.1711660317
- Cantor, K. P. (1997). Drinking water and cancer. *Cancer Causes Control*, *8*(3), 292-308.
- Chan, K. S., Espinosa, I., Chao, M., Wong, D., Ailles, L., Diehn, M., Weissman, I. L. (2009). Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(33), 14016-14021. doi:10.1073/pnas.0906549106
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of Hematology & Oncology*, *11*, 64. doi:10.1186/s13045-018-0605-5
- Cheung, A. M., Wan, T. S., Leung, J. C., Chan, L. Y., Huang, H., Kwong, Y. L., Leung, A. Y. (2007). Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia*, *21*(7), 1423-1430. doi:10.1038/sj.leu.2404721
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H. M., Jones, D. L., Wahl, G. M. (2006). Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, *66*(19), 9339-9344. doi:10.1158/0008-5472.can-06-3126
- Clarke, M. F., & Fuller, M. (2006). Stem Cells and Cancer: Two Faces of Eve. *Cell*, *124*(6), 1111-1115. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.011
- Cole, P. (1971). Coffee-drinking and cancer of the lower urinary tract. *Lancet*, *1*(7713), 1335-1337.
- Crundwell, M. (2004). Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. *94*(4), 675-675. doi:10.1111/j.1464-410X.2003.05068.x
- De Wynter, E. A., Coutinho, L. H., Pei, X., Marsh, J. C. W., Hows, J., Luft, T., & Testa, N. G. (1995). Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. *STEM CELLS*, *13*(5), 524-532. doi:10.1002/stem.5530130510
- Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, *5*(4), 275-284. doi:10.1038/nrc1590

- Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 5(4), 275-284.
- Dietl, S., Schwinn, S., Dietl, S., Riedel, S., Deinlein, F., Rutkowski, S., Wolf, M. (2016). MB3W1 is an orthotopic xenograft model for anaplastic medulloblastoma displaying cancer stem cell- and Group 3-properties. *BMC Cancer*, 16, 115. doi:10.1186/s12885-016-2170-z
- Dietl, S., Schwinn, S., Dietl, S., Riedel, S., Deinlein, F., Rutkowski, S., Wölfl, M. (2016). MB3W1 is an orthotopic xenograft model for anaplastic medulloblastoma displaying cancer stem cell- and Group 3-properties. *BMC cancer*, 16, 115-115. doi:10.1186/s12885-016-2170-z
- Ding, X.-w., Wu, J.-h., & Jiang, C.-p. (2010). ABCG2: A potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sciences*, 86(17), 631-637. doi:https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.02.012
- Djousse, L., Schatzkin, A., Chibnik, L. B., D'Agostino, R. B., Kreger, B. E., & Ellison, R. C. (2004). Alcohol consumption and the risk of bladder cancer in the Framingham Heart Study. *J Natl Cancer Inst*, 96(18), 1397-1400. doi:10.1093/jnci/djh263
- Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley, J. M., Jackson, K. W., Clarke, M. F., Kawamura, M. J., & Wicha, M. S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & development*, 17(10), 1253-1270. doi:10.1101/gad.1061803
- Dorp, F. v., Schatzl, G., Rübber, H., & Steiner, H. (2010). Harnblasenkarzinom. *Wiener klinisches Magazin*, 13(6), 6-12. doi:10.1007/s00740-010-0298-z
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15665-15670.
- Elcock, M., & Morgan, R. W. (1993). Update on artificial sweeteners and bladder cancer. *Regul Toxicol Pharmacol*, 17(1), 35-43. doi:10.1006/rtph.1993.1004
- 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. *Am J Surg Pathol*, 22(12), 1435-1448.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pillozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., De Maria, R. (2007). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death And Differentiation*, 15, 504. doi:10.1038/sj.cdd.4402283
- <https://www.nature.com/articles/4402283#supplementary-information>
- Espejo-Herrera, N., Cantor, K. P., Malats, N., Silverman, D. T., Tardon, A., Garcia-Closas, R., Villanueva, C. M. (2015). Nitrate in drinking water and bladder cancer risk in Spain. *Environ Res*, 137, 299-307. doi:10.1016/j.envres.2014.10.034
- Eyvazi, S., Farajnia, S., Dastmalchi, S., Kanipour, F., Zarredar, H., & Bandehpour, M. (2018). Antibody based EpCAM targeted Therapy of Cancer, Review and update. *Curr Cancer Drug Targets*. doi:10.2174/1568009618666180102102311

