

**Untersuchungen zu Zytokin-vermittelten Interaktionen von Tumorzellen
und Tumor-assoziierten Fibroblasten im Blasenkarzinom**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Susanne Grimm

geboren am 02. November 1984 in Weimar

Gutachter/in:

- 1. Herr Prof. Dr. Karl-Heinz Friedrich, Jena**
- 2. Herr Prof. Dr. Oliver Krämer, Mainz**
- 3. Frau Prof. Dr. Kerstin Junker, Homburg/Saar**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.01.2015

Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.

Marie Curie (1867 – 1934)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Tumorstroma und Tumorprogression	3
1.2 Tumor-assoziierte Fibroblasten	4
1.3 Interaktionen zwischen Tumorzellen und Fibroblasten.....	7
1.4 Matrix Metalloproteasen im Tumorgeschehen	10
1.5 Epitheliale Mesenchymale Transition von Tumorzellen.....	12
1.6 Blasenkarzinom	13
2 Ziele der Arbeit	17
3 Material und Methoden.....	19
3.1 Material.....	19
3.1.1 Zellenlinien	19
3.1.2 Primäre Zellen aus Patientenmaterial	19
3.1.3 Puffer.....	20
3.1.4 Chemikalien	22
3.1.5 Verbrauchsmaterial	23
3.1.6 Enzyme	24
3.1.7 Zytokine	24
3.1.8 Kits.....	24
3.1.9 Primer.....	25
3.1.10 Antikörper	26
3.1.11 Geräte	26
3.1.12 Software	27
3.2 Methoden	27
3.2.1 Zellbiologische Methoden	27
3.2.1.1 Zellkultur.....	27
3.2.1.2 Kryokonservieren von Zellen.....	27
3.2.1.3 Auftauen kryokonservierter Zellen	28
3.2.1.4 Passage von Zellen	28

3.2.1.5	Zellzahlbestimmung	29
3.2.1.6	Herstellung von konditionierten Medium (<i>conditioned medium</i> – CM).....	29
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	29
3.2.2.1	RNA Isolierung	29
3.2.2.2	Konzentrationsbestimmung der mRNA	30
3.2.2.3	Synthese der cDNA mittels Reverser Transkription.....	30
3.2.2.4	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> –PCR).....	31
3.2.2.5	Agarose-Gel-Elektrophorese zur Analyse der PCR-Produkte	32
3.2.2.6	Quantitative PCR (q-PCR) zu Expressionsanalysen der Membran-Typ-1 MMP (<i>membrane type-1 matrix metalloproteinase</i> – MT1-MMP).....	33
3.2.3	Immunologische Methoden	34
3.2.3.1	Zytokin-Messung mittels Enzym-gekoppelter Immunsandwich Technik (<i>enzyme-liked immunosorbent assay</i> – ELISA)	34
3.2.3.2	Zytokin-Array	35
3.2.3.3	Intrazelluläre IL-8 Färbung und Analyse mittels Durchflusszytometrie	36
3.2.4	Fixieren von Zellen auf Objektträgern für die Immunhistochemie	37
3.2.5	Immunhistochemie der RT112-Zellen	37
3.2.6	Proteinbiochemische Methoden.....	38
3.2.6.1	Bestimmung der Matrix-Metalloproteasen (<i>matrix metalloproteinases</i> – MMPs)-2 und -9 mittels Zymographie	38
3.2.6.2	Proteinisolierung und Konzentrationsmessung nach Bradford.....	39
3.2.6.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine	40
3.2.6.4	Western-Blot und Immundetektion.....	41
3.2.7	Migration- und Invasionsstudien unter Verwendung der „Boyden-Kammer“	42
3.2.8	Migrationsanalysen mittels Wundheilungs-Assay.....	43
3.2.9	Proliferationsassay (D10G4.1-Zellen)	44
3.2.10	Mycoplasmendetektion	44
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Analyse von sekretierten Faktoren in der Ko-Kultur von Blasentumorzelllinien und Fibroblasten	46
4.1.1	IL-8-Expression in der Ko-Kultur	47
4.1.2	Analyse der IL-8-Expression in den einzelnen Zelltypen der Ko-Kultur....	49

4.1.3	Expression von Matrix-Metalloprotease (<i>matrix metalloproteinase</i> – MMP)-2 und -9 in der Ko-Kultur von Tumorzellen und Fibroblasten.....	50
4.2	Charakterisierung aktivierender Faktoren bei der Kommunikation zwischen Tumorzellen und Fibroblasten	51
4.2.1	Einfluss von Faktoren aus Tumorzellen auf die IL-8-Sekretion durch Fibroblasten.....	52
4.2.2	Effekt von Tumorzell-Faktoren auf die Fibroblasten-spezifische MMP-Expression	53
4.2.3	Identifizierung weiterer Fibroblasten-sekretierter Faktoren unter Tumorzell-Einfluss	56
4.3	Untersuchungen der Fibroblasten-Aktivierung durch Tumorzell-sekretierte Faktoren	59
4.3.1	Expressions-Quantifizierung Tumorzell-spezifischer Zytokine	59
4.3.1.1	Bestimmung der Expression von TGF- β in Tumorzellen.....	59
4.3.1.2	Bestimmung der Expression von IL-1 in Tumorzellen.....	60
4.3.2	Funktionelle Effekte von Tumorzell-sezernierten Faktoren auf Fibroblasten	64
4.3.2.1	IL-8 Sekretion durch Fibroblasten nach IL-1 α und TGF- β Stimulation.	65
4.3.2.2	Induktion der Sekretion von MMPs in Fibroblasten durch IL-1 α und TGF- β	65
4.4	Wirkung von Fibroblasten auf Malignitätsparameter von Blasenkarzinom-Zellen	67
4.4.1	Untersuchung des Migrationsverhaltens der Tumorzellen unter Einfluss der Fibroblasten.....	67
4.4.2	Untersuchung des Migrationsverhaltens der Tumorzellen stimuliert durch Fibroblasten-konditioniertes Medium.....	69
4.4.3	Einfluss definierter Zytokine auf das Migrationsverhalten von Blasenkarzinomzellen	70
4.4.4	Untersuchungen zum Invasionsverhalten von Blasenkarzinomzellen in Gegenwart von Fibroblasten	73
4.4.5	Einfluss Fibroblasten-sekretierter Faktoren auf Parameter der Epithelial-Mesenchymale Transition in Blasenkarzinomzellen	74
5	Diskussion	77
6	Schlussfolgerungen	92
7	Literatur- und Quellenverzeichnis	94

8 Anhang	107
8.1 Abbildungsverzeichnis	107
8.2 Tabellenverzeichnis	110
8.3 Zusätzliche Daten und Ergebnisse.....	112
8.4 Lebenslauf.....	114
8.5 Referenzen	116
8.6 Förderung.....	118
8.7 Danksagung	119
8.8 Ehrenwörtliche Erklärung.....	120

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	(Strept-)Avidin-Biotin Komplex-Methode
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BM	Basalmembran
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	komplementäre DNA
CM	Konditioniertes Medium
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EMMPRIN	extrazellulärer Matrix Metalloproteinase Induktor
EMT	Epithelial-Mesenchamale Transition
EndMT	Endtheliale Mesenchymale Transition
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAP	Fibroblasten aktivierende Protein
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
FKS	Fötale Kälberserum
FMT	Fibroblasten Myofibroblasten Transdifferenzierung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFF	Humane Vorhaut-Fibroblasten
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
MCP-1	Monozyten-chemotytisches Protein-1
MMP	Matrix Metalloproteasen
NF-κB	Nuklear Faktor-kappaB
PBS	Phoshat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rt-PCR	real-time PCR
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDF-1	Stroma-Zellen stammender Faktor-1
TAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCC	Blasenkarzinom des Urothels
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor-beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor
α -SMA	alpha-glattes Muskelaktin

Einheiten:

sec	Sekunde
min	Minute
h	Stunde
pg	Pikogramm
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
g	Gramm
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
M	Mol pro Liter
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
%	Prozent (1:100)
lxlg	Zentrifugalkraft
bp	Basenpaare
U	Unit (μ mol/min)
Da	Dalton
A	Ampere
V	Volt

Zusammenfassung

Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF) nehmen eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und Progression ein. Durch den engen Kontakt von Tumorzellen mit Fibroblasten kommt es zu einem Austausch verschiedener Faktoren, welche die Proliferation und Migrationsfähigkeit von Zellen verändern können. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Interaktionen von Tumorzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten im Blasenkarzinom unter Verwendung biochemischer und funktioneller Untersuchungsmethoden umfassend zu charakterisieren. Um den denkbaren Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad von Tumorzellen und deren Abhängigkeit von Interaktionen mit Fibroblasten zu untersuchen, wurden die de-differenzierte „*high-grade*“ Cal29 Zelllinie und die gut differenzierte „*low-grade*“ RT112 Zelllinie als Modellsystem verwendet. Aus Patientenmaterial gewonnene Blasen-tumor-assoziierte Fibroblasten, die einen aktivierten Fibroblastentyp charakterisieren und humane Vorhaut-Fibroblasten (*human foreskin fibroblasts* – HFF), welche einen nicht-aktivierten Fibroblastentyp darstellen, standen für diese Studien zur Verfügung.

Da die Faktoren Interleukin-8 (*interleukin-8* – IL-8) und Matrix-Metalloproteinase-2 (*matrix metalloproteinase-2* – MMP-2) im Blasenkarzinom eine Rolle spielen, wurde untersucht, in wie weit diese Faktoren durch Ko-Kultur von Tumorzellen und Fibroblasten in ihrer Sekretion reguliert werden. Dabei wurde festgestellt, dass bei den Ko-Kulturen beider Tumorzelllinien mit TAF die IL-8-Konzentrationen anstiegen. Zudem zeigten die Ko-Kulturen der de-differenzierten Cal29-Zelllinie wesentlich höhere Induktionen der IL-8-Konzentrationen als die RT112-Zellen. Des Weiteren wiesen die Ko-Kultur der Cal29-Zellen und der HFF eine gesteigerte IL-8-Sekretion auf, während die RT112-Zellen nur mit den TAF reagierten. Auch Pro-MMP-2-Abgaben wurden in den entsprechenden Ko-Kulturen induziert. Hier konnte jedoch keine TAF Spezifität beobachtet werden.

Unter Verwendung von konditioniertem Medium (*conditioned medium* – CM) von Tumorzellen bzw. Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten durch Tumorzell-Faktoren zur Sekretion von IL-8 stimuliert werden. Ähnliche Untersuchungen ließen erkennen, dass auch Pro-MMP-2-Sekretion von Fibroblasten durch diese Faktoren

induziert wurden. Interessanterweise konnte in diesem Fall die proteolytische Aktivierung von Pro-MMP-2 durch die gut differenzierten RT112-Zellen stärker induziert werden.

Zudem bestand großes Interesse daran Faktoren, welche von Blasenkarzinomzellen abgegeben wurden, näher zu charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass beide untersuchten Tumorzelllinien TGF- β und IL-1 α sekretierten, wobei die von der „*high-grade*“ Cal29-Zellen produzierten Konzentrationen wesentlich höher waren. Die Verwendung von rekombinanten Proteinen ergab, dass TGF- β die Bildung von Pro-MMP-2 und IL-1 α die Sekretion von IL-8 und Pro-MMP-2 durch Fibroblasten induzierte.

Um zu klären, welchen Einfluss Fibroblasten auf Malignitätsparameter von Blasenkarzinomzellen ausüben, wurden Migrations- und Invasionsexperimente durchgeführt. In den Ko-Kulturen verstärkten die TAF die Migration und Invasion der Tumorzellen. Auch hier war dieser Effekt generell höher bei den Cal29-Zellen und stärker bei der Verwendung von TAF statt HFF.

Um ein umfassenderes Bild der Faktorsekretion zu erhalten, wurden Zytokin-Arrays durchgeführt. Dabei deutete die Analyse von (Cal29-)aktiviertem TAF-Medium auf eine Beteiligung der Faktoren Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor* – GM-CSF) und Makrophagen chemotaktisches Protein-1 (*monocyte chemotactic protein-1* – MCP-1) hin. Tatsächlich erwies sich, dass rekombinantes MCP-1 eine migrationsfördernde Wirkung auf die Tumorzellen ausübt.

Da eine gesteigerte Migration und Invasion auch Merkmale der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) sind, wurden EMT-Parameter mittels Immunhistochemie untersucht. RT112-Zellen wurden mit TAFCM und rekombinanten MCP-1 kultiviert. Dabei zeigte sich lediglich durch das TAF-Medium eine verstärkte Vimentin-Expression in den Zellen. Die verstärkte Migration (Invasion) und Vimentin-Expression deuten auf eine Beteiligung der TAF bei der EMT von Blasentumorzellen hin.

1 Einleitung

1.1 Tumorstroma und Tumorprogression

Die Mikroumgebung eines Tumors nimmt eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und Progression ein. So hat sich die Forschungsarbeit in den letzten Jahren immer mehr auf die Zellen, welche mit Tumorzellen assoziiert sind, ausgeweitet. Zu den Zellen der Mikroumgebung gehören unter anderem Endothelzellen, inflammatorische Zellen und Fibroblasten (Abbildung 1.1). Letztere sind der dominierende Zelltyp im sogenannten Tumorstroma. Fibroblasten im Stroma sind meist aktivierte Fibroblasten und werden als Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF) oder Myofibroblasten bezeichnet.

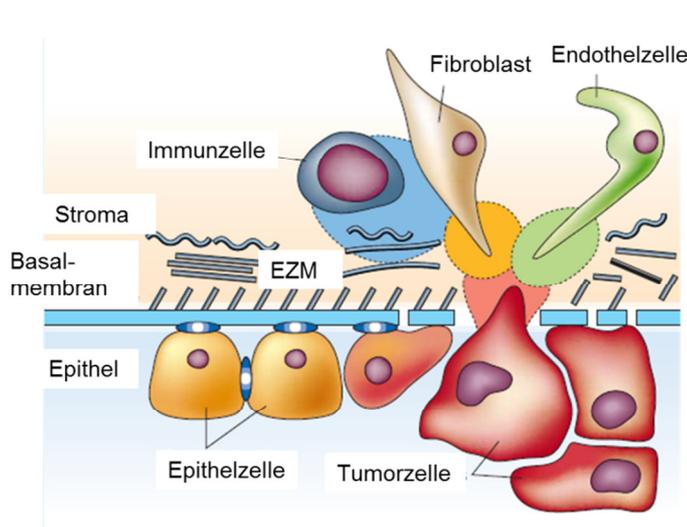


Abbildung 1.1: Tumorzellen und Tumorstroma.

Invasive Tumore bestehen aus einer Vielzahl von Zelltypen. Invasion der Tumorzellen findet in einer kleinen Zone statt, wo es zum „cross-talk“ und Interaktionen zwischen Zellen des Stroma und prä-malignen Epithel kommt (Linie ist durch Lücken gekennzeichnet). Verändert nach Übersichtsartikel Liotta und Kohn (2001)

Im gesunden Gewebe tragen die Zellen des Stroma unter anderem zur Wundheilung und zur Immunantwort bei, welche einer Tumorentstehung oder Tumorprogression entgegen wirkt. Im Gegensatz dazu ist die Entwicklung von invasiven Tumoren begleitet von der Aktivierung des lokalen Stroma (Übersichtsartikel Liotta und Kohn 2001). Diese äußert sich beispielsweise durch die Aktivierung von Fibroblasten, welche Matrix-Metalloproteasen (*matrix metalloproteinases* – MMPs) produzieren, oder durch aktivierte Makrophagen, welche pro-angiogene Faktoren, wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) ausschütten (Eck et al. 2009, Green et al. 2009). Die aktivierten Zellen des Tumorstroma können dann wiederum

auf die Tumorzellen wirken, indem sie Interleukine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren abgeben. Unter Mitwirkung jener Faktoren kommt es zu einer Förderung der Proliferation von Tumorzellen, zur Angiogenese und zur Metastasierung. Im Einklang damit ist das Vorhandensein eines „reaktiven“ Stroma mit einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert (Übersichtsartikel Zhang und Liu 2013). Ein besseres Verständnis dieses zellulären Netzwerkes kann zu Diagnostik, Prognostik und Therapie von Tumoren beitragen. So könnten Angiogenese hemmende Faktoren die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff vermindern. Auch die Inhibierung von MMPs wäre eine Möglichkeit, die Invasion von Tumorzellen zu vermindern. Tumor- oder Stroma-assoziierte Zytokine könnten zudem für die Diagnostik ein geeigneter Parameter sein, da sie als sekretierte Faktoren unter anderem im Blut von Patienten nachgewiesen werden können.

1.2 Tumor-assoziierte Fibroblasten

Die Tumor-assoziierten Fibroblasten (TAF) nehmen den größten Teil des Tumorstromas invasiver Tumore ein (Übersichtsartikel Allan und Jones 2011). Sie unterscheiden sich morphologisch von den anderen Zellen im Tumor durch ihre markante spindelförmige Gestalt und den länglichen Zellkern. TAF sind mesenchymale Zellen, doch ihre Herkunft ist noch nicht eindeutig geklärt. Laut Zhang und Liu werden bislang acht verschiedene Ursprünge der TAF diskutiert. Sie können hauptsächlich aus nicht-aktiven Fibroblasten (Fibroblasten-Myofibroblasten Transdifferenzierung – FMT), aber auch aus epithelialen Zellen (Epithelial-Mesenchymale Transition – EMT), endothelialen Zellen (Endothelial-Mesenchymale Transition – EndMT), mesenchymalen Stammzellen, Perizyten, glatten Muskelzellen, Adipozyten und inflammatorischen Zellen entstehen (Übersichtsartikel Zhang und Liu 2013) (Abbildung 1.2).

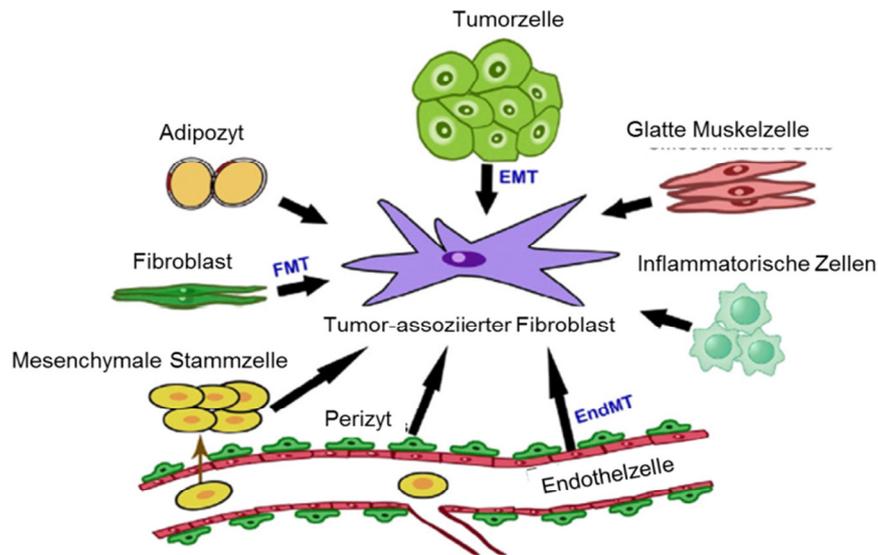


Abbildung 1.2: Hypothesen zur Herkunft von TAF.