- Falso, M. J., Buchholz, B. A., & White, R. W. (2012). Stem-like cells in bladder cancer cell lines with differential sensitivity to cisplatin. *Anticancer Res*, 32(3), 733-738.
- Faraghat, S. A., Hoettges, K. F., Steinbach, M. K., van der Veen, D. R., Brackenbury, W. J., Henslee, E. A., Hughes, M. P. (2017). High-throughput, low-loss, low-cost, and label-free cell separation using electrophysiology-activated cell enrichment. *114(18)*, 4591-4596. doi:10.1073/pnas.1700773114 %J Proceedings of the National Academy of Sciences
- Feng, L., Wu, J. B., & Yi, F. M. (2015). Isolation and phenotypic characterization of cancer stem-like side population cells in colon cancer. *Mol Med Rep*, 12(3), 3531-3536. doi:10.3892/mmr.2015.3801
- Fernandez, M. I., Lopez, J. F., Vivaldi, B., & Coz, F. (2012). Long-term impact of arsenic in drinking water on bladder cancer health care and mortality rates 20 years after end of exposure. *J Urol*, 187(3), 856-861. doi:10.1016/j.juro.2011.10.157
- Filbeck, T., Pichlmeier, U., Knuechel, R., Wieland, W. F., & Roessler, W. (2002). Do patients profit from 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis in transurethral resection of bladder carcinoma? *Urology*, 60(6), 1025-1028.
- Flahaut, M., Jauquier, N., Chevalier, N., Nardou, K., Balmas Bourloud, K., Joseph, J.-M., Mühlethaler-Mottet, A. (2016). Aldehyde dehydrogenase activity plays a Key role in the aggressive phenotype of neuroblastoma. *BMC Cancer*, 16, 781. doi:10.1186/s12885-016-2820-1
- Fradet, Y., Grossman, H. B., Gomella, L., Lerner, S., Cookson, M., Albala, D., & Droller, M. J. (2007). A Comparison of Hexaminolevulinic Acid Fluorescence Cystoscopy and White Light Cystoscopy for the Detection of Carcinoma In Situ in Patients With Bladder Cancer: A Phase III, Multicenter Study. *The Journal of Urology*, 178(1), 68-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2007.03.028>
- Garaud, S., Gu-Trantien, C., Lodewyckx, J.-N., Boisson, A., De Silva, P., Buisseret, L., Willard-Gallo, K. (2014). A Simple and Rapid Protocol to Non-enzymatically Dissociate Fresh Human Tissues for the Analysis of Infiltrating Lymphocytes. *Journal of visualized experiments : JoVE(94)*, 52392. doi:10.3791/52392
- Glas, A. S., Roos, D., Deutekom, M., Zwinderman, A. H., Bossuyt, P. M., & Kurth, K. H. (2003). Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J Urol*, 169(6), 1975-1982. doi:10.1097/01.ju.0000067461.30468.6d
- Golebiewska, A., Brons, N. H., Bjerkvig, R., & Niclou, S. P. (2011). Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell*, 8(2), 136-147. doi:10.1016/j.stem.2011.01.007
- Grignon, D. J. (2009). The current classification of urothelial neoplasms. *Mod Pathol*, 22 Suppl 2, S60-69. doi:10.1038/modpathol.2008.235
- Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., Haussmann, I., .Herrlich, P. (1991). A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, 65(1), 13-24. doi:10.1016/0092-8674(91)90403-l

- Hartge, P., Hoover, R., West, D. W., & Lyon, J. L. (1983). Coffee drinking and risk of bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 70(6), 1021-1026.
- He, X., Marchionni, L., Hansel, D. E., Yu, W., Sood, A., Yang, J., Berman, D. M. (2009). Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma. *Stem Cells*, 27(7), 1487-1495. doi:10.1002/stem.92
- Hepburn, A. C., Veeratterapillay, R., Williamson, S. C., El-Sherif, A., Sahay, N., Thomas, H. D., Heer, R. (2012). Side Population in Human Non-Muscle Invasive Bladder Cancer Enriches for Cancer Stem Cells That Are Maintained by MAPK Signalling. *PLOS ONE*, 7(11), e50690. doi:10.1371/journal.pone.0050690
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 1(3), 313-323. doi:10.1016/j.stem.2007.06.002
- Hofner, T., Macher-Goeppinger, S., Klein, C., Schillert, A., Eisen, C., Wagner, S., Sprick, M. R. (2014). Expression and prognostic significance of cancer stem cell markers CD24 and CD44 in urothelial bladder cancer xenografts and patients undergoing radical cystectomy. *Urol Oncol*, 32(5), 678-686. doi:10.1016/j.urolonc.2014.01.001
- Hu, J., Li, J., Yue, X., Wang, J., Liu, J., Sun, L., & Kong, D. (2017). Expression of the cancer stem cell markers ABCG2 and OCT-4 in right-sided colon cancer predicts recurrence and poor outcomes. *Oncotarget*, 8(17), 28463-28470. doi:10.18632/oncotarget.15307
- Huang, P., Watanabe, M., Kaku, H., Ueki, H., Noguchi, H., Sugimoto, M., Kumon, H. (2013). Cancer stem cell-like characteristics of a CD133(+) subpopulation in the J82 human bladder cancer cell line. *Mol Clin Oncol*, 1(1), 180-184. doi:10.3892/mco.2012.29
- Hueper, W. C. (1942). *Occupational tumors and allied diseases*. Springfield, Ill., Baltimore, Md.: C. C. Thomas.
- Hulspas, R., O'Gorman, M. R. G., Wood, B. L., Gratama, J. W., & Sutherland, D. R. (2009). Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 76B(6), 355-364. doi:10.1002/cyto.b.20485
- 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. *Eur Urol*, 70(1), 106-119. doi:10.1016/j.eururo.2016.02.028
- Imrich, S., Hachmeister, M., & Gires, O. (2012). EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adhesion & Migration*, 6(1), 30-38. doi:10.4161/cam.18953
- Inoue, R., Hirohashi, Y., Kitamura, H., Nishida, S., Murai, A., Takaya, A., Torigoe, T. (2017). GRIK2 has a role in the maintenance of urothelial carcinoma stem-like cells, and its expression is associated with poorer prognosis. *Oncotarget*, 8(17), 28826-28839. doi:10.18632/oncotarget.16259
- Israel, I., Blass, G., Reiners, C., & Samnick, S. (2011). Validation of an amino-acid-based radionuclide therapy plus external beam radiotherapy in heterotopic glioblastoma models. *Nuclear Medicine and Biology*, 38(4), 451-460. doi:https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2010.12.002

- Jager, L. D., Canda, C.-M. A., Hall, C. A., Heilingoetter, C. L., Huynh, J., Kwok, S. S., Jensen, M. B. (2016). Effect of enzymatic and mechanical methods of dissociation on neural progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells. *Advances in medical sciences*, 61(1), 78-84. doi:10.1016/j.advms.2015.09.005
- Jaiswal, S., Jamieson, C. H. M., Pang, W. W., Park, C. Y., Chao, M. P., Majeti, R., Weissman, I. L. (2009). CD47 is up-regulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*, 138(2), 271-285. doi:10.1016/j.cell.2009.05.046
- Jeon, H.-M., Kim, S.-H., Jin, X., Park, J. B., Kim, S. H., Joshi, K., Kim, H. (2014). Crosstalk between Glioma-Initiating Cells and Endothelial Cells Drives Tumor Progression. *Cancer research*, 74(16), 4482-4492. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1597
- Jiang, X., Castelao, J. E., Groshen, S., Cortessis, V. K., Ross, R. K., Conti, D. V., & Gago-Dominguez, M. (2007). Alcohol consumption and risk of bladder cancer in Los Angeles County International Journal of Cancer Volume 121, Issue 4. *International Journal of Cancer*, 121(4), 839-845. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.22743/abstract>
- Jin, S., Chen, J., Chen, L., Histen, G., Lin, Z., Gross, S., Cang, Y. (2015). ALDH2(E487K) mutation increases protein turnover and promotes murine hepatocarcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(29), 9088-9093. doi:10.1073/pnas.1510757112
- Jinesh, G. G., Choi, W., Shah, J. B., Lee, E. K., Willis, D. L., & Kamat, A. M. (2013). Blebbistatins, the emergency program for cancer stem cells: sphere formation and tumorigenesis after apoptosis. *Cell Death And Differentiation*, 20(3), 382-395. doi:10.1038/cdd.2012.140
- Jocham, D., Stepp, H., & Waidelich, R. (2008). Photodynamic diagnosis in urology: state-of-the-art. *Eur Urol*, 53(6), 1138-1148. doi:10.1016/j.eururo.2007.11.048
- Johansson, S. L., & Cohen, S. M. (1997). Epidemiology and etiology of bladder cancer Seminars in Surgical Oncology Volume 13, Issue 5. *Seminars in Surgical Oncology*, 13(5), 291-298. [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-2388\(199709/10\)13:5<291::AID-SSU2>3.0.CO;2-8/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-2388(199709/10)13:5<291::AID-SSU2>3.0.CO;2-8/abstract)
- Jones, R. R., Weyer, P. J., DellaValle, C. T., Inoue-Choi, M., Anderson, K. E., Cantor, K. P., Ward, M. H. (2016). Nitrate from Drinking Water and Diet and Bladder Cancer Among Postmenopausal Women in Iowa. *Environ Health Perspect*, 124(11), 1751-1758. doi:10.1289/EHP191
- Karsten, U., & Goletz, S. (2013). What makes cancer stem cell markers different? *SpringerPlus*, 2(1), 301. doi:10.1186/2193-1801-2-301
- Keymoosi, H., Gheytauchi, E., Asgari, M., Sharifabrizi, A., & Madjd, Z. (2014). ALDH1 in combination with CD44 as putative cancer stem cell markers are correlated with poor prognosis in urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(5), 2013-2020.
- Keysar, S. B., & Jimeno, A. (2010). More than Markers: Biological Significance of Cancer Stem Cell-Defining Molecules. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(9), 2450-2457. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0530

- Kim, M. P., Fleming, J. B., Wang, H., Abbruzzese, J. L., Choi, W., Kopetz, S., Gallick, G. E. (2011). ALDH Activity Selectively Defines an Enhanced Tumor-Initiating Cell Population Relative to CD133 Expression in Human Pancreatic Adenocarcinoma. *PLOS ONE*, 6(6), e20636. doi:10.1371/journal.pone.0020636
- Kim, Y. H., Ishii, G., Goto, K., Ota, S., Kubota, K., Murata, Y., Ochiai, A. (2009). Expression of breast cancer resistance protein is associated with a poor clinical outcome in patients with small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 65(1), 105-111. doi:10.1016/j.lungcan.2008.10.008
- King, W. D., & Marrett, L. D. (1996). Case-control study of bladder cancer and chlorination by-products in treated water (Ontario, Canada). *Cancer Causes Control*, 7(6), 596-604.
- Kordes, C., Sawitza, I., Müller-Marbach, A., Ale-Agha, N., Keitel, V., Klonowski-Stumpe, H., & Häussinger, D. (2007). CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(2), 410-417. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.029
- Koss, L. G., Deitch, D., Ramanathan, R., & Sherman, A. B. (1985). Diagnostic value of cytology of voided urine. *Acta Cytol*, 29(5), 810-816.
- Kotake, T., Flanigan, R. C., Kirkels, W. J., Matsumura, Y. H. Y., Newling, D. W. W., Prapotnich, D., Wallace, D. N. A. (1995). The Current TNM Classification of Bladder Carcinoma. is it as good as we need it to be? *International Journal of Urology* Volume 2, Issue 1. *International Journal of Urology*, 2(1), 36-40. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1442-2042.1995.tb00070.x/abstract>
- Kunath, F., Krause, S. F., Wullich, B., Goebell, P. J., Engehausen, D. G., Burger, M., Keck, B. (2013). Bladder cancer – the neglected tumor: a descriptive analysis of publications referenced in MEDLINE and data from the register clinicaltrials.gov. *BMC Urology*, 13(1), 1-8. doi:10.1186/1471-2490-13-56
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645-648.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Simeone, D. M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 67(3), 1030-1037. doi:10.1158/0008-5472.Can-06-2030
- Li, Q., Zhang, X., Peng, Y., Chai, H., Xu, Y., Wei, J., Huang, D. (2013). Comparison of the Sorting Efficiency and Influence on Cell Function between the Sterile Flow Cytometry and Immunomagnetic Bead Purification Methods. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43(2), 197-206. doi:10.1080/10826068.2012.719846
- Li, Y., Lin, K., Yang, Z., Han, N., Quan, X., Guo, X., & Li, C. (2017). Bladder cancer stem cells: clonal origin and therapeutic perspectives. *Oncotarget*, 8(39), 66668-66679. doi:10.18632/oncotarget.19112
- Litvinov, S. V., van Driel, W., van Rhijn, C. M., Bakker, H. A., van Krieken, H., Fleuren, G. J., & Warnaar, S. O. (1996). Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *The American Journal of Pathology*, 148(3), 865-875.