Sie können aus nicht-aktiven Fibroblasten (FMT), Tumorzellen (EMT), Endothelzellen (EndMT), Adipozyten, Perizyten, Mesenchymalen Stammzellen, Inflammatorischen Zellen, sowie glatten Muskelzellen entstehen. Verändert nach Übersichtsartikel Zhang und Liu 2013

So unterschiedlich der Herkunftsort diskutiert wird, so unterschiedlich können sich auch die TAF in den verschiedenen Tumoren verhalten. Es konnte bislang noch kein universelles Markerprotein für TAF gefunden werden. In vielen Arbeiten wird α -glattes Muskelaktin (*α -smooth muscle actin* – α SMA) als Marker verwendet, aber auch das Fibroblasten aktivierende Protein (*fibroblast activating protein* – FAP) und Vimentin zählen zu den häufig verwendeten Markerproteinen. Nicht nur die proteomische Unterscheidung der Fibroblasten zu anderen Zellen, sondern auch deren Funktion im Tumor ist Gegenstand intensiver Forschung. Es ist bekannt, dass aktivierte Fibroblasten, welche im gesunden Organismus an der Wundheilung beteiligt sind, später apoptotisch werden oder auch in Seneszenz gehen (Übersichtsartikel Leef und Thomas 2013). Aktivierte Fibroblasten im Tumor sind dagegen stetig aktiv und fördern die Angiogenese, Migration und Invasion verschiedener Zellen. Sie interagieren wahrscheinlich mit jedem Zelltyp im Tumor. Der Kontakt mit den anderen Zellen kann direkt über heterogene Zell-Zell Kontakte oder über lösliche Moleküle, wie inflammatorische Mediatoren, Zytokine oder Chemokine geschehen (Jung et al. 2010) (Abbildung 1.3).

(*extracellular-signal regulated kinases* – ERK) Phosphorylierung aufwiesen, gegen Tamoxifen-Behandlung verstärkt resistent waren (Busch et al. 2012).

1.3 Interaktionen zwischen Tumorzellen und Fibroblasten

Wie schon erwähnt, können Tumorzellen Fibroblasten aktivieren und andererseits Fibroblasten einen migrations-, invasions- und wachstumsfördernden Einfluss auf Tumorzellen ausüben. Es konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass aktivierte Fibroblasten (wie TAF), verglichen mit nicht-aktivierten (normalen) Fibroblasten, ein anderes Expressionsmuster in Tumorzellen hervorrufen konnten (Gao et al. 2010, Angelucci et al. 2012). Einige Faktoren, welche bei den Interaktionen der Tumorzellen und Fibroblasten eine Rolle spielen, sind in allen Tumorentitäten gleich, aber andere scheinen spezifisch auf einen Tumortyp zu wirken (Übersichtsartikel Leef und Thomas 2013). Von Depner und Kollegen konnte gezeigt werden, dass IL-6 von entarteten Keratinozyten abgegeben wird und stromale Fibroblasten aktiviert (Depner et al. 2012). Untersuchungen am Pankreaskarzinom ergaben hingegen, dass IL-6 von den TAF abgegeben wird, nachdem diese mit Tumorzellen kultiviert wurden (Tjomsland et al. 2011). Somit ist es wichtig, die Interaktionen der Zellen von beiden Seiten und in den verschiedenen Tumoren zu betrachten.

Es ist bis heute noch nicht genau geklärt, welche Faktoren für die Entstehung von TAF verantwortlich sind (Übersichtsartikel Paraiso und Smalley 2013). Von den meisten Autoren wird angenommen, dass der Großteil von TAF aus Trans-differenzierung ortsansässiger Fibroblasten entsteht, wobei der transformierende Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor- β* – TGF- β) als Induktor wirkt (Hawinkels et al. 2014). TGF- β ist ein stark pleiotropes Molekül, welches in unterschiedlichen Situationen fördernd oder hemmend auf den gleichen Prozess wirken kann (Übersichtsartikel Jenkins 2008). Es reguliert eine Vielzahl von Prozessen wie Wachstum, Apoptose, Differenzierung, Migration, Proteinsynthese und EMT (Übersichtsartikel Jenkins 2008). Letztere, ebenso wie die Genexpression von α SMA, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (*plasminogen activator inhibitor-1* – PAI-1), MMP-2 und MMP-9 können in TGF- β stimulierten TAF erhöht sein (Hawinkels et al. 2014).

Auch pro-inflammatorische Proteine wie IL-1 α und IL-1 β , welche von Tumorzellen abgegeben werden, regulieren die Genexpression in TAF (Tjomsland et al. 2011, Dudas et al. 2011, Schauer et al. 2013). Dabei ist je nach Tumorentität die Expression der IL-1-Proteine unterschiedlich. Im Mammakarzinom konnte die IL-1 α - und IL-1 β -Expression nachgewiesen werden, während für das Pankreaskarziom nur die Expression von IL-1 α gezeigt wurde (Tjomsland et al. 2011). IL-1 bindet an den IL-1-Rezeptor 1 (IL-1R1), welcher auch auf der Oberfläche von TAF nachweisbar ist (Tjomsland et al. 2011, Übersichtsartikel Schauer et al. 2011). Dies führt oft über eine Aktivierung des nuklearen Faktor- κ B (*nuclear factor- κ B* – NF- κ B) zu der gesteigerten Genexpression von Interleukinen wie Interleukin-6 (*interlukin-6* – IL-6) und IL-8, Chemokinen, wie CCL2 und CCL7, sowie Wachstumsfaktoren wie VEGF (Jung et al. 2010, Tjomsland et al. 2011, Schauer et al. 2013). Es wurde auch beschrieben, dass IL-1 in Fibroblasten die Expression von Matrix Metalloproteasen über c-Jun aktivieren kann (Chambers et al. 2013).

Die Tumorprogression wird durch Fibroblasten gefördert, indem ihre sekretierten Faktoren auch direkt auf Tumorzellen wirken und deren Proteinexpression verändern können. Dies kann sogar so weit gehen, dass epitheliale Tumorzellen ihren Ursprungsphänotyp verändern und durch EMT zu mesenchymalen Zellen werden. Fibroblasten können durch die Sekretion des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (*hepatocyte growth factor* – HGF) das Wachstum und die Migration von Tumorzellen fördern (Wang et al. 2007). Die Ko-Kultur von Fibroblasten und Tumorzellen kann die Expression von Vimentin in Tumorzellen erhöhen (Angelucci et al. 2012).

Außerdem spielen einige Chemokine bei der Interaktion zwischen Fibroblasten und den Tumorzellen eine Rolle. Am bekanntesten sind Beiträge der Chemokine SDF-1 (CXCR12), und FAP-1 (Übersichtsartikel Schauer et al. 2011). Auch CCL2 (MCP-1), CCL5, CCL7, IL-8 und CXC-Chemokin Ligand-14 (*CXC-chemokine ligand 14* – CXCL14) werden von TAF verschiedener Tumorentitäten abgegeben (Übersichtsartikel Mishra et al. 2011). Viele Arbeiten der letzten Zeit zeigen, dass das Monozyten-chemotaktisches Protein 1 (*monocyte chemotactic protein-1* – MCP-1/CCL2) zum Tumorwachstum und zur Progression beiträgt (Übersichtsartikel Deshmane et al. 2009). Im Leberkarzinom wurde beschrieben, dass CCL2, welches von TAF abgegeben wird, die Migration der Tumorzellen verstärkt (Dagouassat et al. 2010). Auch in Harnblasenkarzinom und Kopf-Hals Karzinomen (*head*

and neck squamous cell cancer – HNSCC) konnten Migration und Invasion der Tumorzellen durch CCL2 erhöht werden (Wu et al. 2011, Chiu et al. 2012). Indirekt fördert CCL2 die Progression von Tumoren, indem es als chemotaktisches Protein die Migration von Monozyten in den Tumor erhöht. Diese sogenannten Tumor-assoziierten Monozyten (TAM) können die Angiogenese im Tumor vorantreiben. Dies geschieht durch TAM-sekretiertes VEGF, welches die Migration von Endothelzellen fördert (Leek et al. 2000). Auch IL-8 begünstigt die Angiogenese im Tumor. Es bindet an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXC-Chemokinrezeptor-1 (*CXC-chemokine receptor-1* – CXCR1) und CXCR2, dessen Expression meist nicht mit dem Tumor Grad (*stage*) korreliert (Übersichtsartikel Waugh und Wilson 2008, Ning et al. 2011). IL-8 stimuliert die Proliferation, das Überleben und die Migration von vaskulären Endothelzellen (Li et al. 2003). Es wird angenommen, dass einige Tumorzellen IL-8 produzieren und dies mit Parametern wie Tumorwachstum, -angiogenese, -invasion und -metastasierung sowie Chemotherapeutika-Resistenz, Kachexie und Überleben assoziiert ist (Ju et al. 2012). Doch auch Fibroblasten produzieren dieses Protein. Eine erhöhte Abgabe von IL-8 durch Fibroblasten wurde schon im Hautkarzinom, in Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, im Ovarialkarzinom und im Endometriumkarzinom gezeigt (Kolář et al. 2012, Mueller et al. 2007, Schauer et al. 2013, Subramaniam et al. 2013). Eine Aktivierung der IL-8-Expression und -Sekretion durch TAF unter dem Einfluss von Tumorzellen wurde in einigen Arbeiten beschrieben (Li et al. 2009, Schauer et al. 2013, Okochi et al. 2013).

Da TAF genetisch stabiler als Tumorzellen sind und einen erheblichen Einfluss auf die Tumorzellen ausüben, könnten sie ein effektives Ziel der Tumor-Immuntherapie sein (Übersichtsartikel Loeffler et al. 2006). So wird die enzymatische Aktivität des TAF-produzierten Proteins FAP mittel Val-boroPro (Talabostat) inhibiert und das Tumorwachstum vermindert. In einer Phase II Studie im Kolonkrebs konnte kein objektives Ansprechen beim Patienten auf das Mittel, aber eine Inhibierung der FAP-Aktivität im peripheren Blut gezeigt werden (Narra et al. 2007). Möglicherweise könnte es aber zusammen mit anderen Mitteln die Chemotherapie ergänzen.

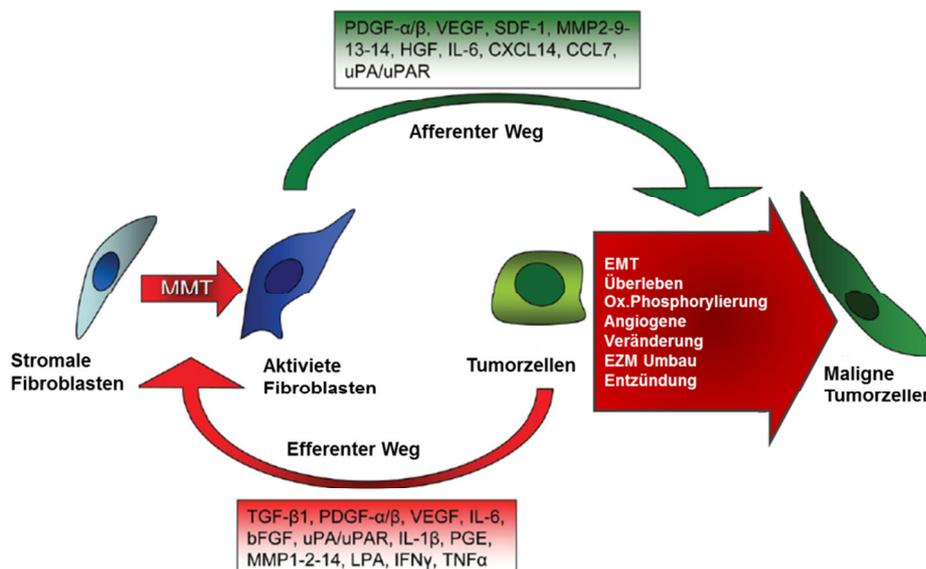


Abbildung 1.4: Interaktionen von Fibroblasten und Tumorzellen.

Tumorzellen aktivieren Fibroblasten durch Faktoren wie TGF- β 1, IL-1 α , IL-1 β und Tumornekrosefaktor- α (*tumor necrosis factor- α* – TNF- α) über einen „efferenten Weg“. Aktivierte Fibroblasten können durch die Sekretion von IL-6, IL-8, MMP-2, MMP-9, CCL-2 Tumorzellen über den „afferenten Weg“ beeinflussen und sie so in einen malignen Phänotyp überführen. Verändert nach Übersichtsartikel Cirri und Chiarugi 2011

1.4 Matrix Metalloproteasen im Tumorgeschehen

Matrix Metalloproteasen (MMPs) sind eine Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen, welche als proteolytische Enzyme wirken und die EZM abbauen (Übersichtsartikel Kessenbrock et al. 2010). Sie sind wichtig für die Entwicklung und Morphogenese, spielen aber auch eine Rolle bei Erkrankungen wie Arthritis, Arteriosklerose, Aneurysmen, Nephritis, Fibrose und Krebs (Übersichtsartikel Visse und Nagase 2003). Je nachdem welchen Bestandteil der EZM durch MMPs abgebaut werden, unterteilt man diese in Kollagenasen (MMP-1,-8,-13), Gelatinasen (MMP-2,-9), Matrilysine (MMP-7,-26), Stromelysine (MMP-3,-10,11) und Membrantyp-MMPs (MMP-14,-15,-16,-17,-24,-25) (Übersichtsartikel Leonardi et al. 2012). Einige MMPs werden sekretiert und andere, wie die Membrantyp-MMPs verbleiben in der Plasmamembran (Übersichtsartikel Visse und Nagase 2003). Zunächst werden alle MMPs als inaktive Proform synthetisiert (Übersichtsartikel Roy et al. 2009) (Abbildung 1.5). Durch die Abspaltung der Pro-Domäne oder eine Modifizierung der Cystein-Thiol-Gruppe (*Cystein-Switch* Mechanismus) werden MMPs aktiviert (Übersichtsartikel Parks et al. 2004). Die Aktivierung von MMPs kann unter anderem durch andere MMPs oder Serin-Proteasen erfolgen (Übersichtsartikel Sternlicht und Werb 2001). So wird beispielsweise von

Fibroblasten-sekretiertes Pro-MMP-2 durch membranständiges, von Tumorzellen-exprimiertes MMP-14 (MT1-MMP) proteolytisch gespalten (Fullár et al. 2012).

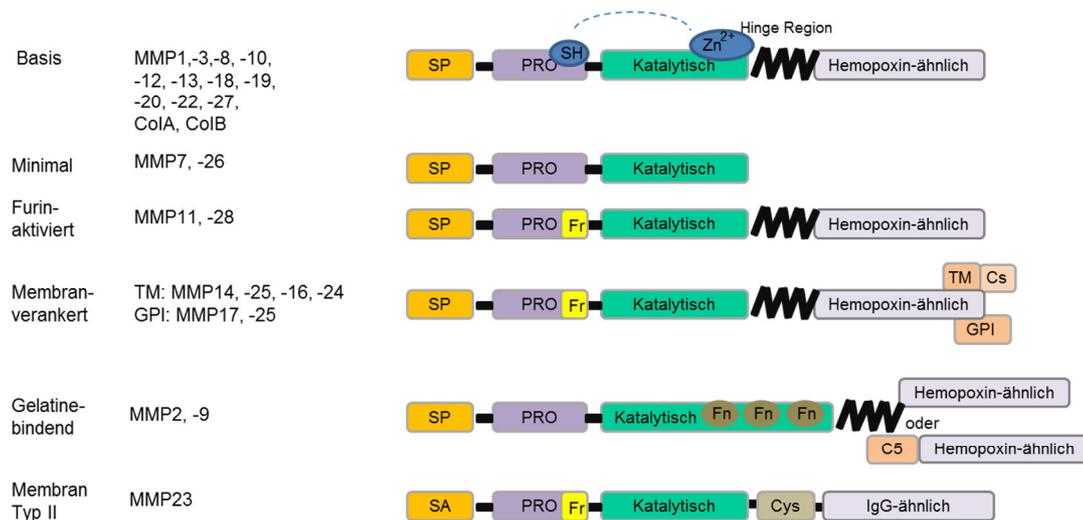


Abbildung 1.5: Aufbau der Matrix Metalloproteinasen.

Alle MMPs enthalten mindestens eine Pro- und katalytische Domäne. Die katalytische Domäne ist gekennzeichnet durch ein Zink-Ion im aktiven Zentrum. Verändert nach Übersichtsartikel Parks et al. 2004

Fibroblasten produzieren eine Reihe von MMPs wie MMP-1,-2,-3,-9,-11,-13,-14 und MMP-19 (Übersichtsartikel Kessenbrock et al. 2010). Wallard und Kollegen untersuchten mRNA Expression von verschiedenen MMPs in Tumor und Stromazellen von Blasen-tumorpatienten (Wallard et al. 2006). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mRNA der MMP-1,-11,-14,-15 signifikant stärker im Stroma als in den epithelialen Zellen des Tumorgewebes exprimiert wurde. Des Weiteren wird auch die Expression der MMPs in TAF durch Tumorzellen gefördert. Im Mammakarzinom wird beispielweise MMP-1 und MMP-3 in TAF durch Kultivierung mit Medium der SUM102 Mammakarzinomzellen, verstärkt exprimiert (Eck et al. 2009). Auch die Expression und Sekretion von MMP-9 konnte in Fibroblasten durch Tumorzell-sekretiertes TNF- α und TGF- β erhöht werden (Stuelten et al. 2005). Der extrazelluläre Matrix Metalloproteinasen Induktor (*extracellular matrix metalloproteinase inducer* – EMMPRIN/CD147) wird von Tumorzellen abgegeben und kann die MMP-2-Sekretion von Fibroblasten erhöhen (Koga et al. 2011).

Es ist demnach anzunehmen, dass auch im Blasenkarzinom die MMP-vermittelten Interaktionen zwischen Tumorzellen und Stromazellen eine Rolle spielen und näher untersucht werden sollten.

1.5 Epitheliale Mesenchymale Transition von Tumorzellen

Die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese und der Wundheilung sowie auch in der Tumorprogression (Übersichtsartikel McConkey et al. 2009). Dabei verändert sich das Expressionsmuster der Zellen und aus einem epithelialen Phänotyp werden mesenchymale Zellen mit veränderten Eigenschaften (Abbildung 1.6). Auch die Zellen des Tumorstromas können die EMT von epithelialen Tumorzellen vorantreiben.

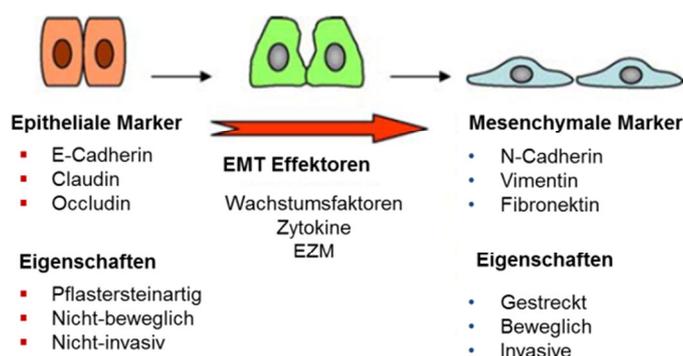


Abbildung 1.6: Epitheliale und mesenchymale Markerproteine der EMT und damit assoziierte zelluläre Eigenschaften.