- Litvinov, S. V., Velders, M. P., Bakker, H. A., Fleuren, G. J., & Warnaar, S. O. (1994). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *The Journal of Cell Biology*, *125*(2), 437-446. doi:10.1083/jcb.125.2.437
- Liu, A., Yu, X., & Liu, S. (2013). Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. *Chinese Journal of Cancer*, *32*(9), 483-487. doi:10.5732/cjc.012.10282
- Liu, X., Kwon, H., Li, Z., & Fu, Y.-x. (2017). Is CD47 an innate immune checkpoint for tumor evasion? *Journal of Hematology & Oncology*, *10*, 12. doi:10.1186/s13045-016-0381-z
- Ljung, B. M., Mayall, B., Lottich, C., Boyer, C., Sylvester, S. S., Leight, G. S., Smith, H. S. (1989). Cell dissociation techniques in human breast cancer- variations in tumor cell viability and DNA ploidy. *Breast Cancer Res Treat*, *13*(2), 153-159.
- Lottaz, C., Beier, D., Meyer, K., Kumar, P., Hermann, A., Schwarz, J., Beier, C. P. (2010). Transcriptional Profiles of CD133 and CD133< Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cell Lines Suggest Different Cells of Origin. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1707 %J Cancer Research
- Majeti, R., Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Pang, W. W., Jaiswal, S., Gibbs, K. D., Weissman, I. L. (2009). CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*, *138*(2), 286-299. doi:10.1016/j.cell.2009.05.045
- Malmstrom, P. U., Sylvester, R. J., Crawford, D. E., Friedrich, M., Krege, S., Rintala, E., Witjes, J. A. (2009). An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*, *56*(2), 247-256. doi:10.1016/j.eururo.2009.04.038
- Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A., & Lee, P. W. (2011). Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle*, *10*(9), 1378-1384. doi:10.4161/cc.10.9.15486
- McCredie, M., Ford, J. M., Taylor, J. S., & Stewart, J. H. (1982). Analgesics and cancer of the renal pelvis in New South Wales Cancer Volume 49, Issue 12. *Cancer*, *49*(12), 2617-2625. [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(19820615\)49:12<2617::AID-CNCR2820491235>3.0.CO;2-X/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(19820615)49:12<2617::AID-CNCR2820491235>3.0.CO;2-X/abstract)
- Michaud, D. S., Kogevinas, M., Cantor, K. P., Villanueva, C. M., Garcia-Closas, M., Rothman, N., Silverman, D. T. (2007). Total Fluid and Water Consumption and the Joint Effect of Exposure to Disinfection By-Products on Risk of Bladder Cancer. *Environmental Health Perspectives*, *115*(11), 1569-1572. doi:10.1289/ehp.10281
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., & Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, *11*(2), 231-238. doi:10.1002/cyto.990110203
- Miyamoto, H., Miller, J. S., Fajardo, D. A., Lee, T. K., Netto, G. J., & Epstein, J. I. (2010). Non-invasive papillary urothelial neoplasms The 2004 WHO/ISUP classification system, Pathology International Volume 60, Issue 1. *Pathology International*, *60*(1), 1-8. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.14401827.2009.02477.x/abstract>

- Monach, P. A., Arnold, L. M., & Merkel, P. A. (2010). Incidence and prevention of bladder toxicity from cyclophosphamide in the treatment of rheumatic diseases A data-driven review, *Arthritis & Rheumatism* Volume 62, Issue 1. *Arthritis & Rheumatism*, 62(1), 9-21. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.25061/abstract>
- Moserle, L., Ghisi, M., Amadori, A., & Indraccolo, S. (2010). Side population and cancer stem cells: therapeutic implications. *Cancer Lett*, 288(1), 1-9. doi:10.1016/j.canlet.2009.05.020
- Mostofi, F. K., Sobin, L. H., Torloni, H., & World Health, O. (1973). Histological typing of urinary bladder tumours / F. K. Mostofi, in collaboration with L. H. Sobin, H. Torloni and pathologists in fourteen countries. In. Geneva: World Health Organization.
- Murta-Nascimento, C., Schmitz-Drager, B. J., Zeegers, M. P., Steineck, G., Kogevinas, M., Real, F. X., & Malats, N. (2007). Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death. *World J Urol*, 25(3), 285-295. doi:10.1007/s00345-007-0168-5
- Nakanishi, T., & Ross, D. D. (2012). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chinese Journal of Cancer*, 31(2), 73-99. doi:10.5732/cjc.011.10320
- Nakano, A., Harada, T., Morikawa, S., & Kato, Y. (1990). Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. *Acta Pathol Jpn*, 40(2), 107-115.
- Nayak, S. K., O'Toole, C., & Price, Z. H. (1977). A cell line from an anaplastic transitional cell carcinoma of human urinary bladder. *Br J Cancer*, 35(2), 142-151.
- Neal, D. E., Sharples, L., Smith, K., Fennelly, J., Hall, R. R., & Harris, A. L. (1990). The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer *Cancer* Volume 65, Issue 7. *Cancer*, 65(7), 1619-1625. [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(19900401\)65:7<1619::AID-CNCR2820650728>3.0.CO;2-Q/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(19900401)65:7<1619::AID-CNCR2820650728>3.0.CO;2-Q/abstract)
- Niess, H., Camaj, P., Renner, A., Ischenko, I., Zhao, Y., Krebs, S., Bruns, C. J. (2015). Side population cells of pancreatic cancer show characteristics of cancer stem cells responsible for resistance and metastasis. *Target Oncol*, 10(2), 215-227. doi:10.1007/s11523-014-0323-z
- Ning, Z. F., Huang, Y. J., Lin, T. X., Zhou, Y. X., Jiang, C., Xu, K. W., Huang, J. (2009). Subpopulations of stem-like cells in side population cells from the human bladder transitional cell cancer cell line T24. *J Int Med Res*, 37(3), 621-630.
- O'Toole, C., Price, Z. H., Ohnuki, Y., & Unsgaard, B. (1978). Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma. *Br J Cancer*, 38(1), 64-76.
- Ohishi, T., Koga, F., & Migita, T. (2016). Bladder Cancer Stem-Like Cells: Their Origin and Therapeutic Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 43. doi:10.3390/ijms17010043
- Olcucuoglu, E., Sirin, M. E., Aydog, G., Gazel, E., Tastemur, S., & Odabas, O. (2017). Relationship between immunohistochemical staining extent of

- CD47 and histopathologic features of bladder tumor. *Central European Journal of Urology*, 70(4), 349-355. doi:10.5173/ceju.2017.1357
- Opdenaker, L. M., Modarai, S. R., & Boman, B. M. (2015). The Proportion of ALDEFLUOR-Positive Cancer Stem Cells Changes with Cell Culture Density Due to the Expression of Different ALDH Isoforms. *Cancer studies and molecular medicine open journal*, 2(2), 87-95. doi:10.17140/CSMMOJ-2-113
- Osta, W. A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Hannun, Y. A., Gillanders, W. E. (2004). EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy. *Cancer research*, 64(16), 5818-5824. doi:10.1158/0008-5472.can-04-0754
- Patriarca, C., Colombo, P., Pio Taronna, A., Wesseling, J., Franchi, G., Guddo, F., Campo, B. (2009). Cell discohesion and multifocality of carcinoma in situ of the bladder: new insight from the adhesion molecule profile (e-cadherin, Ep-CAM, and MUC1). *Int J Surg Pathol*, 17(2), 99-106. doi:10.1177/1066896908326918
- Patriarca, C., Macchi, R. M., Marschner, A. K., & Mellstedt, H. (2012). Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review. *Cancer Treatment Reviews*, 38(1), 68-75. doi:10.1016/j.ctrv.2011.04.002
- Pedersen-Bjergaard, J., Ersboll, J., Hansen, V. L., Sorensen, B. L., Christoffersen, K., Hou-Jensen, K., Hansen, M. M. (1988). Carcinoma of the urinary bladder after treatment with cyclophosphamide for non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 318(16), 1028-1032. doi:10.1056/NEJM198804213181604
- Peek, E. M., Li, D. R., Zhang, H., Kim, H. P., Zhang, B., Garraway, I. P., & Chin, A. I. (2012). Stromal modulation of bladder cancer-initiating cells in a subcutaneous tumor model. *American Journal of Cancer Research*, 2(6), 745-751.
- Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., Rafii, S. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34 cells identifies a population of functional endothelial precursors. *95(3)*, 952-958.
- Pelucchi, C., Negri, E., Franceschi, S., Talamini, R., & La Vecchia, C. (2002). Alcohol drinking and bladder cancer. *J Clin Epidemiol*, 55(7), 637-641.
- Perlis, N., Zlotta, A. R., Beyene, J., Finelli, A., Fleshner, N. E., & Kulkarni, G. S. (2013). Immediate post-transurethral resection of bladder tumor intravesical chemotherapy prevents non-muscle-invasive bladder cancer recurrences: an updated meta-analysis on 2548 patients and quality-of-evidence review. *Eur Urol*, 64(3), 421-430. doi:10.1016/j.eururo.2013.06.009
- Planz, B., Jochims, E., Deix, T., Caspers, H. P., Jakse, G., & Boecking, A. (2005). The role of urinary cytology for detection of bladder cancer. *Eur J Surg Oncol*, 31(3), 304-308. doi:10.1016/j.ejso.2004.12.008
- Raisi, O., Magnani, C., Bigiani, N., Cianciavichia, E., D'Amico, R., Muscatello, U., & Ghirardini, C. (2012). The diagnostic reliability of urinary cytology: a retrospective study. *Diagn Cytopathol*, 40(7), 608-614. doi:10.1002/dc.21716