Verändert nach Übersichtsartikel Gout und Huot 2008

Auf molekularer Ebene ist die EMT gekennzeichnet durch eine verminderte E-Cadherin-Expression, was zu einem Verlust der homotypischen Adhäsion führt (Adhim et al. 2011). Auf der anderen Seite kommt es zu einer erhöhten Expression von N-Cadherin und Vimentin (Übersichtsartikel Min et al. 2008). Snail, Slug, Zeb1/2 und Twist vermindern die Expression von E-Cadherin, was zu einer Verminderung der Zell-Zell Kontakte führt. Die Veränderungen in den epithelialen Zellen werden durch verschiedene Faktoren induziert. Zu den bekanntesten gehören der epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor* – EGF), HGF, VEGF, TGF- α und TGF- β (Richter et al. 2011). Einige dieser Faktoren sind bekannt dafür, dass sie von TAF exprimiert werden und zudem auch Fibroblasten aktivieren können (Lebret et al. 2007, Hawinkels et al. 2014). TGF- β wird bei der EMT oft als „Schlüssel-Regulator“ bezeichnet (Übersichtsartikel Paraiso und Smalley 2013). So kann TGF- β über die Aktivierung von Smads die Expression von Snail, Slug, Zeb1/2 und Twist erhöhen oder auch über einen „nicht-Smad“-vermittelten Weg Migration und Invasion steigern (Übersichtsartikel Katsuno et al. 2013). Durch eine verstärkte Migrationsfähigkeit der Zellen können diese ihren ursprünglichen Ort verlassen,

in die Blutbahn oder in das Lymphsystem einwandern und in anderen Geweben Metastasen bilden. Nachdem die Zellen dort eingewandert sind, kann es zudem zu einer Mesenchymal-epithelialen Transition (MET) kommen (Übersichtsartikel Kalluri und Weinberg 2009).

Des Weiteren kann durch EMT eine Chemotherapie-Resistenz vermittelt werden. So reagieren einige Zellen, welche den mesenchymalen Phänotyp besitzen nicht auf die BCG Therapie (Übersichtsartikel McConkey et al. 2009). Durch Cyclooxygenase-2 (COX-2) Hemmer konnte in de-differenzierten T24 Blasenkarzinomzellen die Snail-mRNA Expression vermindert und die E-Cadherin-mRNA Expression erhöht werden (Adhim et al. 2011). Dies könnte die Therapie von muskel-invasiven *high-grade* Blasentumoren verbessern.

1.6 Blasenkarzinom

Nach Informationen des Robert-Koch-Institutes (RKI) und des Zentrums für Krebsregisterdaten (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland – GEKID) erkrankten in Deutschland im Jahr 2008 rund 16.000 Patienten an einem muskel-invasiven Harnblasenkarzinom (GEKID/RKI Krebs in Deutschland 2007/2008). Etwa 5.500 Menschen starben daran, wobei die Zahl der Sterbefälle seit 1999 leicht abnimmt. Dabei haben Männer ein viel höheres Risiko, an Blasenkrebs zu erkranken, da sie fast 72 % der Neuerkrankten stellen. Des Weiteren ist das Blasenkarzinom eine Krebserkrankung, die erst im späten Alter erfolgt. So erkrankt nur etwa jede(r) Fünfte vor dem 65. Lebensjahr (GEKID/RKI Krebs in Deutschland 2007/2008). Die Risikofaktoren liegen bei hohem Tabakkonsum (aktiv und passiv), sowie der Exposition gegenüber bestimmten chemischen Stoffen, wie beispielsweise von aromatischen Aminen. Auch genetische Faktoren spielen eine Rolle, da familiäre Häufungen beobachtet wurden. Hauptsächlich kommt es zu einer Veränderung der epithelialen Zellen des Urothels der Blase (*transitional cell carcinoma* – TCC) (Übersichtsartikel Cheng et al. 2011). Das Blasenkarzinom wird in nicht-muskelinvasive Tumore (Ta, Tis, T1) und muskel-invasive Tumore unterteilt (T2 bis T4) (Übersichtsartikel van der Meijden 1998) (Abbildung 1.7).

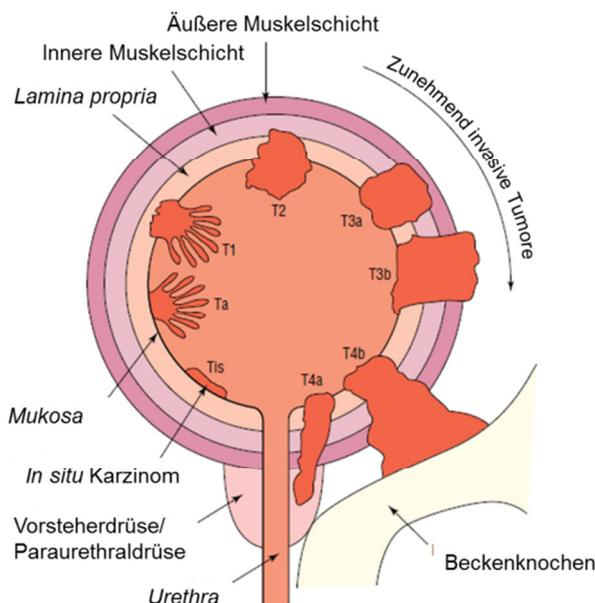


Abbildung 1.7: Chematischer Aufbau der Blase mit den verschiedenen Tumor (T-) Stadien. Verändert nach Übersichtsartikel van der Meijden 1998

Bei der histologischen Beschreibung der Tumore, dem sogenannten Grading (Grad der histologischen Differenzierung), werden seit 2004 von der WHO nur noch „*low-grade*“ und „*high-grade*“ Urothelkarzinome unterschieden (Lindemann-Docter und Knüchel 2008).

Hinsichtlich der Entstehung von Blasenkarzinomen scheinen sich *low-grade* und *high-grade* Tumore stark zu unterscheiden. So finden sich oft Mutationen in *hras* und *Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-3 (fibroblast growth factor -3 – fgfr3)* Genen, welche zu *low-grade* nicht-invasiven Tumoren führen. Eine Veränderung in den Tumorsuppressor-Genen *p53* und *Retinoblastom-Protein (restinoblastoma protein – rb)* sind oft in invasiven Tumoren zu finden (Übersichtsartikel Jacobs et al. 2010) (Abbildung 1.8). Veränderungen im *p53*-Gen verhindern den Zellzyklus-Arrest und Apoptose. Die Mutationen im *fgfr3*-Gen führen oft zu einer Aktivierung von Proteinkinasen (MAPK, PI3K) (Übersichtsartikel Cheng 2011). Bei dem Großteil der Patienten (70-80%) wird ein oberflächiges (nicht-muskelinvasives) Blasenkarzinom diagnostiziert (Übersichtsartikel Jacobs et al. 2010). Allerdings kommt es bei 70% der nicht-invasiven Tumoren (und Papillomen) zu Rezidiven, wovon 15% zu einem muskel-invasiven Tumor werden. Invasive Tumore sind ferner oft durch den Einfluss der Mikroumgebung gekennzeichnet. Man findet in 16 von 18 Fällen Myofibroblasten in Gewebeproben von

Blasentumorpatienten (Alexa et al. 2009). So sind invasive Blasentumore oft gekennzeichnet durch die veränderte Expression von N-Cadherin, E-Cadherin, MMPs und VEGF, welche auch durch das Tumorstroma beeinflusst werden (Übersichtsartikel Jacobs et al. 2010).

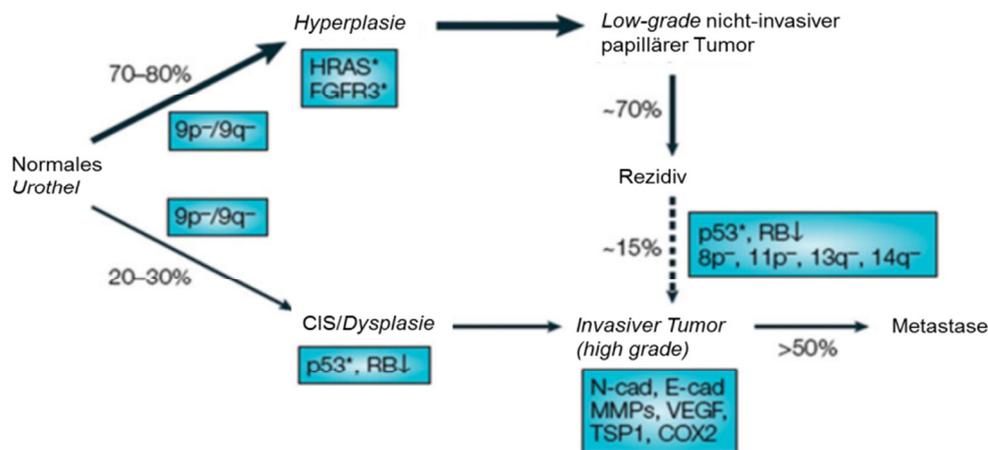


Abbildung 1.8: Wichtige genetische und epigenetische Veränderungen beim Blasenkarzinom. Verändert nach Übersichtsartikel Jacobs et al. 2010

Beim Auftreten oberflächiger Tumore erfolgt eine transurthrale Resektion (TUR). Mittels Zytostatika-Gabe oder Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Therapie soll das Auftreten von Rezidiven verhindert werden. Obwohl die BCG Gabe bei der Behandlung von nicht-invasiven Blasenkarzinomen schon 1976 von Morales und Kollegen beschrieben wurde, ist der Wirkmechanismus noch nicht genau bekannt (Morales et al. 2002, Shintani et al. 2007). Beim muskel-invasiven Blasenkarzinom erfolgt eine radikale Zystektomie, pelvine Lymphadenektomie und Harnumleitung (Übersichtsartikel Resnick et al. 2013). Eine Früherkennung ist nicht nur wegen der hohen Zahl der Rezidiven beim Blasenkarzinom von extremer Bedeutung. Es werden bislang verschiedene prognostische und diagnostische Marker eingesetzt und getestet. Für eine Diagnose bieten sich hier Urinproben als Material an, da diese leicht zugänglich sind. Einige kommerziell erhältliche Tests, welche das nukleare Matrix Protein-22 (*nuclear matrix protein-22* – NMP-22) bzw. das Blasen tumor Antigen (*bladder tumor antigen* – BTA) nachweisen, werden in der Praxis schon eingesetzt (Urquidi et al. 2012). In Zukunft könnte IL-8 als diagnostischer Marker für das Blasenkarzinom eine Rolle spielen (Urquidi et al. 2012).

In gesunden Blaszellen wurde gezeigt, dass eine Reduzierung der Expression von IL-8 mittels siRNA zum Zelltod führt (Tseng-Rogenski and Liebert 2009). IL-8 ist demnach

auch ein wichtiger Wachstumsfaktor von urothelialen Blasen­zellen. Die Sekretion von IL-8 kann durch eine *Escherichia coli* Infektion in Blasen­zellen gesteigert, aber auch durch Faktoren, wie IL-1, IL-17 und TNF- α stimuliert werden (Billips et al. 2007).

IL-1 α wurde 1997 von Fonsatti und Kollegen im konditionierten Medium der Blasenkarzinomzelllinien HT-1080 und 5637 nachgewiesen (Fonsatti et al. 1997). In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass IL-1 die Expression von löslichen interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (*soluble intercellular adhesion molecule-1* – sICAM-1) in Endothelzellen erhöht. Die Expression des IL-1-Rezeptors auf Fibroblasten wurde schon in einigen Arbeiten gezeigt (Dudas et al. 2011). Im Gegensatz dazu wurde von Seddighzadeh und Kollegen demon­striert, dass geringe IL-1 α -mRNA-Expression mit einem höheren Risiko verbunden ist, an Blasenkrebs zu sterben (Seddighzadeh et al. 2003).

TNF- α , welcher zunächst als tumorhemmend beschrieben wurde, weil er in manchen Situationen Apoptose auslöst, kann auch tumorfördernd wirken. TNF- α kann in Blasentumor­zellen über den NF- κ B-Signalweg Zellinvasivität sowie Expression und Sekretion von MMP-9 erhöhen (Lee et al. 2008).

Die TGF- β Expression im Blasenkarzinom wird kontrovers diskutiert. Es gibt sowohl Arbeiten, die eine verminderte TGF- β -mRNA-Expression in Blasenkarzinom verglichen mit normalem Gewebe beschreiben, als auch solche, bei denen erhöhte Proteinexpression mit der Progression von Blasenkarzinomen korreliert wird (Eder et al. 1997, Hung et al. 2008).

Auch EMT ist mit der Metastasierung und Tumorprogression im Blasenkarzinom assoziiert (Adhim et al. 2011). Durch eine verminderte E-Cadherin-Expression kommt es auch zu einer verstärkten Expression von mesenchymalen Markern wie MMP-2 und MMP-9 (Übersichtsartikel McConkey et al. 2009). Beide MMPs sind auch im Blasenkarzinom mit schlechter Prognose korreliert (Staak et al. 2006, Kumar et al. 2010, Reis et al. 2012).

2 Ziele der Arbeit

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von Stromazellen auf Tumorzellen für die Tumorprogression von Bedeutung ist. Im Harnblasenkarzinom sind Interaktionen von Tumor-assoziierten Fibroblasten (TAF) und Tumorzellen noch wenig untersucht. In der vorliegenden Arbeit soll diese bidirektionale Wechselwirkung näher charakterisiert werden. Dafür werden primäre TAF aus Patientenmaterial und primäre humane Vorhaut-Fibroblasten (*human foreskin fibroblasts* – HFF) verwendet. Dabei stellen HFF einen „nicht-aktivierten“ Fibroblastentyp dar, während TAF bereits „aktiviert“ sind. Dieser Vergleich dient dazu festzustellen, ob der „Aktivierungsgrad“ von Fibroblasten auch für die Beeinflussung von Blasentumorzellen von Bedeutung ist. Daneben soll die Verwendung zweier stark unterschiedlich maligner Blasentumorzelllinien (RT112 und Cal29) den Fibroblasten-Einfluss differenzieren.

Zunächst sollen Interleukin-8 (*interleukin-8* – IL-8) und die Matrix Metalloproteasen-2 und -9 (*matix metalloproteinase-2 and -9* – MMP-2,-9), welche im Blasenkarzinom eine bekannte Rolle in der Tumorprogression spielen, in einem Zellkulturmodell von TAF und Blasentumorzellen nachgewiesen werden. Anschließend soll geklärt werden, welcher der beiden Zelltypen diese Proteine sekretiert und ob der andere Zelltyp darauf einen Einfluss ausübt. Zudem soll nach weiteren Zytokinen, die an den Wechselwirkungen der Zellen beteiligt sind, beispielsweise mit Hilfe eines Zytokin-Arrays gesucht werden.

Zu den aus der Literatur bekannten Tumorzell-sekretierten Faktoren gehören der transformierende Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor- β* – TGF- β) und IL-1 α/β . In der vorliegenden Arbeit sollen die Expression und Sekretion dieser Faktoren in den zwei Blasentumorzelllinien untersucht werden. Ferner soll geklärt werden, ob diese Faktoren Fibroblasten zu Sekretion von Zytokinen und Proteasen anregen.

Das Auftreten von Metastasen ist häufigste Todesursache beim Patienten. Auch hier ist eine Beteiligung der Fibroblasten wahrscheinlich. Zur weiteren Klärung sollen Migration und Invasion der Blasentumorzellen in Gegenwart von Fibroblasten *in vitro* untersucht werden. Kann eine migrationsfördernde Wirkung von Fibroblasten gezeigt werden, so soll nach Faktoren, die dies unterstützt, gesucht werden. Diese könnten Ansatzpunkte für eine Hemmung der Tumorzellmigration und damit der Progression von Tumoren liefern.

Da ein Einfluss von Fibroblasten auf die Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) der Tumorzellen im Mammakarzinom bereits gezeigt wurde, soll anhand der epithelialen RT112-Blasenkarzinomzelllinie die Wirkung der TAF auf die Expression der EMT-Proteine E-Cadherin und Vimentin geprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellenlinien

Die Zelllinie RT112 wurde aus einem gut differenzierten, nicht-metastasierten, „*low-grade*“ (G2) Harnblasenkarzinom des Übergangsepithels (*transitional cell carcinoma* – TCC) einer weiblichen Patientin generiert (DSMZ, Perabo et al. 2001). Die Zelllinie ist in der Lage in Mausmodellen Tumore zu entwickeln (Masters et al. 1986). Es handelt sich um eine epitheliale Zelllinie, die als adhärenter Monolayer wächst und deren Verdopplungszeit ca. 35 h beträgt (DSMZ). Die Zellen wurde in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter der Zugabe von 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) kultiviert.

Die Zelllinie Cal29 wurde aus einem de-differenzierten, muskelinvasiven, „*high-grad*“ (G4) TCC einer weiblichen 80 Jahre alten Patientin isoliert (DSMZ, Cattani et al. 2011). Die Zelllinie ist in der Lage in Mausmodellen Tumore zu entwickeln. Es handelt sich um eine epitheliale Zelllinie, die als adhärenter Monolayer wächst und deren Verdopplungszeit ca. 50-60 h beträgt. Die Zellen wurde in DMEM unter der Zugabe von 10 % FKS und 1 % Pen/Strep kultiviert.

3.1.2 Primäre Zellen aus Patientenmaterial

Die primären Fibroblasten-Zellen wurden in dem Institut für Urologie des Universitätsklinikums Jena generiert. Dabei wurden die verwendetet humanen Vorhaut-Fibroblasten (*human foreskin fibroblasts* – HFF) aus Zirkumzisionen von Erwachsenen und Kindern und die Harnblasenkarzinom-assoziierten Fibroblasten (Tumor-assoziierte Fibroblasten - TAF) aus Gewebeproben, welche im Rahmen von Zystektomien invasiver Harnblasenkarzinome entnommen wurden, isoliert (Tabelle 1)(Enkelmann et al. 2011). Die Zellen wurde in DMEM unter der Zugabe von 10 % FKS und 1 % Pen/Strep kultiviert. HFF wurden bis zur Passage 25 verwendet und TAF konnten ca.7mal passagiert werden.

Tabelle 1: Daten zu verwendeten TAF, welche aus Zystektomien gewonnen wurden

TAF Probennummer	Patientendaten	Grading
5530	Weiblich, 81 Jahre	high-grade
6549	Weiblich, 81 Jahre	low-grade

3.1.3 Puffer

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung	
Coomassie-Lösung	Coomassiepulver	0,25 % (w/v)
	Methanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
DNA-Ladepuffer 6x	Bromphenolblau	0,09 % (w/v)
	Glycerol	60 % (v/v)
	EDTA	60 mM
Elektrophoresepuffer 10x	Glycin	2 M
	Tris	250 mM
	SDS	1 % (w/v)
Entfärber-Lösung	Essigsäure	10 % (v/v)
	Methanol	30 % (v/v)
Gel-Äquilibrierung Puffer	Triton X-100	2,5 % (v/v)
Gel-Inkubations Puffer pH=7,5	Tris	50 mM
	CaCl ₂	10 mM
	NaN ₃	0,02 %
	NaCl	0,15 M
HEPES-Puffer	HEPES	10 mM
	Natriumchlorid	145 mM
	Kaliumchlorid	5 mM
	Magnesiumsulfat	1m M
	D(+) Glucose	10 mM
Ladepuffer 5x	Bromphenolblau	0,5 % (w/v)
	SDS	10 % (v/v)
	Tris-HCl (1 M pH=6.8)	30 % (v/v)

	Glycerol	30 % (v/v)
	Mercaptoethanol	11 % (v/v)
NP-40 Puffer	Tris	25 mM
	Natriumchlorid	140 mM
	EDTA	1 mM
	Natriumdiphosphat (x10H ₂ O)	20 mM
	NP-40	0,5 % (v/v)
PBS (1x)	Natriumchlorid	140 mM
	Kaliumchlorid	3 mM
	Natriumphosphat (x2H ₂ O)	10 mM
	Kaliumphosphat	2 mM
PFA 4% Lösung pH=7.5-8.0	Paraformaldehyd	15 mM
	PBS (ohne Magnesium-und Calciumchlorid)	100 ml
	100 mM Magnesiumchlorid	0,1 % (v/v)
	100 mM Calciumchlorid	0,1 % (v/v)
Ponceau-S-Mix 10x	Trichloressigsäure	180 mM
	Sulfosalicylsäure	120 mM
	Ponceau S	0,2 % (w/v)
primärer-Antikörper-Lösung	TBS-T	10 ml
	Rinderserumalbumin Fraktion V	5 %
	Natriumazid	0,02 %
Probenpuffer (nicht-reduzierend)	0,5 M Tris-HCl pH=6.8	10 % (v/v)
	Glycerol	40 % (v/v)
	10 % SDS	10 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,05 %
TAE-Puffer 50x	Essigsäure	5,70 %
	Tris-HCl pH=8.0	2 M
	EDTA	50 mM
TBS-T 10x pH=7,5	Natriumchlorid	680 mM
	Tris-HCL ph=7.6	100 mM
	Tween20	0,01 % (v/v)
Transferpuffer 1x	Tris-HCl (pH=7.5)	25 mM
	Glycin	190 mM
	Methanol	20 % (v/v)

3.1.4 Chemikalien

Tabelle 3: verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
50 bp DNA-Marker	Fermentas LifeScience
5x Reverse Transkriptase Puffer	Fermentas LifeScience
Acrylamid, Rotiphorese Gel 40	Carl Roth GmbH & Co.
Agarose-Pulver	Biozym Scientific GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co.
Antikörper Verdünnungslösung	Dako
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.
Collagen (Rattenschwanz, Typ1)	BD Bioscience
Coomassie Brilliant Blue	Carl Roth GmbH & Co.
Cytofix/Cytoperm TM	BD Bioscience
D(+)-Glucose	Carl Roth GmbH & Co.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH
dNTP-Mix	Fermentas
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories
Entellan TM	Merck KGaA
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co.
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories
Gelatine	Serva Electrophoresis GmbH
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co.
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.
Hämatoxylin	Dako
HEPES	Carl Roth GmbH & Co.
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co.
Kaliumchlorid	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co.
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co.
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH & Co.
Matrigel TM Basement Membran Matrix	BD Bioscience
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.

Monensin Lösung (1000x)	Biolegend
Natriumazid	Carl Roth GmbH & Co.
Natriumdiphosphat	Carl Roth GmbH & Co.
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co.
NP-40	Serva Electrophoresis GmbH
Oligi-(dT)-Primer	Fermentas LifeScience
Page Ruler Plus (Protein Marker)	Fermentas LifeScience
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH
PCR-grade Wasser	B.Braun AG
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics GmbH
Random-Hexamerprimer	Fermentas LifeScience
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co.
Roti-Quant [®]	Carl Roth GmbH & Co.
Salzsäure, rauchend	Carl Roth GmbH & Co.
Saponin	Carl Roth GmbH & Co.
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH
Trisbase	Carl Roth GmbH & Co.
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co.
Trypsin/EDTA	Biochrom AG
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co.
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH

3.1.5 Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
12-Well Platten Transwell geeignet	BD Bioscience
6-,12-,24-,96-Well Platten	Greiner bio-one GmbH
96-Well PCR Platten	Amersham Bioscience
Hyperfilm TM	Amersham Bioscience
Kammerobjektträger	BD Bioscience
Kryoröhrchen	Greiner bio-one GmbH
Nucleobond PC100	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG
Objektträger Super-Frost Plus	Menzel
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf AG

Reaktionsgefäße (15ml,50ml)	BD Bioscience
Sterilfilter (0,2µm)	Sartorius AG
Transwell 0,8µm Porengröße	BD Bioscience
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ²)	Greiner bio-one GmbH

3.1.6 Enzyme

Tabelle 5: verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Reverse Transkriptase H-Minus (200 U/µl)	Fermentas
RiboLock RNase Inhibitor (40U/µl)	Fermentas LifeScience
Taq DNA Polymerase (62,5 U/ml)	5-Prime

3.1.7 Zytokine

Tabelle 6: verwendete Zytokine

Zytokin	Hersteller
humanes GM-CSF	INVIGATE GmbH
humanes IL-1α	INVIGATE GmbH
humanes IL-1β	INVIGATE GmbH
humanes IL-8	Immunotools
humanes MCP-1	Immunotools
humanes TGF-β	Peppo Tech

3.1.8 Kits

Tabelle 7: verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
5-Prime Master Mix	5 Prime
Biotin Blocking System	Dako
Cell Titer Glow [®]	Promega GmbH
Dako REAL [™] Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse	Dako
Lumi-Light Western Blot Substrate	Perkin Elmer Life Science
Interleukin-1α ELISA	Biolegend

Interleukin-1 β ELISA	eBioscience
Interleukin-8 ELISA	Immunotools
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG.
Proteome Profiler TM Array, Human Cytokine Array Panel A	R&D Systems GmbH
RealTime ready Universal ProbeLibrary	Roche Diagnostics GmbH
TGF- β ELISA	R&D Systems GmbH

3.1.9 Primer

Die Oligonukleotide wurden von der Firma METABION hergestellt.

Tabelle 8: verwendete Primer

Name	Sequenz 5' - 3'	Annealing Temperatur
β -Actin ff	CAGGCACCAGGGCGTGAT	61 °C
β -Actin rr	CCAGAGGCGTACAGGGATAGC	60 °C
IL-1 α ff	GCTGAGGAAGATGCTGGTTC	60 °C
IL-1 α rr	TCCATATCCTGTCCCTGGAG	60 °C
IL-1 β ff	GAACCAGCATCTTCCTCAGC	57 °C
IL-1 β rr	TCCATATCCTGTCCCTGGAG	56 °C
MCP-1 ff	CCCCAGTCACCTGCTGTTAT	60 °C
MCP-1 rr	TGGAATCCTGAACCCACTTC	57 °C
GM-CSF ff	CTTCCTGTGCAACCCAGATT	60 °C
GM-CSF rr	CTTGGTCCCTCCAAGATGAC	60 °C
Mycoplasmen ff	AGCAAACAGGATTAGATACC	50 °C
Mycoplasmen rr	CATCTGTCACTCTGTAAACCT	53 °C

Tabelle 9: verwendete Primer für die Real-Time PCR

Name	Sequenz 5' - 3'	Annealing Temperatur	Probe Nr.
MT1-MMP ff	GCCTTGGACTGTCAGGAATG	60 °C	37
MT1-MMP rr	AGGGGTCACTGGAATGCTC	60 °C	37
GAPDH ff	AGCCACATCGCTCAGACAC	60 °C	60
GAPDH rr	GCCCAATACGACCAAATCC	60 °C	60

3.1.10 Antikörper

Tabelle 10: verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Spezies	Hersteller
anti-E-Cadherin	1:1000	Maus	Dako
anti-IL-8	1 µg/ml	Maus	R&D Systems GmbH
anti-IL-8-FITC	1:50	Maus	Biolegend
anti-mouse IgG1 HRP	1:10000	Ziege	Santa Cruz
anti-mouse IgG2b-FITC	1:50	Maus	Immunotools GmbH
anti-MT1-MMP	1:2000	Kaninchen	Epitomics
anti-rabbit IgG1-HRP	1:10000	Ziege	Santa Cruz
anti-Tubulin	1:5000	Kaninchen	Cell signaling Technology
anti-Vimentin	1:1500	Maus	Dako

3.1.11 Geräte

Tabelle 11: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Bakterieninkubator Incu-Line	VWR
Blot-Dokumentation G:Box Chemolumineszenz	Syngene
CO ₂ Inkubator	INTEGRA Bioscience GmbH
CyFlow space Durchflusszytometer	Partec GmbH
Entwicklungsmaschine Cuix 60	AGFA
Geldokumentation G:Box Fluoreszenz	Syngene
Laborwaage	Sartorius AG
Laborzentrifuge Megafuge 1.0R	Hereaus Sepatech GmbH
Laminarbox (HeraSafe)	INTEGRA Bioscience GmbH
Lichtmikroskop Axiophot mit AxioCam	Carl Zeiss AG
Lichtmikroskop Motic AE21	Motic
Luminometer Glo-Max [®]	Promega GmbH
Mini-PROTEAN II [®] Elektrophorese Kammer	Bio-Rad
Photometer NanoDrop [®] 2000	PEQLAB GmbH
Power Pack 200	Bio-Rad
Schüttler KS-15	Edmund Bühler

Spektrometer	Tecan
StepOne Plus Real-Time-PCR	Applied Biosystems GmbH
Thermocycler	Applied Biosystems GmbH
Tischzentrifuge 54115	Eppendorf AG
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf AG

3.1.12 Software

Tabelle 12: verwendete Software

Software	Hersteller
EndNote	Thomas Reuter
Primer3	SourceForge
ImageJ	National Institute of Health
T Scratch	CSElab
ApE	M. Wayne Davis
Cyfllogic	CyFlo Ltd
Axio Vision	Carl Zeiss

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Zellkultur

Die Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, da es hier von enormer Bedeutung ist, Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermeiden. Dafür wurden die Arbeitsschritte unter einer Laminarbox durchgeführt und verwendete Materialien und Geräte vor Gebrauch desinfiziert oder autoklaviert. Für die Zellkultivierung wurde ein Brutschrank verwendet, welcher unter Wasserdampfsättigung mit einem CO₂ Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37 °C arbeitete.

3.2.1.2 Kryokonservieren von Zellen

Damit Zelllinien über einen längeren Zeitraum gelagert werden können, müssen sie in flüssigen Stickstoff konserviert werden. Die Zellen sollten sich in einer niedrigen Passage befinden, da einige Zellen dazu neigen sich im Laufe der Zeit morphologisch und

genetisch zu verändern. Die Zellen sollten zudem vorher mittels Mikroskop auf Kontaminationen begutachtet und durch einen entsprechenden Test auf Mycoplasmen untersucht werden.

Die Zellen sollten 80 bis 90 % konfluent sein und mindestens einmal mit PBS gewaschen werden, bevor sie mit Hilfe von Trypsin-EDTA von der Oberfläche abgelöst wurden. Durch die Zugabe von Zellkulturmedium und der darin enthaltenen Proteaseinhibitoren, wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellsuspension bei 100lxlg für 5 min zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde mit einer Lösung bestehend aus 80 % DMEM, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 10 % FKS resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach einer Lagerung über einige Tage bei -80 °C wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt und gelagert.

3.2.1.3 Auftauen kryokonservierter Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus den Behältern mit flüssigen Stickstoff (-196 °C) herausgenommen und in einem Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in eine 25 cm² Kulturflasche mit 6 ml Kulturmedium überführt. Nach ein bis zwei Tagen konnten die Zellen mit frischem Medium versetzt oder bereits passagiert werden.

3.2.1.4 Passage von Zellen

Die adhärennten Zellen wuchsen bis zu einer Konfluenz von 70 bis 90 %, bevor sie passagiert wurden. Dafür wurde das verbrauchte Medium verworfen und die Zellen zunächst mittels PBS gewaschen. Nach der Zugabe von Trypsin-EDTA lösten sich die Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche ab. Dabei war zu beachten, dass die Fibroblasten und Cal29-Zellen nur 1-2 min inkubierten, während die RT112-Zellen 5-6 min in der Trypsin-EDTA Lösung verblieben. Durch die Zugabe von DMEM (mit mindestens 10 % FKS) wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt. Ein Teil der Zellsuspension wurde in ein neues Kulturgefäß überführt und je nach Volumen des Gefäßes mit Kulturmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden im Brutschrank weiter kultiviert.

Des Weiteren ließen sich Primärkulturen im Gegensatz zu den etablierten Zelllinien nur einige Male passagieren, bevor sie sich nicht mehr teilten oder sehr stark veränderten.

3.2.1.5 Zellzahlbestimmung

Für verschiedene Versuche, wie z.B. Migrationsversuche, musste die Zellzahl der Zellen genauer bestimmt werden. Dazu wurde eine Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer) verwendet. Die Zellen wurden 1:1 mit Trypanblau, welches tote Zellen anfärbt, gemischt und die Lösung zwischen Kammer und Deckgläschen gegeben. Es wurden die Zellen in vier Quadraten mit einer Fläche von 1 mm^2 und einem Volumen von $0,1 \mu\text{l}$ ausgezählt. Der sich daraus ergebende Mittelwert wurde nun mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert um die Zellkonzentration pro ml zu erhalten. Die Gesamtzellzahl errechnet sich aus der Zellkonzentration pro ml mal des Volumens der Zellsuspension.

3.2.1.6 Herstellung von konditionierten Medium (*conditioned medium* – CM)

Für Migrationsversuche und die Analyse der Zytokin-Sekretion in der Tumor-Stroma Interaktion, wurden zellfreie konditionierte Medien hergestellt. Dazu wuchsen die Tumorzellen (in 75 cm^2) und Fibroblasten (25 cm^2) als Monokultur in Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz. Die Zellen wurden zweimal mit PBS und einmal mit serumfreien DMEM gewaschen. Danach erfolgte eine Kultivierung der Zellen in serumfreien DMEM (Tumorzellen 11 ml; Fibroblasten 6 ml). Nach 48 h wurde das Medium abgenommen und bei $300 \times g$ 15 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nach Überführung des Mediums in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß, wurde es bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurde das Macherey-Nagel NucleoSpin[®] RNAII Kit verwendet. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet und alle benötigten Schritte bei RT durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen abtrypsiniert und die Zellsuspension aus der Kulturflasche in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei $100 \times g$ für 5 min. Das gewonnene Zellpellet wurde mit $350 \mu\text{l}$ Lysepuffer (RA1) und $3,5 \mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol resuspendiert und zur vollständigen Lyse über Nacht bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben aufgetaut und das Lysat auf den NucleoSpin[®] Filter gegeben. Es folgte einer Zentrifugation für 1 min bei $11000 \times g$ um das Lysat zu reinigen und die Viskosität zu vermindern. Das Filtrat wurde

danach mit 350 μ l 70 % Ethanol gemischt und durch „Auf- und Ab-pipettieren“ homogenisiert. Das Gemisch wurde auf ein NucleoSpin[®] RNAII Säule gegeben und bei 11000|xlg 30 s zentrifugiert. Die RNA konnte an der Silica-Membran binden. Das Filtrat kann weiterhin genutzt werden, indem man beispielsweise die darin enthaltenen Proteine fällt. Um die DNA, welche auch auf der Membran binden konnte, zu entfernen, wurde die Membran mit 95 μ l des Gemisches aus 10 μ l rDNase und 90 μ l Reaktionsbuffer für rDNase 15 min inkubiert. Darauf folgten verschiedene Waschschriffe der Membran. Zur Inaktivierung der rDNase wurden 200 μ l des RA2 Puffers auf die Membran gegeben und bei 11000|xlg 30 s zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Membran mit 600 μ l RA3 Puffer bei 11000|xlg 30 s gewaschen. Der letzte Waschschriff erfolgte mit 250 μ l RA3 Puffer und einer Zentrifugation bei 11000|xlg für 2 min um Zellreste und Ethanol zu entfernen. Die Säule mit der Membran wurde auf ein Nuklease-freies Sammelgefäß gegeben. Je nach Probenvolumen wurde die Membran mit 40-60 μ l RNase-freiem Wasser inkubiert. Die Elution der RNA erfolgte durch Zentrifugation bei 11000|xlg für 1 min. Die gewonnene RNA wurde daraufhin bei -80 °C eingefroren.

3.2.2.2 Konzentrationsbestimmung der mRNA

Die Konzentrationsbestimmung der mRNA erfolgte einen Tag nach der Isolierung. Mittels NanoDrop 2000 Spektrometer wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Es wurde darauf geachtet, dass der Absorptionsquotient 260/280 bei 2,0 lag, damit keine Proteinverunreinigungen vorlagen.

3.2.2.3 Synthese der cDNA mittels Reverser Transkription

Für die Synthese der cDNA (*complementary DNA*) aus vorheriger Zell-isolierter mRNA, wurden Reagenzien der Firma Fermentas verwendet. Zunächst wurde 1 μ g RNA in 8,5 μ l destilliertem Wasser gelöst und bei 65 °C 5 min lang erhitzt. Nach der Zugabe von 9,5 μ l des Reaktionsgemisches (Tabelle 13) erfolgte eine Inkubation bei RT für 10 min.

Tabelle 13: Reaktionsgemisch der cDNA Synthese mit Komponenten der Firma Fermentas.

Mastermix Komponenten	Volumen
5x Reverse Transkriptase Puffer	4,0 μ l
dNTP-Mix [je 10 mM]	2,0 μ l

Oligo-(dT)18-Primer [0,5 µg/µl]	1,0 µl
Random Hexamer Primer [0,2 µg/µl]	1,0 µl
RiboLock RNase-Inhibitor [40 U/µl]	0,5 µl
Reverse Transkriptase H-Minus [200 U/µl]	1,0 µl

Die Reverse Transkription wurde nach einer Stunde bei 42 °C durch das Erhitzen bei 70 °C für 10 min abgestoppt. Dieser letzte Schritt führte zur Beendigung der enzymatischen Aktivität der M-MuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) Reversen Transkriptase. Bis zur Verwendung erfolgte die Lagerung der cDNA bei -20 °C.

3.2.2.4 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* – PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine häufig verwendete molekularbiologische Methode, um die Expression von bestimmten Genabschnitten zu untersuchen. Dazu werden Primer (kurze DNA Fragmente) verwendet, die an die DNA Matrize spezifisch binden und somit die Amplifikation eines gewünschten Genabschnitts einleiten.

Die Primer wurden entweder mit Hilfe des Primer3 Programmes erstellt oder aus der Literatur entnommen. Um eine Vervielfältigung der genomischen DNA zu vermeiden, umfasste das PCR-Produkt mindestens zwei Exons. Für die PCR-Analysen wurde der 5 PRIME MasterMix (2,5x) der Firma 5 PRIME verwendet. Dieser Mix beinhaltet die *Taq* DNA Polymerase, Nukleotide, Magnesium und Reaktionspuffer, sowie *Taq*Master PCR Verstärker, der für eine hohe Ausbeute sorgen soll. Für jede PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz gewählt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Reaktionsgemisch der PCR

Mastermix Komponenten	Volumen
2,5x 5 PRIME MasterMix	8,0 µl
Primer vorwärts [10 pmol/µl]	1,0 µl
Primer rückwärts [10 pmol/µl]	1,0 µl
cDNA	1,0 µl
Aqua dest.	8,0 µl

Nachdem der Reaktionsansatz gemischt und herunterzentrifugiert wurde, erfolgte die Amplifikation in einem *Thermocycler* „Thermal Cycler“ der Firma Applied Biosystems. Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, in der sich keine cDNA befand. Je nach PCR-Produkt wurden verschiedene PCR-Programme gewählt (Tabelle 15). Wenn es möglich war, wurden Primer des Gens von Interesse zusammen mit Primer des Bezugsproteins β -Aktins gemischt und zusammen amplifiziert. Die Primer-Sequenzen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 15: PCR-Programm zur Amplifikation von DNA Produkten.

95 °C	5 min	
95 °C	15 sec	} Zyklen (je nach Zielprodukt)
T _m (je nach Zielprodukt)	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

Nach der PCR-Reaktion erfolgte die Auftrennung der Produkte in einem Agarose-Gel.

3.2.2.5 Agarose-Gel-Elektrophorese zur Analyse der PCR-Produkte

Unter Verwendung eines Agarose-Gels können PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert werden. Dazu wurde Agarose-Pulver unter Erhitzung in TAE-Puffer gelöst. Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, wurde dem Agarose-Gel-Ansatz nach leichter Abkühlung der Farbstoff Roti[®]-GelStain der Firma Carl Roth hinzugegeben. Dieser Farbstoff bindet an die Nukleinsäuren im Gel, welche dann im Ultravioletten Licht (265 nm) sichtbar gemacht werden können.