- Ricardo, S., Vieira, A. F., Gerhard, R., Leitão, D., Pinto, R., Cameselle-Teijeiro, J. F., Paredes, J. (2011). Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *64*(11), 937-946. doi:10.1136/jcp.2011.090456 %J Journal of Clinical Pathology
- Rigby, C. C., & Franks, L. M. (1970). A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure. *Br J Cancer*, *24*(4), 746-754.
- Righi, L., Deaglio, S., Pecchioni, C., Gregorini, A., Horenstein, A. L., Bussolati, G., Malavasi, F. (2003). Role of CD31/Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Expression in in Vitro and in Vivo Growth and Differentiation of Human Breast Cancer Cells. *The American Journal of Pathology*, *162*(4), 1163-1174.
- Rodriguez-Torres, M., & Allan, A. L. (2016). Aldehyde dehydrogenase as a marker and functional mediator of metastasis in solid tumors. *Clinical & Experimental Metastasis*, *33*, 97-113. doi:10.1007/s10585-015-9755-9
- Rycaj, K., & Tang, D. G. (2015). Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations. *Cancer Res*, *75*(19), 4003-4011. doi:10.1158/0008-5472.Can-15-0798
- Said, T. M., Agarwal, A., Zborowski, M., Grunewald, S., Glander, H.-J., & Paasch, U. (2008). Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *Journal of andrology*, *29*(2), 134-142. doi:10.2164/jandrol.107.003632
- Schmid, I., Krall, W. J., Uittenbogaart, C. H., Braun, J., & Giorgi, J. V. (1992). Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*, *13*(2), 204-208. doi:10.1002/cyto.990130216
- Schmitz, B., Radbruch, A., Kümmel, T., Wickenhauser, C., Korb, H., Hansmann, M. L., Fischer, R. (1994). Magnetic activated cell sorting (MACS) -a new immunomagnetic method for megakaryocytic cell isolation: Comparison of different separation techniques. *European Journal of Haematology*, *52*(5), 267-275. doi:10.1111/j.1600-0609.1994.tb00095.x
- Schneider, F., Redmann, K., Wistuba, J., Schlatt, S., Kliesch, S., & Neuhaus, N. (2015). Comparison of enzymatic digestion and mechanical dissociation of human testicular tissues. *Fertil Steril*, *104*(2), 302-311.e303. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.05.001
- Sedaghat, S., Gheytnchi, E., Asgari, M., Roudi, R., Keymoosi, H., & Madjd, Z. (2017). Expression of Cancer Stem Cell Markers OCT4 and CD133 in Transitional Cell Carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *25*(3), 196-202. doi:10.1097/PAI.0000000000000291
- She, J. J., Zhang, P. G., Wang, Z. M., Gan, W. M., & Che, X. M. (2008). Identification of side population cells from bladder cancer cells by DyeCycle Violet staining. *Cancer Biol Ther*, *7*(10), 1663-1668.
- Sick, E., Jeanne, A., Schneider, C., Dedieu, S., Takeda, K., & Martiny, L. (2012). CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. *British Journal of Pharmacology*, *167*(7), 1415-1430. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02099.x

- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *63*(18), 5821-5828.
- Skowron, M. A., Niegisch, G., Fritz, G., Arent, T., van Roermund, J. G. H., Romano, A., Hoffmann, M. J. (2015). Phenotype plasticity rather than repopulation from CD90/CK14+ cancer stem cells leads to cisplatin resistance of urothelial carcinoma cell lines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, *34*, 144. doi:10.1186/s13046-015-0259-x
- Sneath, R. J., & Mangham, D. C. (1998). The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Molecular Pathology*, *51*(4), 191-200.
- Soto-Pantoja, D. R., Kaur, S., & Roberts, D. D. (2015). CD47 signaling pathways controlling cellular differentiation and responses to stress. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *50*(3), 212-230. doi:10.3109/10409238.2015.1014024
- Su, Y., Qiu, Q., Zhang, X., Jiang, Z., Leng, Q., Liu, Z., Jiang, F. (2010). Aldehyde Dehydrogenase 1 A1-Positive Cell Population Is Enriched in Tumor-Initiating Cells and Associated with Progression of Bladder Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *19*(2), 327-337.
- Suetsugu, A., Nagaki, M., Aoki, H., Motohashi, T., Kunisada, T., & Moriwaki, H. (2006). Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *351*(4), 820-824. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.128
- Sukach, A. N., & Ivanov, E. N. (2007). Formation of spherical colonies as a property of stem cells. *Cell and Tissue Biology*, *1*(6), 476-481. doi:10.1134/s1990519x07060028
- Sylvester, R. J., van der, M. A., & Lamm, D. L. (2002). Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*, *168*(5), 1964-1970. doi:10.1097/01.ju.0000034450.80198.1c
- Sylvester, R. J., van der Meijden, A. P., Oosterlinck, W., Witjes, J. A., Bouffoux, C., Denis, L., Kurth, K. (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. *Eur Urol*, *49*(3), 466-465; discussion 475-467. doi:10.1016/j.eururo.2005.12.031
- Toh, T. B., Lim, J. J., & Chow, E. K.-H. (2017). Epigenetics in cancer stem cells. *Molecular Cancer*, *16*, 29. doi:10.1186/s12943-017-0596-9
- Toledano, N., Gur-Wahnon, D., Ben-Yehuda, A., & Rachmilewitz, J. (2013). Novel CD47: SIRPα Dependent Mechanism for the Activation of STAT3 in Antigen-Presenting Cell. *PLOS ONE*, *8*(9), e75595. doi:10.1371/journal.pone.0075595
- Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T., & Hara, A. (2016). Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*, *7*(10), 11018-11032. doi:10.18632/oncotarget.6920
- Tomlinson, M. J., Tomlinson, S., Yang, X. B., & Kirkham, J. (2012). Cell separation: Terminology and practical considerations. *Journal of tissue*