Es wurde die gesamte PCR-Reaktion (20 μ l) mit 4 μ l 6x DNA Ladepuffer gemischt. Da die PCR-Produkte eine geringe Größe hatten, wurden sie in einem 2 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 200 mA.

3.2.2.6 Quantitative PCR (q-PCR) zu Expressionsanalysen der Membran-Typ-1 MMP (*membrane type-1 matrix metalloproteinase* – MT1-MMP)

Für die *realtime*-PCR wurde die Universal ProbeLibrary (UPL) Technology der Firma Roche verwendet. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie eine kurze Etablierungs- und Optimierungszeit benötigt. Für die Anwendung stehen 165 kurze „*probes*“ zur Verfügung, welche spezifisch an die DNA binden. Die *UPL probes* haben eine Länge von 8-9 Nukleotiden und sind am 5`Ende mit Fluorescein (FAM) und am 3`Ende mit einem Quencher markiert (Abbildung 9). Um die Spezifität und Schmelztemperatur zu gewährleisten, besitzen die *probes* „geschlossene Nukleinsäuren“ (*locked nucleic acid-LNA*). LNA´s sind RNA-Analoga, bei denen die Ribose durch eine Methylbrücke über das 2`-O und 4`-C Atom geschlossen (*locked*) ist (Abbildung 9). Dies führt zu einer erhöhten Thermostabilität und verminderte Duplex-Bildung. Im humanen Transkriptom kann jede *probe* an 7000 Transkripte binden. Durch den Einsatz von spezifischen Primern, wird jedoch die Amplifikation von nur einen spezifischen Gens gewährleistet. Bindet die *probe* an die DNA, so wird kein Fluoreszenzsignal ausgesendet, da sich der Quencher in der Nähe des Fluoresceins befindet. Nach der Bindung der Primer und Amplifikation der DNA durch die DNA-Polymerase, wird die *probe* von der DNA abgelöst und geschnitten. Das Fluorescein wird frei und kann im PCR-Cycler detektiert werden. Durch die Akkumulation des spezifischen PCR-Produkts steigt das Fluoreszenzsignal pro Zyklus an. Die Normierung der Expression des Gens erfolgt durch die parallele Analyse eines *housekeeping genes*. In diesen Versuchen wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als *housekeeping gene* verwendet. Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung der Genexpression. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode.

$$\Delta T = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{housekeeping gene}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Test}} - \Delta CT_{\text{Vergleich}}$$

$$n - \text{fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

CT = Cycle Treshold (Zyklus Schwellenwert)

Zielgen = MT1-MMP

housekeeping gene = GAPDH

Test = unbehandelt (Medium)

Vergleich = behandelt (konditioniertes Medium)

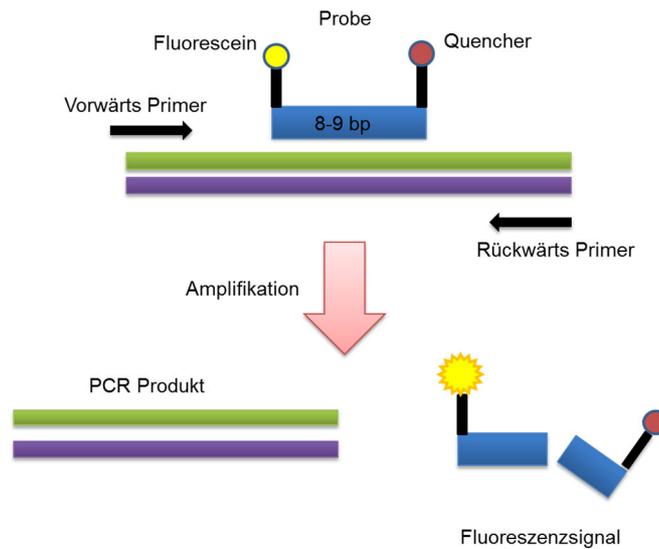


Abbildung 9: Ablauf der quantitativen PCR

3.2.3 Immunologische Methoden

3.2.3.1 Zytokin-Messung mittels Enzym-gekoppelter Immunsandwich Technik (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA)

Für die Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen in den Zellkulturen und Assays wurden die Medien abgenommen und 15 min bei 300|x|g und RT zentrifugiert. Danach wurden sie entweder sofort verwendet oder bei -20 °C bis zur Messung eingefroren. Bei den verschiedenen ELISA Tests handelt es sich jeweils um einen Sandwich ELISA. Dazu wurden zunächst Wells mit einem Antikörper, der gegen das gesuchte Zytokin gerichtet ist, beschichtet (4 °C über Nacht). Danach erfolgte die Inkubation mit dem Probenmaterial in welchem sich das gesuchte Zytokin befand und an den Antikörper binden konnte. Diese Bindung konnte durch einen weiteren sekundären monoklonaler Antikörper, welcher Biotin-konjugiert ist, detektiert werden. Darauf folgte eine Inkubation mit Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase* – HRP), welches an Biotin bindet. Die Detektion erfolgte mit Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat, welches durch HRP umgesetzt werden kann. Dieses Signal kann am Photometer gemessen (450 nm) und ausgewertet werden. Durch eine mitgeführte Standardreihe des gesuchten Proteins, kann die Konzentration genauer bestimmt werden.

Es wurden ELISAs für die Konzentrationsbestimmung von Interleukin (*interleukin* – IL)-8, IL-1 α , IL-1 β und dem transformierenden Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor*- β – TGF- β) durchgeführt. Die verwendeten Kits sind unter Tabelle 7 aufgeführt.

Für den TGF- β -ELISA wurden 100 μ l der Proben zuvor mit 20 μ l 1 N HCl gemischt und 10 min bei RT inkubiert, um TGF- β zu aktivieren. Zur Neutralisation wurde 20 μ l 1,2 N NaOH zugegeben. Es wurden 50 μ l der Proben in das mit primären Antikörpern beschichteten Wells gegeben. Die weitere Detektion des aktiven TGF- β erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.3.2 Zytokin-Array

Unter Verwendung eines Zytokin-Arrays können relative Konzentrationen unterschiedlicher Zytokine parallel untersucht werden. Dazu wurde der Proteom ProfilerTM Human Cytokine Array Panal A der Firma R&D Systems verwendet. Es wurden 1 ml Cal29CM und 1 ml Medium der TAF, welches mit den Cal29CM 6 h kultiviert wurde, verwendet. Zu diesen Medien wurde ein Detektions-Antikörper Cocktail gegeben. Je eine Membran, auf welche Antikörper gegen 36 verschiedene Zytokine im Duplex gespottet waren, wurde mit dem Medien/Antikörper Cocktail inkubiert. Nach einer Inkubation mit Streptavidin-HRP konnten die Membranen mittels Chemolumineszenz analysiert werden (Abbildung 10). Dafür wurden sie mit dem Lumi-Light Western Blot Substrate inkubiert und die Signale in der G:Box von Synergene detektiert. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mit Hilfe der ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*) Software gemäß dem Protokoll des Array-Hersteller.

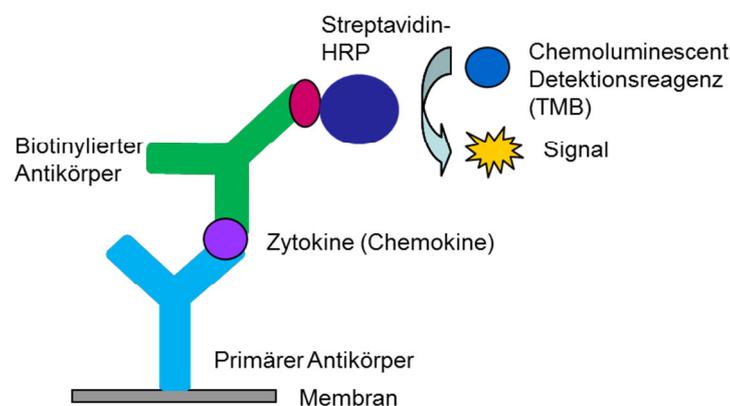


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Zytokin-Arrays bei gebundenem Zytokin und Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes durch Chemolumineszenz.

3.2.3.3 Intrazelluläre IL-8 Färbung und Analyse mittels Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie werden einzelne Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz analysiert. Die Zellen wandern in einem PBS Strom einzeln durch eine Kapillare und werden dabei einem Laserstrahl ausgesetzt, dessen Signal in einem Detektor ausgewertet wird (Abbildung 11). Die Größe der Zellen wird im FSC (*Forward Scatter*), die Granularität im SSC (*Side Scatter*) unterschieden. Auch die Fluoreszenz der Zellen kann im Durchflusszytometer detektiert werden. Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern kann so die Expression bestimmter Proteine in und auf den Zellen analysiert werden. Für die Messungen wurde ein Durchflusszytometer der Firma Partec verwendet und die Auswertung der Daten erfolgte mit der Cyflogic[®] Software.

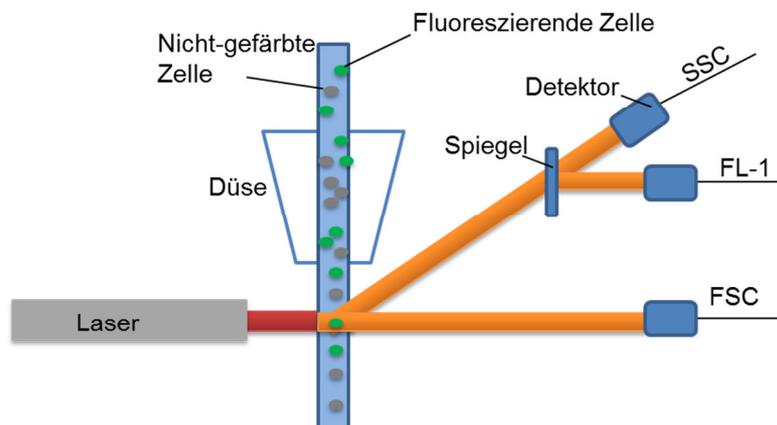


Abbildung 11: Aufbau eines Durchflusszytometers

Um die IL-8-Expression in den Zellen der Ko-Kultur zu untersuchen, wurden Cal29-Zellen und HFF in der „Boyden-Kammer“ kultiviert. Durch Zugabe von Monensin werden Zytokine daran gehindert am Golgi Apparat weiter transportiert zu werden und akkumulieren im Endoplasmatischen Retikulum. Somit kann die IL-8-Sekretion in das Medium vermindert werden, welche durch eine Ko-Kultur angeregt wurde. Die verstärkte IL-8-Expression kann nun durch eine intrazelluläre Färbung gemessen werden. Zunächst wurde 1,5 µl der Monensin-Lösung (1000x) zu dem Kulturmedium der Ko-Kultur gegeben. Nach vier Stunden Monensin-Behandlung wurden die Zellen abtrypsiniert und das Zellpellet mit 100 µl Cytofix/Cytoperm[™] (BD) resuspendiert und für 45 min bei 4 °C die Zellen fixiert und permeabilisiert. Es folgte ein zweifacher Waschschrift mit Saponin-Puffer (1 % Saponin), welcher aus 10 % Saponinstock verdünnt mit PBS hergestellt wurde. Danach erfolgte die Inkubation mit 10 µl des

FITC(Fluoresceinisothiocyanat)-gekoppelten IL-8-Antikörpers (Biolegend) oder einem IgG2b-FITC-Antikörper für 30 min bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit Saponin-Puffer wurden die Zellen in 2 ml PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.4 Fixieren von Zellen auf Objektträgern für die Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden 30.000 RT112-Zellen auf 8-Kammer-Objektträgern (BD) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Medien. Diese Medien wurden vier Tage lang jeden Tag frisch auf die Zellen gegeben. Nach dem vierten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Methanol-Aceton-Gemisch (1:1) für zwei Minuten fixiert. Nachdem der Objektträger getrocknet war, wurde er bis zur Verwendung in Aluminiumfolie bei -20 °C gelagert.

3.2.5 Immunhistochemie der RT112-Zellen

Die Immunhistochemie wurde im Labor der Klinik für Pathologie Jena in der Arbeitsgruppe von apl. Prof. Dr. Berndt nach dortigem Protokoll durchgeführt. Dabei handelt es sich um die indirekte Avidin-Biotin-Komplex Methode (*avidin-biotin complex-method* – ABC-Methode). Dazu wurde das REALTM Detection System, Alkaline Phosphatase/Red, Rabbit/Mouse der Firma Dako verwendet. Das gesuchte Antigen wird dabei durch einen primären Antikörper detektiert. An diesen Antikörper aus Maus oder Kaninchen bindet ein sekundärer biotinylierter Antikörper. An diesen Biotin-Molekülen können mehrere (Strept-)Avidin-Moleküle binden. Letztere sind wiederum mit der alkalischen Phosphatase konjugiert, welche das Substrat umsetzt und somit eine Farbreaktion hervorruft. Bei dem Substrat handelt es sich um ein Gemisch aus Chromogenen, welche ein sichtbar rotes Signal am Ort des Zielantigens liefert. Es wurden die Antigene Vimentin und E-Cadherin in den RT112-Zellen nachgewiesen, welche mit konditioniertem Medium der Tumor-assoziierten Fibroblasten und dem Makrophagen chemotaktisches Protein-1 (*monocyte chemotactic protein-1* – MCP-1) inkubiert wurden.

Zunächst wurde das Gitter vom fixierten Objektträger entfernt und dieser für 10 min mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween20 (TBS-T) inkubiert. Um zu verhindern, dass

endogenes Biotin detektiert wird, wurde zunächst ein Biotin-Avidin Block unter Verwendung des Biotin Blocking System der Firma DAKO garantiert. Dazu wurden die Zellen erst 10 min mit einer Avidin-Lösung und nach einem Waschschrift mit TBS-T 10 min mit einer Biotin-Lösung bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für 1 h bei RT. Die Antikörper wurden wie im Kapitel Material angegeben in Antibody Diluent Solution der Firma DAKO verdünnt. Die folgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt und es wurde darauf geachtet, dass sich die Antikörper-Lösung auf dem gesamten Zellrasen befand. Als Negativkontrolle wurde ein Objektträger mit Antibody Diluent Solution ohne primären Antikörper inkubiert. Die Antikörper-Lösung wurde durch 3maliges Waschen für 5 min mit TBS-T Puffer entfernt. Nun wurden die Objektträger mit den biotinylierten sekundären Antikörper für 30 min bei RT versetzt. Nach wiederholtem Waschen (3mal, 5 min) mit TBS-T wurde das alkalische Phosphatase-konjugierte Avidin zugegeben. Das Avidin konnte über Biotin an den sekundären Antikörper für 30 min bei RT binden. Nach drei Waschsritten á 5 min, folgte die Inkubation der Zellen mit den Chromogen-Ansatz (siehe Hersteller Angaben) für genau 7 min bei RT. Durch die Zugabe von Levamisol wurde die endogene Alkalische Phosphatase blockiert. Das Chromogen-Substrat führt zu einem roten Endprodukt an der Stelle des Zielantigens. Den Waschsritten mit TBS-T (3mal, je 5 min) folgte ein einmaliges Spülen mit Leitungswasser. Nach einer 1-minütigen Inkubation mit Hämatoxylin bei RT erfolgte ein Bläuen der Zellkerne im Leitungswasser (10 min bei RT). Zuletzt wurde der Objektträger mit erwärmter Glycerol-Gelatine und einem Deckglas eingedeckelt. Die Erstellung der Bilder erfolgte mittels eines Lichtmikroskops der Firma Zeiss und zugehöriger Kamera, sowie Software.

3.2.6 Proteinbiochemische Methoden

3.2.6.1 Bestimmung der Matrix-Metalloproteasen (*matrix metalloproteinases* – MMPs)-2 und -9 mittels Zymographie

Die Zymographie eignet sich als Methode um Proteasen nachzuweisen. Dazu wurde entweder Collagen oder Gelatine in ein SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-Trenngel gemischt (Tabelle 16). Die Proben wurden bevor sie elektrophoretisch aufgetrennt wurden, mit einem nicht-reduzierten zweifachen Probenpuffer gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Durch das SDS, welches sich in

Trenn- und Sammelgel befand, wurden die Proteasen in den Proben denaturiert. Dadurch wurde das aktive Zentrum der Proteasen in ihrer Pro- und aktiven Form frei. Nach der elektrophoretischen Auftrennung, wurde das Trenngel zweimal 15 min bei RT im Äquilibrierungs-Puffer inkubiert. Dieser Puffer beinhaltet das nicht-ionische Detergens Triton-X100, welches zur Renaturierung der Proteasen führt. Das Gel wurde daraufhin über Nacht im Inkubations-Puffer bei 37 °C schüttelnd gelagert, wodurch die Proteasen ihre enzymatische Aktivität ausführen konnten und entweder Gelatine oder Collagen im Gel umsetzen konnten. Dies wurde am nächsten Tag durch eine transparente Bande nach der Inkubation mit Entfärberlösung in dem mit Coomassie-Lösung gefärbten Gel sichtbar. Da Pro- und aktive Form ein anderes Molekulargewicht aufweisen, können sie gut unterschieden werden.

Tabelle 16: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Trenngels mit Gelatine oder Collagen und des Sammelgels für die Zymographie.

Zymographie-Gel Lösungen	1 Gel
Komponenten Trenngel	
40 % Acrylamid/0,8% Bis-Acrylamid	1,5 ml
1,5 M Tris-Puffer pH=8.8	1,86 ml
Aqua dest.	2,21 ml
Gelatine/Collagen-Lsg. [2 mg/ml]	1,86 ml
20 % SDS	37,5 µl
10 % APS	41,8 µl
TEMED	5,35 µl
Komponenten Sammelgel	
40 % Acrylamid/0,8 % Bis-Acrylamid	0,77 ml
0,5 M Tris-Puffer pH=6.8	2,5 ml
Aqua dest.	6,5 ml
20 % SDS	50 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	10 µl

3.2.6.2 Proteinisolierung und Konzentrationsmessung nach Bradford

Die Proteinextraktion aus den Zellen erfolgte mittels NP-40-Lysepuffer (Tabelle 17). Zunächst wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mittel Trypsin/EDTA abgelöst. Da Zellpellt wurde mit dem NP-40-Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis

inkubiert. Um eine vollständige Lyse der Zellen und Zellkerne zu garantieren wurde das Lysat viermal abwechselnd kurz in flüssigen Stickstoff (-196 °C) und bei 37 °C inkubiert. Nach dem Auftauen wurde das Lysat bei 8 °C für 10 min bei 16000|xlg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 17: Zusammensetzung des NP-40-Lysepuffers

NP-40-Lysepuffer	Volumen
NP-40 Puffer	400 µl
Protease-Inhibitor-Cocktail	75 µl
Phosphatase-Inhibitor-Mix	25µl

Zur Messung der Proteinmenge nach Bradford wurde ein Bradford-Reagenz der Firma Roth (Rothiquant[®]) verwendet (Bradford 1976). Dieses wurde 1:5 mit Wasser verdünnt. Es wurden 4 µl der Proteinprobe mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt und am Photometer NanoDrop[®] gemessen. Anhand einer Standardkurve, welche mittels bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt wurde, konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

3.2.6.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine

Um die Proteine hinsichtlich ihrer molekularen Größe aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde unter Verwendung des Mini-PROTEAN[®] Systems der Firma Bio-Rad zunächst das SDS-Polyacrylamid-Gel gegossen (Tabelle 18). Das SDS im Gel führt zur negativen Ladung der Proteine. Die Proteinproben (Lysate oder Kulturmedien) wurden mit 5-fach Ladepuffer gemischt. Durch das β-Mercaptoethanol im Ladepuffer werden die Protein-Disulfidbrücken gespalten. Nach einer Denaturierung der Proteine bei 95 °C für 5 min, wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Trenngel bei 500 mA und konstanten 180 V für 90 min im Laufpuffer. Bei jedem Gellauf wurde ein Proteingrößen-Standard Page-Ruler Plus[™] der Firma Fermentas mitgeführt.

Tabelle 18: Zusammensetzung eines 12 und 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Trenngels und des SDS-Polyacrylamid-Sammelgels

SDS-Polyacrylamid-Gel Lösungen	Spalte1	Spalte2
Trenngel	Volumen (12 %)	Volumen (15 %)
Aqua dest.	2,4 ml	2,1 ml
Trenngel-Puffer (2 M Tris-HCL) pH=8.0	2,0 ml	2,0 ml
Acrylamid (40 %)	3,1 ml	3,8 ml
Glycerin (40 %)	2,0 ml	2,0 ml
SDS (20 %)	50 µl	50 µl
APS (10 %)	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl
Sammelgel	Volumen	
Aqua dest.	2,0 ml	
Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris-HCL) pH=6.8	1,3 ml	
Acrylamid (40 %)	700 µl	
Glycerin (40 %)	1,0 ml	
SDS (20 %)	25 µl	
APS (10 %)	40 µl	
TEMED	10 µl	

3.2.6.4 Western-Blot und Immundetektion

Die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran wurde mittels vertikalem *Wet-Blot* Verfahren in einer Blot-Kammer der Firma Bio-Rad durchgeführt. Dazu wurden die Membran, sowie die verwendeten Filterpapiere und Schwämme zunächst mit Transfer-Puffer durchtränkt. Das Gel wurde dann auf die Membran gelegt und von Filterpapieren und Schwämmen umlagert. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen Membran und Gel vorhanden waren. Der Proteintransfer erfolgte bei 100 V und konstanten 300 mA für 90 min in Transferpuffer.

Zur Überprüfung des Transfers, wurden die Proteine mittels Ponceau-Lösung angefärbt. Danach erfolgte ein Wasch- und Blockschrift mittels Milchpuffer (TBS-T+ 5 % Milch-Pulver) für zweimal 30 min bei RT. Durch die Inkubation im Milchpuffer

können unspezifische Bindungen der Membran gesättigt werden. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min bei RT mit TBS-T Puffer gewaschen.

Die Immundetektion erfolgte durch Inkubation über Nacht schwenkend bei 4 °C mit dem primären Antikörper, welcher in Antikörper-Lösung verdünnt war. Die Angaben zur Antikörper-Verdünnung sind in Tabelle 10 aufgeführt. Nicht-gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für 5 min bei RT entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper. Auch dieser war in einer Antikörper-Lösung (sekundärer Antikörper 1:10000 in 10 ml TBS-T) verdünnt.

Nach Waschen der Membran 3x für 5 min bei RT, konnte die Antigen-Antikörper-Bindung mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden. Dazu wurden von dem Lumi-Light Western Blot Substraten die Komponenten (*Oxidizing Reagenz*, *Enhanced Luminol Reagenz*) zu gleichen Teilen gemischt und die Signale in der G:Box oder mit Hilfe eines X-Ray Films im Curix 60 detektiert. Danach wurde die Membran wieder mit TBS-T gewaschen und mit Milchpuffer für 1 h geblockt. Die Membran konnte dann entweder mit einem neuen primären Antikörper inkubiert, oder bei -20 °C gelagert werden.

3.2.7 Migration- und Invasionsstudien unter Verwendung der „Boyden-Kammer“

Da die Migration und Invasion der Tumorzellen unter Einfluss der Fibroblasten untersucht werden sollte, wurde das Ko-Kultursystem der „Boyden-Kammer“ gewählt (Abbildung 3.12). Hier war es möglich, die Fibroblasten (TAF oder HFF) in der unteren Kammer, welche der Größe eines 12-Well entspricht, anwachsen zu lassen. Es wurden 175.000 Fibroblasten-Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden 250.000 Tumorzellen (im serumfreien Medium) in die obere Kammer (Insert) eingesät, welche durch eine semipermeable Membran von den Fibroblasten getrennt war. Das Kulturmedium der Fibroblasten wurde ebenfalls durch serumfreies DMEM ersetzt. Die Membran mit einer Porengröße von 8 µm ermöglichte es den Tumorzellen zu den Fibroblasten in einer Zeitspanne von 18 h zu migrieren. Bei den Invasionsassays wurden zusätzlich Matrigel[®] (BD) 4 h vor der Tumorzellaussaat auf die Membran aufgetragen. Das Matrigel[®] ist ein synthetisches Gel, welches ein Äquivalent der Basalmembran darstellt. Die Invasion wurde nach 20 h ausgewertet, somit kann eine Proliferation der Tumorzellen während der Migrations- und Invasionsversuche ausgeschlossen werden. Die migrierten

oder invadierten Tumorzellen wurden auf der Unterseite des Inserts fixiert. Dazu wurde das Medium der Zellen entfernt und für ELISA oder andere Tests verwendet. Die Inserts wurden mit HEPES Puffer gewaschen. Danach wurden sie mittels eiskalter 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung für 10 min bei RT fixiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit destilliertem Wasser. Um die Zellen sichtbar zu machen wurden sie mit Hämatoxylin (DAKO) gefärbt. Dazu wurden in eine 12-Well Platte 1 ml Hämatoxylin gegeben und die Inserts hineingesetzt. Nach einer Zugabe von 500 μ l Hämatoxylin in das Innere des Inserts, erfolgte eine Inkubation von 5 min bei RT. Nach zweimaligem Waschen der Inserts mit warmem Leitungswasser, wurden die Zellkerne 10 min in wiederum warmem Leitungswasser gebläut. Die Zellen, welche sich noch auf der Oberseite der Membran befanden, wurden mit Hilfe eines Wattestäbchens entfernt. Die Inserts wurden zum Trocknen über Nacht im Dunkeln gelagert. Am nächsten Tag wurden die Membranen der Inserts mit Hilfe eines Skalpell vorsichtig entfernt und auf einem Objektträger, welcher mit Entellan benetzt war, fixiert und eingedeckelt.

Für die Auswertung wurden pro Membran drei Sichtfelder unter dem Lichtmikroskop gezählt und der Mittelwert gebildet. Jede Ko-Kultur wurde mindestens dreimal unabhängig durchgeführt.

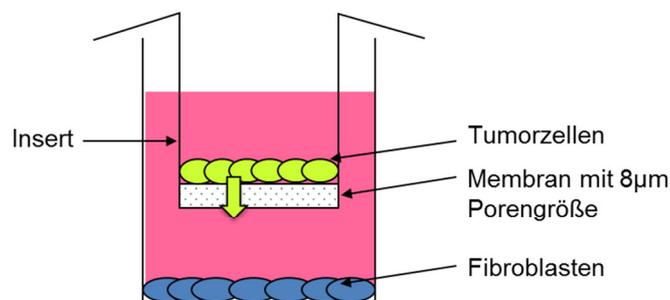


Abbildung 3.12: Aufbau der „Boyden-Kammer“ mit Fibroblasten und Tumorzellen

3.2.8 Migrationsanalysen mittels Wundheilungs-Assay

Eine weitere Methode, um die Migration der Tumorzellen zu analysieren, ist der sogenannte Wundheilungs- oder *Scratch*-Assay. Dafür wurden 300.000 Tumorzellen in 12-Well ausgesetzt und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde mit Hilfe einer 200 μ l Pipetten-Spitze ein Kreuz in den Zellrasen „gekratzt“ und das Medium abgenommen. Nach einem zweimaligen Waschschrift mit PBS, wurden die Zellen mit dem

Versuchsmedium inkubiert. Die Zellen konnten dann in den zellfreien Raum einwandern. Die Messung der Migration erfolgte mit der TScratch Software (CSElab).

3.2.9 Proliferationsassay (D10G4.1-Zellen)

Bei den D10G4.1-Zellen handelt es sich um eine murine Th2-Zelllinie, welche von einer AKR/J (H-2k) Maus isoliert wurde. Die Proliferation der Zellen kann durch IL-2, IL-1 α und IL-1 β stimuliert werden. Damit sollte untersucht werden, ob IL-1 von den Tumorzellen abgegeben wurde. Da es sich bei den D10G4.1-Zellen um Suspensionszellen handelt, welche IL-2 abhängig wachsen, wurden diese zentrifugiert und das Zellpellet in IL-2-freiem Medium resuspendiert. Dies wurde zweimal wiederholt. Danach wurden 10.000 Zellen pro Well in 40 μ l IL-2-freiem Medium in 96-Well ausgesetzt. Dazu wurden 60 μ l des Probenmediums gegeben und die Zellen vier Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Messung der Proliferation wurden die Suspensionszellen gut resuspendiert und 30 μ l der Lösung in eine weiße 96-Well Platte überführt. Nach Zugabe von 30 μ l der Cell Titer Glo[®] Lösung (Cell Titer Glo[®] Substrat + 10 ml Cell Titer Glo[®] Puffer) von der Firma Promega erfolgte eine Inkubation von 15 min bei RT. Die Lumineszenz wurde am Glomax[®] (Promega) gemessen.

3.2.10 Mycoplasmendetektion

Die Zellen wurden regelmäßig auf eine Infektion mit Mycoplasmen untersucht. Dazu wurden 100 μ l zellfreier Medienüberstand bei 95 °C für 5 min erhitzt. Es wurden 2 μ l dieser Probe zu einem PCR-Ansatz hinzugegeben, welches spezifische Mycoplasmen-Primer enthält. Nach Amplifikation der PCR-Produkte wurden diese auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Bei jeder PCR wurden eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt.

Tabelle 19: PCR-Programm der Mycoplasmen-PCR.

95 °C	10 min		
95 °C	30 sec	}	35 Zyklen
56 °C	30 sec		
72 °C	30 sec		
56 °C	1 min		
72 °C	3 min		
4 °C	∞		

4 Ergebnisse

4.1 Analyse von sekretierten Faktoren in der Ko-Kultur von Blasentumorzelllinien und Fibroblasten

Vom Harnblasenkarzinom ist bekannt, dass es meist in invasiven Tumoren, aber auch in einigen T1 Tumoren, zu einer Einwanderung von Fibroblasten kommt (Alexa et al. 2009). Die eingewanderten Fibroblasten fördern die Tumorprogression. Sie interagieren mit den Zellen des Tumorstromas, aber auch mit den Tumorzellen. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, neue Erkenntnisse über die Interaktionen der Tumorzellen und Fibroblasten im Blasenkarzinom auf molekularer Ebene zu erhalten. Um die Wirkung von Tumorzellen auf Fibroblasten zu untersuchen, wurden zwei Blasenkarzinom-Zelllinien mit unterschiedlichen Differenzierungsgrad (*Grading*) ausgewählt. Die „*low-grade*“ RT112-Zelllinie ist eine gut differenzierte Linie (Perabo et al. 2001), während Cal29 eine „*high-grade*“ de-differenzierte Zelllinie ist (Cattan et al. 2001). Beide Zelllinien können in Mäusen Tumoren initiieren. Sie unterscheiden sich stark in der Expression von E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin und Zytokeratin (Abbildung 13). In den immunhistochemischen Färbungen von Nora Rippaus ist deutlich zu erkennen, dass RT112-Zellen E-Cadherin exprimierten, Cal29-Zellen jedoch nicht (Nora Rippaus Masterarbeit, 2011). Cal29-Zellen zeigten dafür eine Expression der Proteine N-Cadherin und Vimentin, welche von den RT112-Zellen nicht gebildet wurden.

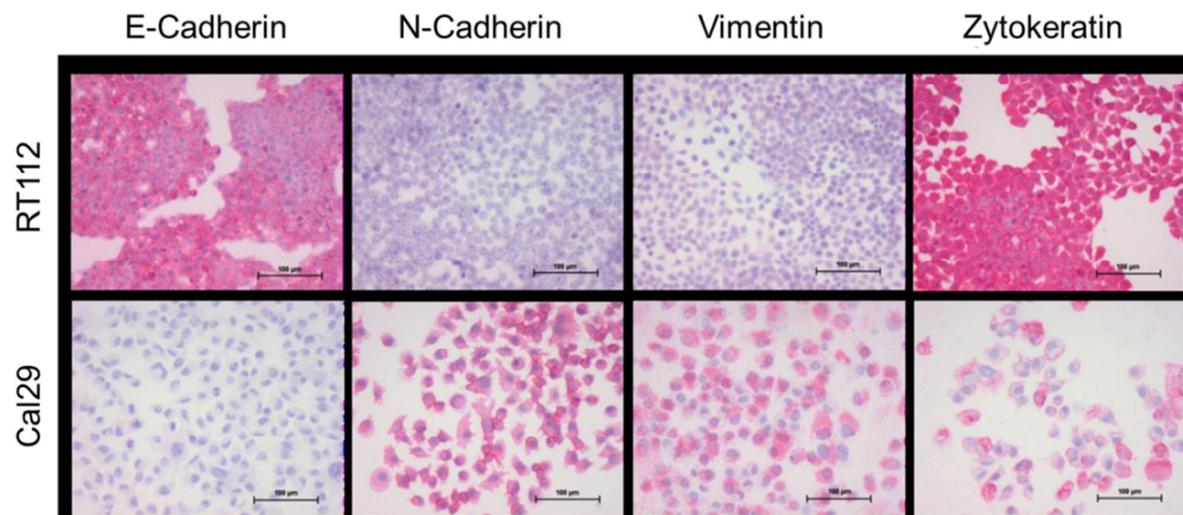


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung der Blasentumor-Zelllinien RT112 und Cal29.

Es wurden 20000 Zellen auf Objektträger ausgesät und fixiert. Die Färbung erfolgte mittels Antikörpern gegen E-Cadherin (1:750), N-Cadherin (1:750), Vimentin (1:1200) und Zytokeratin (1:500). Modifiziert nach Nora Rippaus, Masterarbeit 2011.

Um die Wirkung von Tumorzellen auf Fibroblasten zu untersuchen, wurden sowohl gesunde humane Vorhaut-Fibroblasten (*human foreskin fibroblasts* – HFF), als auch Blasentumor-assoziierte Fibroblasten (TAF) in dieser Arbeit verwendet. Beide Fibroblasten-Typen wurden von der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena (UKJ) zur Verfügung gestellt, wo diese vorher aus Biopsien im Rahmen von Tumorzystektomien (Isolierung TAF) bzw. Zirkumzisionen (Isolierung HFF) gewonnen wurden. Dabei unterscheiden sich HFF als nicht-aktivierter Fibroblasten-Typ im Expressionsspektrum der Proteine zu den TAF (Enkelmann et al. 2011). Somit könnten sie im Vergleich zu TAF auch andere Wirkungen auf Tumorzellen zeigen. Sie dienen in vielen Experimenten dieser Arbeit als Referenz.

4.1.1 IL-8-Expression in der Ko-Kultur

Interleukin (*interleukin-8* – IL)-8 ist in vielen Tumorentitäten verstärkt exprimiert. Im Harnblasenkarzinom wurden erhöhte IL-8-Expressionen und Konzentrationen im Urin gemessen (Reis et al. 2012, Sheryka et al. 2003). Um herauszufinden, ob IL-8 auch bei den Tumor-Stroma (Tumorzellen-Fibroblasten) Interaktionen im Blasenkarzinom eine Rolle spielt, wurden zunächst die IL-8-Konzentrationen in Ko-Kulturen von Tumorzellen und Fibroblasten mittels einer Enzym-gekoppelten Immunsandwich Technik (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA) bestimmt.

Bei den Ko-Kulturen handelte es sich um ein indirektes Zwei-Kammer-System. Wegen ihrer physischen Trennung durch eine Membran können beide Zelltypen nur über Faktoren interagieren, die in das Medium abgegeben werden. Die Fibroblasten wurden dazu in das untere Well (Kammer) der „Boyden-Kammer“ gesät und konnten dort 24 h anwachsen. Nachdem die Tumorzellen in die obere Kammer (Insert) eingesät wurden, wurde das Medium der Zellen durch serumfreies Medium (DMEM mit 0 % FKS) ersetzt. Die Verwendung des serumfreien Mediums hatte den Vorteil, dass die Wirkungen von Faktoren, welche sich im fötalen Kälberserum (FKS) befinden, eliminiert wurden. Nach 18 h Ko-Kultivierung wurden die Medien abgenommen, zentrifugiert und darin die IL-8-Konzentrationen bestimmt. Außerdem war es den Tumorzellen möglich durch die Membran des Inserts zu den Fibroblasten zu migrieren. Die Migration der Tumorzellen wurde in 3.4.1 untersucht.

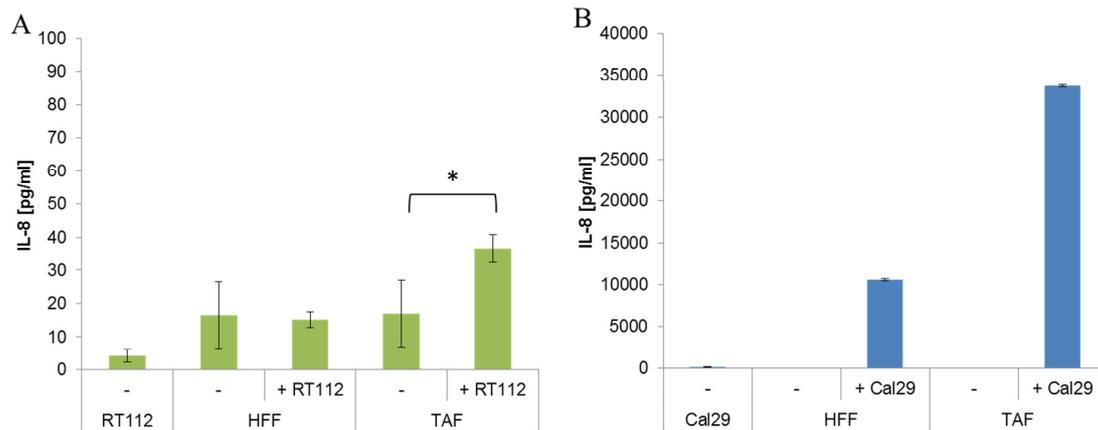


Abbildung 14: IL-8-ELISA Messung in Ko-Kulturen von Fibroblasten und Blasen tumorzellen (n=2). Tumorzellen und Fibroblasten wurden in separaten Kompartimenten der Boyden-Kammer zusammen kultiviert und das Medium nach 18 h Migration abgenommen und analysiert. Als Referenzen dienen Einzelkulturen der jeweiligen Zellen, welche ebenfalls in der Boyden-Kammer kultiviert wurden (A) Einzel- und Ko-Kultur RT112-Zellen und Fibroblasten (B) Einzel- und Ko-Kultur Cal29-Zellen und Fibroblasten.

IL-8 wurde von Cal29-Zellen ohne die Anwesenheit von Fibroblasten in höheren Konzentrationen produziert als von RT112-Zellen allein (Abbildung 14). Auch beide Fibroblasten-Typen produzierten im serumfreien Medium in Monokultur wenig IL-8, jedoch mehr als die RT112-Zellen. Die Ko-Kulturen von Tumorzellen mit TAF führten nach 18 h Migration zu einer Steigerung der IL-8-Abgaben in das Medium. Dabei wurde in der Ko-Kultur von Cal29-Zellen mit TAF über 30 ng/ml IL-8 gemessen, während in der Ko-Kultur von RT112-Zellen und TAF nur 0,035 ng/ml gemessen wurden. Trotz des eher geringen Wertes ist die IL-8-Konzentration im Medium dieser Ko-Kultur gegenüber dem TAF-Medium allein signifikant. In der Ko-Kultur der RT112 mit HFF wurde keine signifikant gesteigerte IL-8-Konzentration nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte in der Ko-Kultur von Cal29 und HFF auch eine vermehrte, wenn auch niedrigere Konzentration als in der TAF Ko-Kultur, IL-8-Sekretion gemessen werden.