- engineering*, 4, 2041731412472690-2041731412472690. doi:10.1177/2041731412472690
- Tsunoda, S., Okumura, T., Ito, T., Kondo, K., Ortiz, C., Tanaka, E., Shimada, Y. (2006). ABCG2 expression is an independent unfavorable prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology*, 71(3-4), 251-258. doi:10.1159/000106787
- Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V., Weissman, I. L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *97(26)*, 14720-14725. doi:10.1073/pnas.97.26.14720 %J Proceedings of the National Academy of Sciences
- van der Meijden, A. P., Sylvester, R. J., Oosterlinck, W., Hoeltl, W., & Bono, A. V. (2003). Maintenance Bacillus Calmette-Guerin for Ta T1 bladder tumors is not associated with increased toxicity: results from a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase III Trial. *Eur Urol*, 44(4), 429-434. doi:10.1016/s0302-2838(03)00357-9
- Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2012). Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*, 10(6), 717-728. doi:10.1016/j.stem.2012.05.007
- Vlaming, M. L. H., Lagas, J. S., & Schinkel, A. H. (2009). Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): Recent findings in Abcg2 knockout mice. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(1), 14-25. doi:https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.007
- Volkmer, J.-P., Sahoo, D., Chin, R. K., Ho, P. L., Tang, C., Kurtova, A. V., Chan, K. S. (2012). Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6), 2078-2083. doi:10.1073/pnas.1120605109
- Wasfy, R. E., & El-Guindy, D. M. (2017). CD133 and CD44 as cancer stem cell markers in bladder carcinoma: an immunohistochemical study. *Egyptian Journal of Pathology*, 37(1), 204-208. doi:10.1097/01.xej.0000520912.41715.09
- Went, P. T. H., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G., & Dirnhofer, S. (2004). Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Human Pathology*, 35(1), 122-128. doi:https://doi.org/10.1016/j.humpath.2003.08.026
- Willingham, S. B., Volkmer, J.-P., Gentles, A. J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S. S., Weissman, I. L. (2012). The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17), 6662-6667. doi:10.1073/pnas.1121623109
- Wu, C. T., Lin, W. Y., Chen, W. C., & Chen, M. F. (2018). Predictive Value of CD44 in Muscle-Invasive Bladder Cancer and Its Relationship with IL-6 Signaling. *Ann Surg Oncol*, 25(12), 3518-3526. doi:10.1245/s10434-018-6706-0
- Wu, W., Tong, Y., Zhao, Q., Yu, G., Wei, X., & Lu, Q. (2015). Coffee consumption and bladder cancer: a meta-analysis of observational studies. *Scientific Reports*, 5, 9051. doi:10.1038/srep09051

- Xu, N., Shao, M.-M., Zhang, H.-T., Jin, M.-S., Dong, Y., Ou, R.-J., Shi, A.-P. (2015). Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is associated with a poor prognosis of bladder cancer. *Cancer Epidemiology*, 39(3), 375-381. doi:<https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.03.003>
- Yang, Y. M., & Chang, J. W. (2008). Bladder cancer initiating cells (BCICs) are among EMA-CD44v6+ subset: novel methods for isolating undetermined cancer stem (initiating) cells. *Cancer Invest*, 26(7), 725-733. doi:10.1080/07357900801941845
- Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Buck, D. W. (1997). AC133, a Novel Marker for Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *90*(12), 5002-5012.
- You, L., Guo, X., & Huang, Y. (2018). Correlation of Cancer Stem-Cell Markers OCT4, SOX2, and NANOG with Clinicopathological Features and Prognosis in Operative Patients with Rectal Cancer. *Yonsei medical journal*, 59(1), 35-42. doi:10.3349/ymj.2018.59.1.35
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2012). Cancer stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(12), 2144-2151. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.022>
- Zhang, H. Z., Wang, C. F., Sun, J. J., & Yu, B. H. (2012). A combined clinicopathologic analysis of 658 urothelial carcinoma cases of urinary bladder. *Chin Med Sci J*, 27(1), 24-28.
- Zhao, H., Wang, J., Kong, X., Li, E., Liu, Y., Du, X., Wang, Q. (2016). CD47 Promotes Tumor Invasion and Metastasis in Non-small Cell Lung Cancer. *Scientific Reports*, 6, 29719. doi:10.1038/srep29719  
<https://www.nature.com/articles/srep29719#supplementary-information>
- Zhou, J., & Zhang, Y. (2008). Cancer stem cells: Models, mechanisms and implications for improved treatment. *Cell Cycle*, 7(10), 1360-1370. doi:10.4161/cc.7.10.5953
- Zhou, L., Sheng, D., Wang, D., Ma, W., Deng, Q., Deng, L., & Liu, S. (2018). Identification of cancer-type specific expression patterns for active aldehyde dehydrogenase (ALDH) isoforms in ALDEFLUOR assay. *Cell Biology and Toxicology*. doi:10.1007/s10565-018-9444-y
- Zhu, F., Qian, W., Zhang, H., Liang, Y., Wu, M., Zhang, Y., Li, Y. (2017). SOX2 Is a Marker for Stem-like Tumor Cells in Bladder Cancer. *Stem Cell Reports*, 9(2), 429-437. doi:10.1016/j.stemcr.2017.07.004

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms.....	3
Tabelle 2: Stadiengruppierung des Harnblasenkarzinoms. ....	4
Tabelle 3: Grading.....	4
Tabelle 4: R-Status nach Behandlung.....	4
Tabelle 5: Die verwendeten Laborgeräte im urologischen Forschungslabor....	23
Tabelle 6: Die verwendeten Laborgeräte im Forschungslabor der Kinderklinik	24
Tabelle 7: Die verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	25
Tabelle 8: Die verwendeten Medien, Puffer und Lösungen.....	26
Tabelle 9: Die verwendeten Kits.....	29
Tabelle 10: Die verwendeten Microbeads .....	29
Tabelle 11: Auflistung und Beschreibung der verwendeten Antikörper .....	29
Tabelle 12: Die angewendeten Softwares.....	30
Tabelle 13: Charakteristika der Gewebeproben.....	33
Tabelle 14: Emissions- und Absorptionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe .....	42
Tabelle 15: Einteilung des Signifikanzniveaus.....	47
Tabelle 16: Probengewicht, Zellzahl und Vitalität der Versuchsreihen.....	49
Tabelle 17: Anteil an CD47 <sup>high</sup> und CD326 <sup>high</sup> Zellen im Ausgangsmaterial .....	62