Diese Ergebnisse zeigen klar, dass Ko-Kulturen von Blasenkarzinomzellen und TAF zu gesteigerten IL-8-Konzentrationen im Medium führen. Der Unterschied zwischen RT112- und Cal29-Zellen wird in der hohen IL-8-Konzentration der Ko-Kultur von Cal29 mit TAF deutlich. Zudem war in der Ko-Kultur von RT112-Zellen mit HFF keine gesteigerte IL-8 Sekretion, im Gegensatz zur Ko-Kultur von Cal29-Zellen mit HFF, erkennbar.

4.1.2 Analyse der IL-8-Expression in den einzelnen Zelltypen der Ko-Kultur

Um herauszufinden, in welchem Zelltyp in der Ko-Kultur von HFF mit Cal29-Zellen die IL-8-Expression erhöht vorliegt, wurde IL-8 in den Zellen mittels eines fluoreszierenden Antikörpers intrazellulär angefärbt und zytometrisch gemessen. Dafür wurde zu den Ko-Kulturen eine Stunde vor der Färbung 1,5 µl Monensin-Lösung gegeben. Monensin verhindert, dass Proteine in den Golgi Apparat exportiert werden und hemmt somit die IL-8-Abgabe ins Medium (Jung et al. 1993). Danach wurden die Zellen unter Verwendung von Cytofix/CytopermTM (BD) fixiert und permeabilisiert. So war es dem IL-8-FITC-Antikörper möglich, intrazellulär zu binden.

In der Monokultur der Zellen war kein IL-8-Signal zu erkennen (Abbildung 15). Die zytometrischen Messungen der Ko-Kultur jedoch zeigten ein leicht erhöhtes Signal der Cal29-Zelllinie und ein stärker erhöhtes Fluoreszenzsignal in den HFF. Da dieser Test als Vorversuch dienen sollte, wurde nur die Ko-Kultur der HFF mit Cal29-Zellen analysiert.

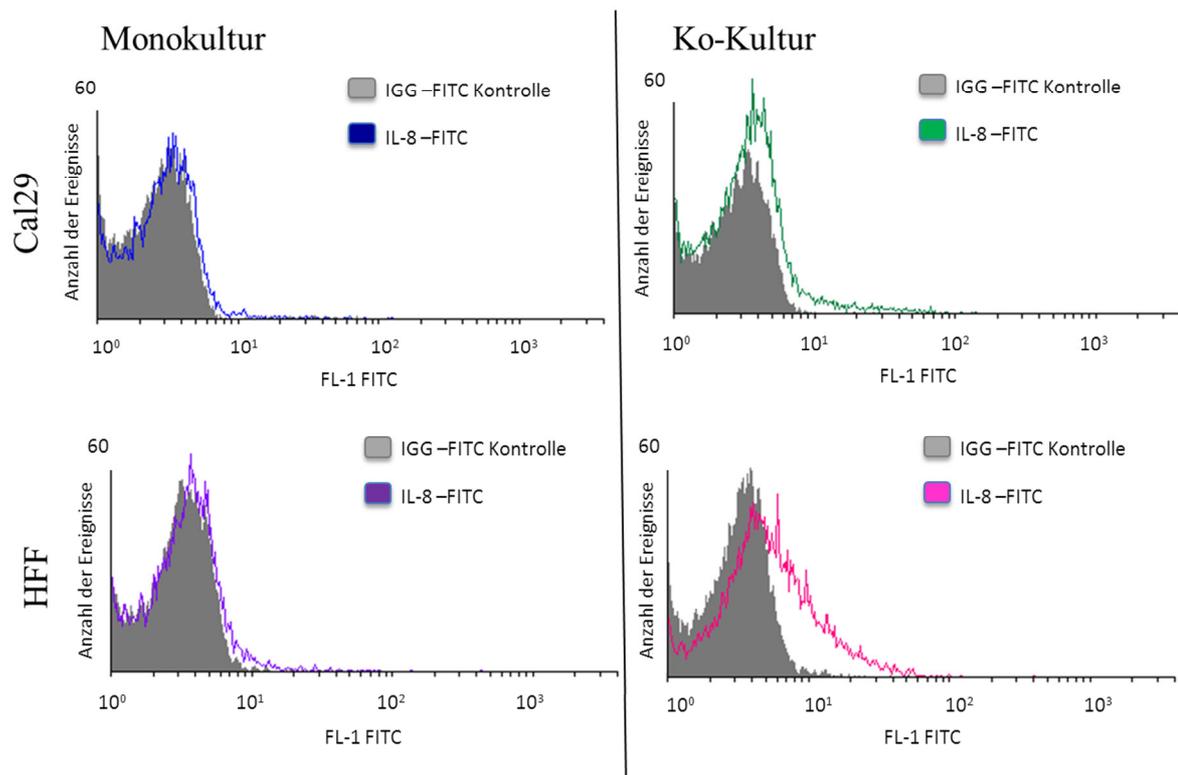


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Monokultur und Ko-Kultur von Cal29-Zellen und HFF. Die Zellen wurden abtrypsiniert und mit 1,5 µl Monensin 4 h behandelt. Danach wurde IL-8 intrazellulär mittels eines IL-8-FITC-Antikörpers gefärbt. Dargestellt ist die Anzahl der Ereignisse gegenüber der Fluoreszenz. Gezeigt wurde einer von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Diese Versuche zeigen, dass IL-8 hauptsächlich von Fibroblasten in der Ko-Kultur mit Blasentumorzellen abgegeben werden. Dies wurde in später folgenden Versuchen mittels ELISA genauer untersucht (siehe 3.2.1).

4.1.3 Expression von Matrix-Metalloprotease (*matrix metalloproteinase* – MMP)-2 und -9 in der Ko-Kultur von Tumorzellen und Fibroblasten

MMP-2 und -9 gehören zu den Proteinen mit möglichen pathologischen Funktionen, welche im Blasenkarzinom im Hinblick auf einen prognostischen Wert, viel untersucht sind. Nun sollte getestet werden, ob auch eine erhöhte Expression von MMPs in den Ko-Kulturen zu finden ist. Die Medien der Ko-Kulturen wurden nach 18 h Ko-Kultur und Migration zentrifugiert, auf ein SDS-Gel, welches zusätzlich Gelatine oder Collagen enthielt, aufgetragen und analysiert (n=2). Die Methode der Zymographie hat den Vorteil, dass sowohl die aktive als auch die inaktive Pro-Form von MMP-2 und -9 erkennbar sind. Dies wird ermöglicht durch SDS, welches sich in den Zymographie-Gel befindet und zur Freigabe des aktiven Zentrums der Pro- und aktiven Form der Proteasen führt.

Es waren erhöhte Pro-MMP-2 (72 kDa) Abgaben in der Ko-Kultur erkennbar (Abbildung 16). Sowohl TAF als auch HFF produzierten in Monokultur Pro-MMP-2. Die weniger maligne RT112-Zelllinie produzierte jedoch mehr Pro-MMP-2 als die Cal29-Zelllinie. Die densitometrische Auswertung ließ erkennen, dass die Ko-Kultur der Cal29-Zellen mit den HFF die höchste Konzentration von Pro-MMP-2 im Medium zeigte. MMP-9 war kaum bei den Ko-Kulturen nachweisbar.

Aus diesen Befunden wird deutlich, dass die Pro-MMP-2-Sekretion in der Ko-Kultur von Blasentumorzellen und Fibroblasten verstärkt ist. Welcher Zelltyp dafür verantwortlich ist, wurde in späteren Experimenten erforscht (siehe 3.2.2).

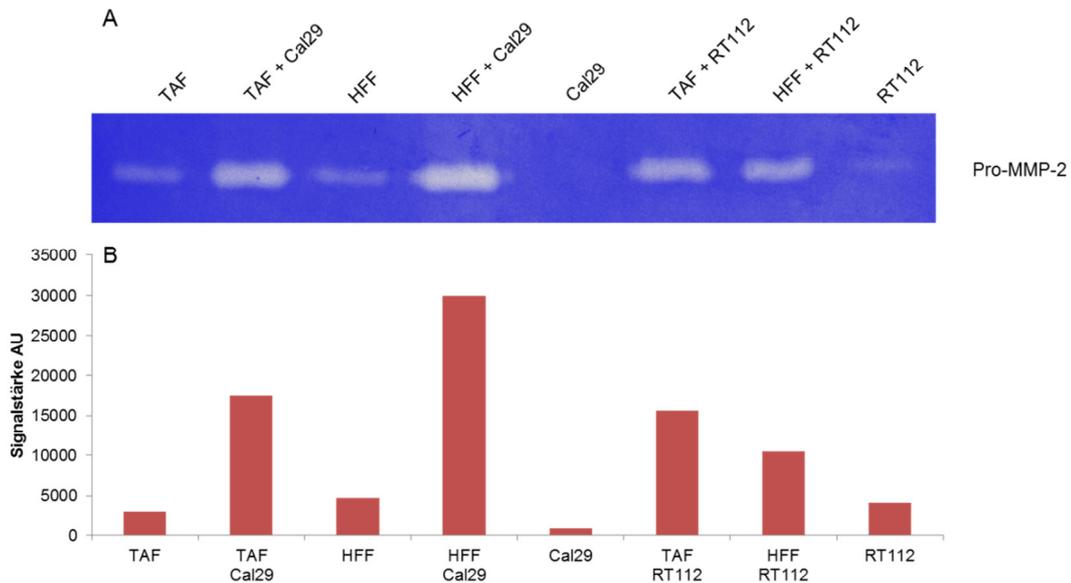


Abbildung 16: Pro-MMP-2-Sekretion von Monokulturen und Ko-Kulturen von Blasentumorzellen und Fibroblasten.

Es wurden 12 μ l Medium, mit 12 μ l Ladepuffer gemischt, auf ein Zymographie-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung und nachfolgende Entfärbung wurden Pro-MMP-2 Banden sichtbar. Diese wurden densitometrisch analysiert. (A) Zymographie der Medien der Boyden-Kammer Versuche nach 18 h Migration in der Ko-Kultur. (B) Densitometrische Auswertung der Zymographie mittel ImageJ Software. Gezeigt ist ein repräsentativer von zwei Versuchen.

4.2 Charakterisierung aktivierender Faktoren bei der Kommunikation zwischen Tumorzellen und Fibroblasten

Um die erhaltenen Ergebnisse der IL-8- und MMP-Sekretion der Ko-Kultur zu bestätigen, wurden Versuche mit konditionierten Medien (*conditioned medium* – CM) durchgeführt. Dieses Medium wird generiert, indem die Zellen nach konfluentem Wachstum 48 h in serumfreiem Medium kultiviert wurden. Nach einer Zentrifugation zur Entfernung von Zellresten wurde das Medium bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren, um den Abbau von Faktoren zu vermindern. Sowohl von den beiden Tumorzelllinien als auch von beiden Fibroblasten-Typen wurden konditionierte Medien hergestellt. Dies bedeutet für die anschließenden Versuche, dass z.B. TAF mit dem konditionierten Medium der RT112-Zellen (RT112CM) und dem Medium der Cal29-Zellen (Cal29CM) inkubiert wurden.

4.2.1 Einfluss von Faktoren aus Tumorzellen auf die IL-8-Sekretion durch Fibroblasten

Da die Konzentration der sekretierten IL-8-Proteine im Medium gemessen wurde, musste in Gegensatz zur Durchflusszytometrie kein Monensin zugegeben werden. Die Messung erfolgte mittels eines kommerziellen IL-8-ELISAs. Dafür wurden die Zellen jeweils 24 h mit den konditionierten Medien inkubiert. Als Kontrollen dienten serumfreies Medium und Medien der Fibroblasten, welche 24 h mit serumfreiem Medium inkubiert wurden. Sowohl beide Fibroblasten-Typen (24 h serumfrei), als auch beide Tumorzelllinien (48 h serumfrei) gaben IL-8 in das Medium ab. Dabei zeigte das konditionierte Medium der Cal29-Zelllinie die höchsten IL-8 Konzentrationen. Durch die Inkubation mit dem Medium der de-differenzierten Cal29-Zelllinie, aber auch mit dem Medium der wenig IL-8 exprimierenden RT112-Zelllinie war bei den TAF eine gesteigerte IL-8-Abgabe in das Kulturmedium erkennbar (Abbildung 17). Die IL-8-Konzentrationen im Medium der TAF, welche mit dem Cal29CM inkubiert wurden, stiegen um ein Vielfaches im Vergleich zu dem Medium der RT112CM-inkubierten TAF an. Auch die HFF wurden zur Abgabe von IL-8 durch das Medium der Cal29-Blasenzelllinie, jedoch nicht durch das Medium der RT112-Zellen, angeregt.

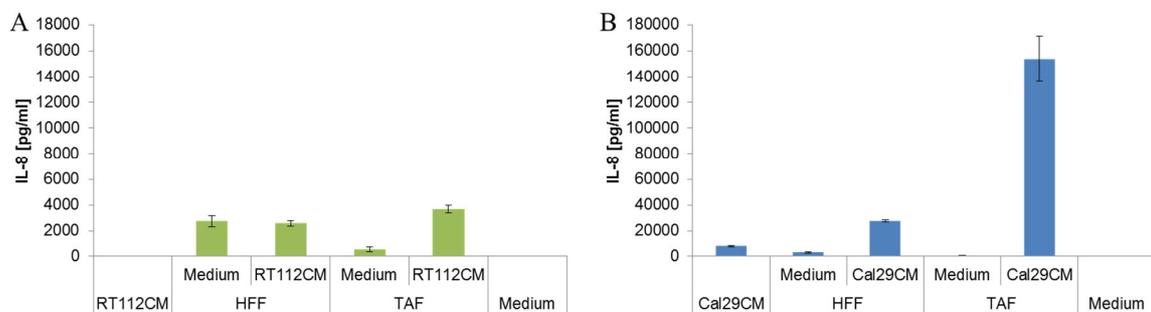


Abbildung 17: IL-8-ELISA der Medien von Fibroblasten inkubiert mit Tumor-konditionierten Medium. Fibroblasten wurden entweder in serumfreiem DMEM oder mit TumorCM 24 h inkubiert. (A) IL-8-Konzentrationen von RT112CM und von Fibroblasten-Medium inkubiert mit RT112CM. (B) IL-8-Konzentrationen von Cal29CM und von Fibroblasten-Medium inkubiert mit Cal29CM. Als Negativkontrolle diente serumfreies DMEM.

Diese Ergebnisse konnten zusätzlich im Western Blot bestätigt werden. Da es sich hier um Medium ohne FKS handelt, konnte keine Ladekontrolle angeführt werden (Abbildung 18). Für diesen Versuch wurde ein anderer IL-8-Antikörper (R&D Systems) verwendet als für die ELISA-Versuche. Allerdings zeigte sich hier eine leichte Bande in den HFF, welche mit

RT112CM inkubiert wurden. Ferner war zu erkennen, dass die Fibroblasten zu verstärkten IL-8-Abgaben durch das Cal29CM angeregt wurden.

Dies deutet darauf hin, dass sich im Medium von Blasen-tumorzellen mindestens ein Faktor befindet, der Fibroblasten zur IL-8-Sekretion anregt. Eine Auswahl solcher Tumorzellen-sekretierter Faktoren und deren Wirkung wurde in Abschnitt 3.3 untersucht.

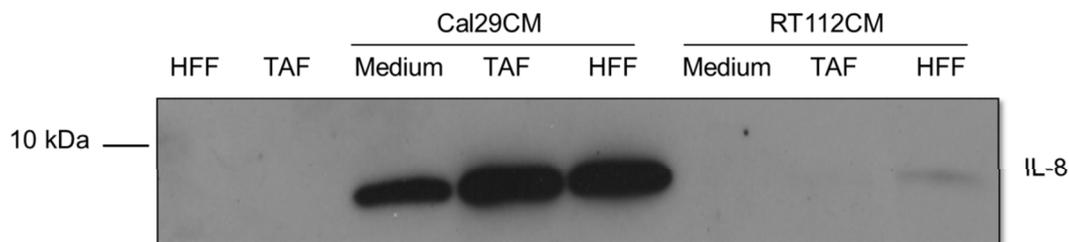


Abbildung 18: IL-8-Nachweis in Medien von Fibroblasten und konditionierte Tumormedien mittels Western Blot.

Fibroblasten wurden 24 h mit Tumor-konditionierten Medien inkubiert. Dieses Medium, sowie konditionierte Tumormedien und Medien von unbehandelten Fibroblasten wurden auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Überführen der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, erfolgte die Detektion des IL-8 mittels primären Anti-IL-8-Antikörper (1 ng/ml) und sekundären Anti-Maus-HRP-Antikörper (1:10000).

4.2.2 Effekt von Tumorzell-Faktoren auf die Fibroblasten-spezifische MMP-Expression

Um zu klären ob das Tumor-konditionierte Medium auch die MMP-Sekretion von Fibroblasten erhöhen kann, wurden mit den vorhandenen Proben weitere Zymographien durchgeführt. Es war zu erkennen, dass sowohl Fibroblasten als auch RT112-Zellen Pro-MMP-2 in das Medium abgeben (Abbildung 19A). Dabei konnten sowohl RT112CM als auch das Cal29CM die Aktivierung des Pro-MMP-2 im Medium der TAF initiieren. Gleichfalls war in den HFF eine Aktivierung durch das Tumor-konditionierte Medium der RT112, jedoch nicht durch Cal29CM, erkennbar. Lediglich die Pro-MMP-2-Sekretion konnte in den HFF durch Cal29CM erzielt werden. Die densitometrische Auswertung des Zymographie Gels mittels ImageJ Software ergab, dass beide Fibroblasten eine erhöhte Pro-MMP-2-Sekretion durch das RT112CM gegenüber dem Cal29CM aufwiesen (Abbildung 19B).

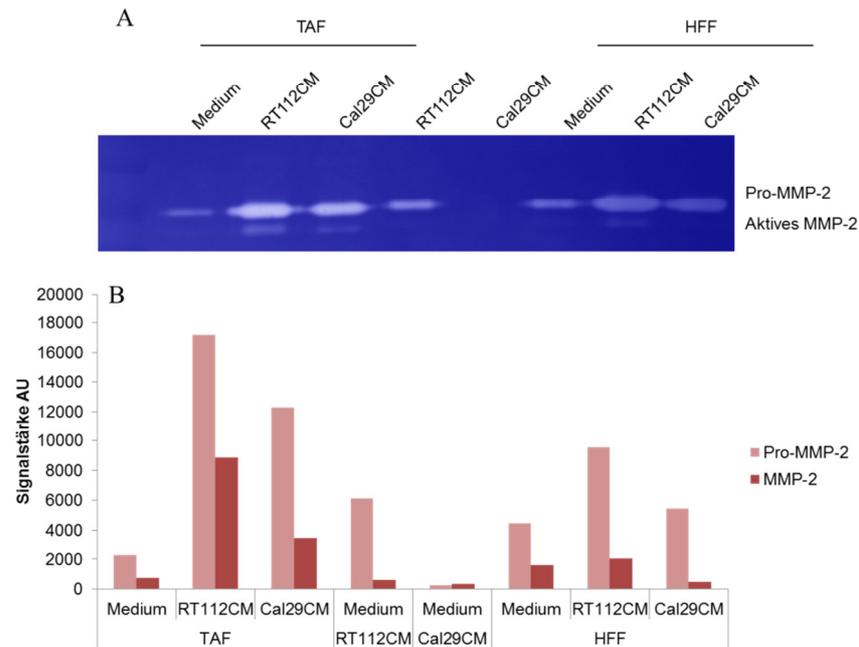


Abbildung 19: Zymographie der Medien der Fibroblasten inkubiert mit serumfreien Medium oder Tumor-konditionierten Medium für 24 h.