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Depletion .....	38
Abbildung 2: Prinzip der Positivselektion.....	39
Abbildung 3: Hydrodynamische Fokussierung .....	42
Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Vitalitätsbestimmung mit dem Zellfarbstoff 7-AAD .....	51
Abbildung 5: Vergleich der CD31 bzw. CD45 negativen Zellpopulation vor Depletion und nach Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen .....	53
Abbildung 6: Graphische Darstellung und Vergleich der einzelnen Werte der CD31 negativen Zellpopulationen und des Mittelwertes vor und nach Depletion der CD31/CD45 positiven Zellen.....	54
Abbildung 7: Graphische Darstellung und Vergleich des Mittelwertes und der einzelnen Werte der CD45 negativen Zellpopulationen vor und nach Depletion der CD31 und CD45 positiven Zellen.....	55
Abbildung 8: Isotypenkontrolle CD44.....	58
Abbildung 9: FMO-Kontrolle.....	58
Abbildung 10: FACS- Ergebnis nach Anreicherung der CD44 positiven Zellen durch Beads .....	59
Abbildung 11: Anteil der CD44 positiven Zellen im Ausgangsmaterial und in der Zellsuspension, die durch CD44 Microbeads für CD44 angereichert werden sollte.....	59
Abbildung 12: Anteil an CD44 positiven Zellen in der durch Microbeads angereicherten Population und der depletierten Population.....	60
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der FACS-Ergebnisse der FMO- Kontrolle für den Oberflächenmarker CD47 .....	61
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der FACS-Ergebnisse für den Oberflächenmarker CD326.....	62
Abbildung 15: ALDH-Assay der Versuche 7-11.....	64
Abbildung 16: Darstellung der Expression von CD44 und der Aldehyddehydrogenase-Aktivität.....	67
Abbildung 17: Darstellung der Expression von CD47 und der Aldehyddehydrogenase-Aktivität.....	67
Abbildung 18: Darstellung der Expression von CD133 und der Aldehyddehydrogenase-Aktivität.....	68
Abbildung 19: Darstellung der Expression von CD326 und der Aldehyddehydrogenase-Aktivität.....	68
Abbildung 20: Darstellung der Expression von CD338 und der Aldehyddehydrogenase-Aktivität.....	69
Abbildung 21: ALDH-Assay der Zelllinie RT4.....	70
Abbildung 22: ALDH-Assay der Zelllinie J82.....	70
Abbildung 23: ALDH-Assay der Zelllinie T24.....	71
Abbildung 24: ALDH-Assay der Zelllinie TCCSUP .....	71

Abbildung 25: ALDH-Assay der Zelllinie R11.....	72
Abbildung 26: ALDH-Assay der Zelllinie R28.....	72
Abbildung 27: ALDH-Assay der Zelllinie A1207..	73
Abbildung 28: ALDH-Assay der Zelllinie MB3W1.....	73

## 9. Abkürzungen

### **7**

7AAD *7-Aminoactinomycin*

### **A**

ABC *ATP-binding cassette*

### **B**

BCG *Bacillus-Calmette-Guérin*

BCRP *Breast Cancer Resistance Protein*

### **C**

CD *Cluster of Differentiation*

CEA *Carcinoembryonales Antigen*

CIS *Carcinoma in situ*

CT *Computertomographie*

### **D**

DEAB *Diethylaminobenzaldehyd*

### **E**

EGFR *Epidermal growth factor receptor*

EMA *Epithelial membrane Antigene*

EORTC *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*

EpCAM *Epithelial cell adhesion molecule, CD326*

### **F**

FACS *Fluorescence-activated cell sorting*

FDA *Food and Drug Administration*

FISH *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung*

FMO *Fluorescence-Minus-One*

FSC *Forward Scatter*

### **I**

IARC *Internationale Agentur für Krebsforschung*

ISUP *International Society of Urological Pathology*

### **M**

MACS *Magnetic Activated Cell Sorting*

MRT *Magnetresonanztomographie*

### **N**

NMIBC *Nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom*

**P**

PBS *Phosphate Buffered Saline*

PDD *Photodynamische Diagnostik*

**R**

Rag 2 *Recombinase activating gene 2, recombinase activating gene 2*

**S**

SCC *Side Scatter*

SCID *Severe combined Immunodeficiency*

SIRP $\alpha$  *signal-regulatory protein alpha*

**T**

TUR *Transurethrale Blasentumorresektion*

**W**

WHO *World Health Organisation*

## Danksagung

Die Entität des Harnblasenkarzinoms ist nicht bei Kindern und Jugendlichen zu finden, weshalb die Promotion zu diesem Thema an der Universitätskinderklinik einer kurzen Erklärung bedarf. Das Projekt wurde ursprünglich entworfen als Kooperation mit Herrn Prof. Dr. M. Burger (Klinik für Urologie) und Herrn Prof. Dr. M. Wölfl (Tumorimmunologie, Universitätskinderklinik), mit dem Ziel die Immunogenität des Harnblasenkarzinoms, bzw. dessen Subpopulationen, besser zu verstehen. Mit dem Ruf und Weggang von Herrn Prof. Dr. M. Burger an das Caritas-Krankenhaus St. Josef/Universitätsklinikum Regensburg, wurde die Arbeit überwiegend im Bereich der Kinderklinik weitergeführt.

Mein besonderer Dank gilt daher Herrn Prof. Dr. med. M. Wölfl für die engagierte Unterstützung bei allen fachlichen und praktischen Fragen und insbesondere auch für die Übernahme der Betreuung, nachdem Herr Prof. Dr. med. M. Burger als Chefarzt nach Regensburg wechselte. Ich danke Dr. med. C. Kalogirou, der von Anfang an ein hilfreicher Ansprechpartner auf Seiten der Urologie war. Zudem möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H. Kübler danken, dass er bereit ist als Korreferent den urologischen Fachbereich zu vertreten. Nicht zuletzt möchte ich auch dem gesamten Team des urologischen und pädiatrischen Forschungslabors danken.