12 μ l Fibroblasten- und Tumormedium wurden 1:1 mit Ladepuffer gemischt und auf ein Zymographie-Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel mit Coomassie-Lösung gefärbt und mittels Entfärberlösung entfärbt. (A) Zymographie-Gel Coomassie gefärbt. (B) Densitometrische Auswertung der Pro- und MMP-2-Banden mittels ImageJ Software. Gezeigt ist einer von zwei repräsentativen Versuchen.

Eine weitere densitometrische Auswertung (Abbildung 20), hier wurden die Werte der konditionierten Medien abgezogen, zeigt ähnliche Werte der Fibroblasten hinsichtlich der Pro-MMP-2-Sekretion nach der Inkubation mit den Tumor-konditionierten Medien. Die aktiven MMP-2-Banden waren jedoch bei den Fibroblasten, welche mit den RT112CM inkubiert wurden, stärker als bei den Fibroblasten, inkubiert mit dem Cal29CM.

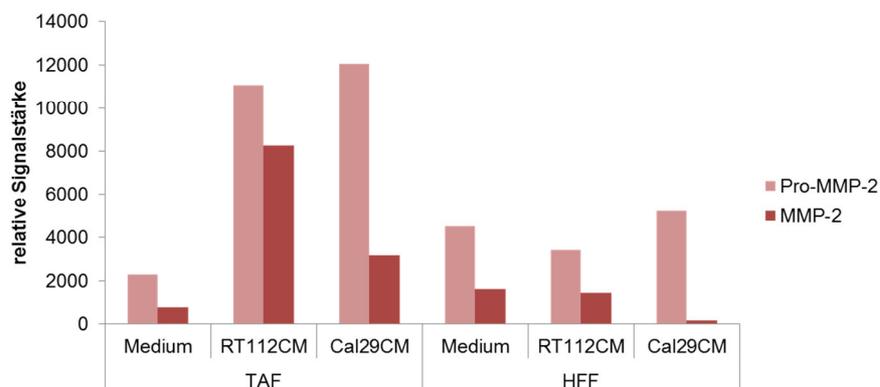


Abbildung 20: Relative Signalstärke der Pro- und MMP-2-Banden des Zymographie-Gels.

Den Signalstärke der Banden aus Abbildung 19 wurde die Signalstärke der Tumor-konditionierten Medien abgezogen und somit die relative Signalstärke ermittelt. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ Software.

Über die Funktion der Membran-Typ-1 MMP (*membrane type-1 matrix metalloproteinase* – MT1-MMP/MMP14) ist im Blasenkarzinom kaum etwas bekannt. Jedoch weiß man von anderen Tumorentitäten, dass es die Tumorprogression fördert und andere MMPs aktiviert. So kann MT1-MMP durch die Bildung eines Komplexes mit dem Gewebe-Inhibitor der MMP-2 (*tissue inhibitor matrix metalloprotease-2* – TIMP-2) ein Pro-MMP-2-Molekül aktivieren (Seiki et al. 2003).

Zunächst wurden Lysate von HFF, welche vorher mit beiden konditionierten Tumormedien 24 h inkubiert wurden, auf die MT1-MMP-Expression untersucht. Dabei war zu erkennen, dass in den HFF inkubiert mit Cal29CM die Expression von MT1-MMP nach 24 h erhöht ist (Abbildung 21 A). Auch die Inkubation der HFF mit den RT112CM erhöhte die Expression von MT1-MMP leicht. Diese Ergebnisse (n=2) wurden mit einer realtime-PCR (q-PCR) bestätigt (Abbildung 21 B). Die mRNA-Expression von MT1-MMP stieg in den HFF, welche mit Cal29CM inkubiert wurden, an. Es konnte jedoch keine Steigerung der Expression in den HFF, welche mit RT112CM inkubiert waren, erzielt werden. Da zu geringe Mengen von TAF vorlagen um Proteine im Western Blot nachzuweisen, kann hier nur das Ergebnis der q-PCR gezeigt werden. Die q-PCR der TAF Proben ergab, anders als erwartet, eine gleiche oder leicht verminderte MT1-MMP Expression der TAF nach Inkubation mit dem TumorCM.

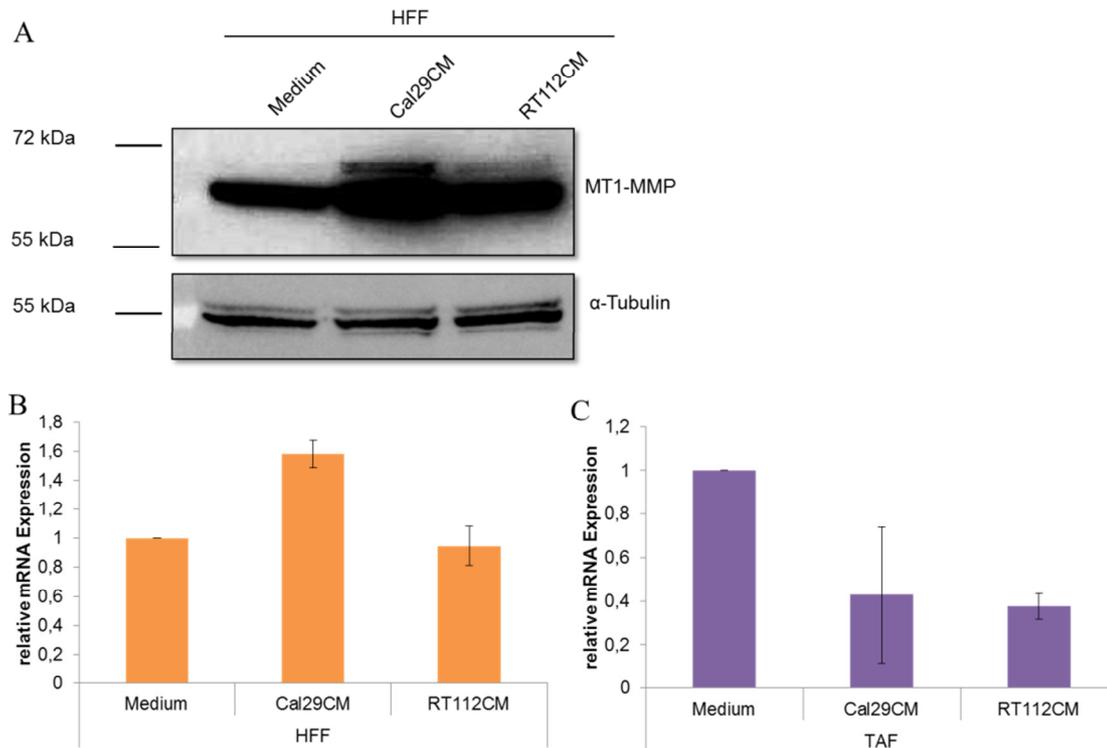


Abbildung 21: Western Blot-Analyse der MT1-MMP Expression von Fibroblasten.

(A) Western Blot-Detektion des MT1-MMP-Proteins in HFF. HFF wurden mit Tumor-konditionierten Medien 24 h inkubiert. Nach Zellyse wurde das Lysat auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen und auf eine Nitozellulosemembran geblottet. Als Bezugsprotein wurde α -Tubulin gewählt. Da die Bandenstärke der Proben gleich war, wurde eine adäquate Menge an Protein der drei Proben aufgetragen. (B) q-PCR der MT1-MMP in HFF (n=2) (C) q-PCR der MT1-MMP in TAF (n=2). Fibroblasten wurden mit Tumor-konditionierten Medien 24 h inkubiert, lysiert und mRNA gewonnen. Nach cDNA-Synthese wurde MT1-MMP-Expression mittels q-PCR gemessen und nach $\Delta\Delta$ CT-Methode ausgewertet.

Daraus lässt sich schließen, dass Pro-MMP-2 in Anwesenheit von Fibroblasten und TumorCM zu aktiven MMP-2 enzymatisch aktiviert wird. Dabei zeigte sich, dass HFF Pro-MMP-2 durch die Expression von MT1-MMP zu MMP-2 umsetzen. Bei den TAF ist zudem ein anderer Mechanismus der MMP-2-Aktivierung denkbar.

4.2.3 Identifizierung weiterer Fibroblasten-sekretierter Faktoren unter Tumorzell-Einfluss

Nach der Analyse der aus der Literatur bekannten im Blasenkarzinom auffälligen Faktoren IL-8 und MMP-2, sollten nun mittels eines Zytokin-Arrays weitere Fibroblasten-sekretierte Faktoren, die an der Tumorzellen-Fibroblasten Interaktion beteiligt sind, gefunden werden. Bei diesem Array sind Antikörper gegen 36 verschiedene Gene, sowie 3 Positivkontrollen jeweils als Duplikat als Dot Blot auf eine Membran aufgebracht. Die sich im Probenmedium befindenden Zytokine binden an den jeweiligen Antikörpern. Mittels eines

Mixes aus Biotin-gekoppelten sekundären Antikörpern und Streptavidin-HRP können die Zytokine-Antikörper Komplexe photometrisch sichtbar gemacht werden. Dieser Test konnte nur in einem geringen Umfang (4 Membranen) durchgeführt werden. Somit wurden das Medium der TAF, nachdem es mit Cal29CM inkubiert wurde und das dafür verwendete Cal29CM untersucht. Lediglich bei zwei Proteinen zeigte sich ein erhöhtes Signal auf der Membran, welche mit TAF Medium inkubiert wurde. Unter Verwendung der durchsichtigen Matrize (siehe Anhang Abbildung A 1) konnten die Signale den Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor* – GM-CSF) und den Makrophagen chemotaktisches Protein-1 (*monocyte chemotactic protein-1* – MCP-1) zugeordnet werden (Abbildung 22). Die TAF steigerten demnach die Abgabe beider Proteine nach der Inkubation mit dem Medium der Cal29-Zellen. Die densitometrische Auswertung zeigte eine 3fache Steigerung der Signale der behandelten Fibroblasten. Auf der Membran befanden sich auch Antikörper, welche an IL-8 binden können. Hier war jedoch kein (positives) Signal erkennbar. Auch TAF-CM (TAF 48 h in serumfreien DMEM) zeigte keine Signale auf dem Array bei beiden Proteinen (siehe Anhang Abbildung A 2).

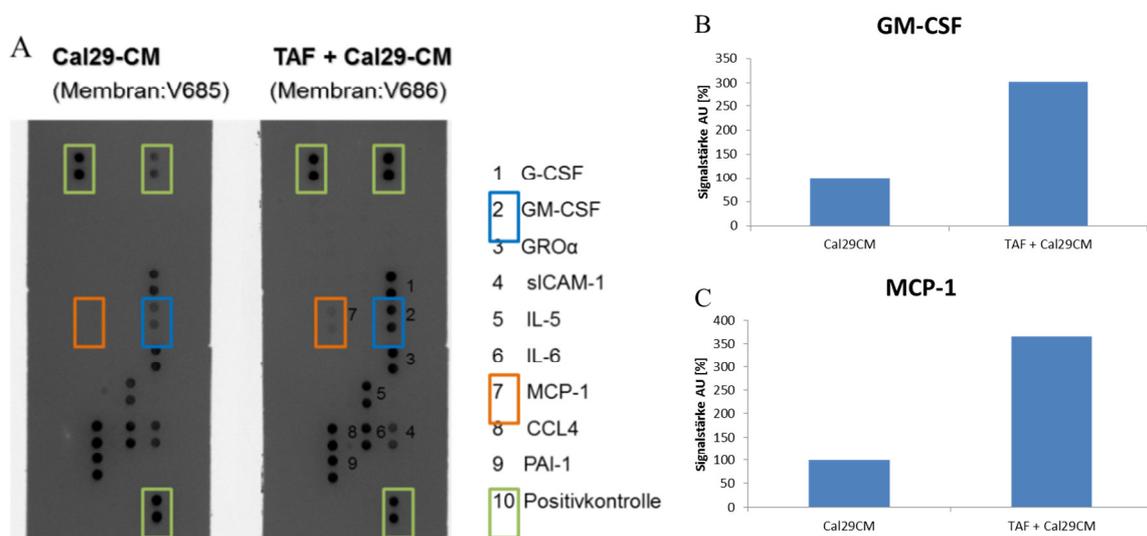


Abbildung 22: Zwei Membranen des Zytokin Arrays, wobei eine mit Cal29CM und eine weitere mit Medium der TAF, welches mit Cal29CM kultiviert war, inkubiert wurde.

Die Behandlung der Membranen erfolgte nach Herstellerangaben und die Auswertung geschah photometrisch. (B) Densitometrische Auswertung der GM-CSF und MCP-1 Spots der Membranen. Die Signalstärken der Spots der Membran, welche mit Cal29CM inkubiert wurde, wurden 100% gesetzt.

Die Validierung der Array Ergebnisse wurde mittels Polymerasen Kettenreaktion (PCR) durchgeführt und auch für die HFF getestet und semiquantitativ ausgewertet. Die GM-CSF

Expression konnte in den HFF nur durch das Cal29CM erhöht werden (Abbildung 23). In den TAF jedoch konnten die konditionierten Medien beider Tumorzelllinien die Expression von GM-CSF erhöhen (Abbildung 24). Bei dieser PCR wurde zunächst die RNA isoliert und in cDNA (*complementary* DNA) durch Reverse Transkription (RT) umgeschrieben. Nach der PCR wurden die Amplifikate auf ein 2 %iges Acrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde mittels des Farbstoffes Roti[®]-GelStain (Carl Roth) angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

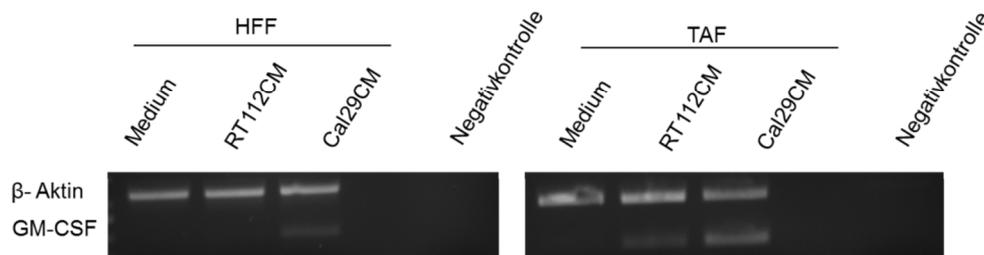


Abbildung 23: Nachweis der Produkte der GM-CSF-PCR.

Nachdem Fibroblasten 24 h mit TumorCM inkubiert wurden, konnte RNA isoliert und cDNA synthetisiert werden. Primer zur Amplifikation des GM-CSF- und des β -Aktin-Produkts (Ladekontrolle) wurden in einen Ansatz zu gleichen Teilen gemischt. Der Nachweis der Produkte erfolgte in einem 2 %igen Acrylamidgel. Als Negativkontrolle diente Wasser, welches statt cDNA zu dem Ansätzen gegeben wurde.

In den TAF konnte eine Expressionssteigerung von MCP-1 sowohl von Cal29CM als auch von RT112CM hervorgerufen werden (Abbildung 24). Jedoch zeigte sich keine Expressionserhöhung in den HFF. Die MCP-1-Bande erscheint jedoch stärker als die der TAF. Hier wurden getrennte PCR-Versuche durchgeführt, jedoch mit der gleichen cDNA. Auch hier waren gleiche Mengen des β -Aktin-Genprodukts zu erkennen. Die Negativkontrolle enthielt den gleichen Ansatz wie die Proben, jedoch keine cDNA.

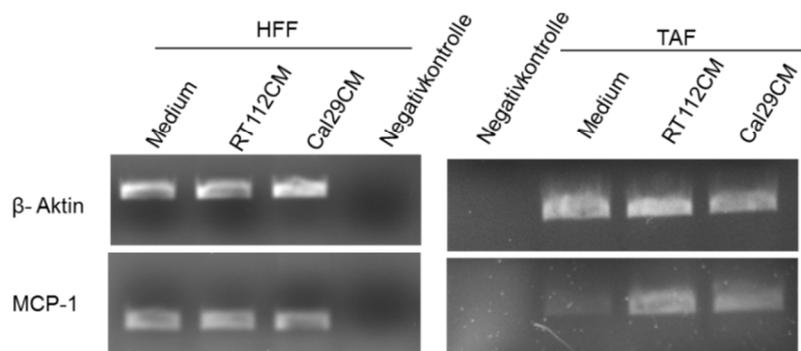


Abbildung 24: Nachweis der Produkte der MCP-1 und β -Aktin PCR.

Fibroblasten wurden 24 h mit TumorCM inkubiert. Die daraus synthetisierte cDNA wurde durch RT generiert. Die PCR mittels spezifischer Primer für MCP-1 und β -Aktin führte zur Amplifikation der Produkte. Die Auftrennung der Produkte erfolgte in einem 2%igen Acrylamidgel. Als Negativkontrolle diente Wasser, welches statt cDNA zu dem Ansätzen gegeben wurde.

Die Array- und PCR-Versuche zeigten, dass GM-CSF und MCP-1 von Fibroblasten sekretiert und exprimiert werden. Dabei konnte GM-CSF-Expression durch TumorCM Medium in TAF gesteigert werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass IL-8 und Pro-MMP-2 sowohl von HFF als auch von TAF sekretiert wurden. Die IL-8-Sekretion der TAF konnte durch Cal29CM und RT112CM erhöht werden. Die HFF konnten jedoch nur durch die Inkubation mit Cal29CM zur verstärkten IL-8-Sekretion angeregt werden. Die Aktivierung von MMP-2 in den Fibroblasten wurde durch RT112CM mehr verstärkt als durch Cal29CM. TAF wurden zudem stärker von den Tumorzellen angeregt Pro-MMP-2 zu sekretieren als HFF. Das Medium der TAF, welche mit Cal29CM inkubiert wurden, zeigte im Zytokin-Array ein gesteigertes Signal bei den Proteinen GM-CSF und MCP-1. Dies konnte durch Analyse der mRNA-Expression beider Proteine bestätigt werden. Zudem führte die Inkubation mit RT112CM zu einer erhöhten GM-CSF-Expression in TAF, jedoch nicht in HFF.

4.3 Untersuchungen der Fibroblasten-Aktivierung durch Tumorzell-sekretierte Faktoren

Aus den vorangegangenen Daten wurde ersichtlich, dass Tumorzellen eine verändernde Wirkung auf die Genexpression und Proteinsekretion der Fibroblasten ausüben. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Faktoren wie transformierender Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor- β* – TGF- β), IL-1 β , Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor* – FGF), und Blutplättchen-Wachstumsfaktor (*platelet-derived growth factor* – PDGF) von den Tumorzellen abgegeben werden und Fibroblasten aktivieren können (Übersichtsartikel Cirri und Chiarugi et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde sich zunächst auf die Faktoren TGF- β und IL-1 konzentriert.

4.3.1 Expressions-Quantifizierung Tumorzell-spezifischer Zytokine

4.3.1.1 Bestimmung der Expression von TGF- β in Tumorzellen

Um die TGF- β Expression der Tumorzellen zu messen, wurden die konditionierten Medien der Tumorzellen mittels ELISA gemessen. Es ergab sich eine viel höhere TGF- β Konzentration in den Cal29CM gegenüber dem RT112CM (Abbildung 25).

Nach 72 h Inkubation der Tumorzellen mit den FibroblastenCM konnte die TGF- β Abgabe nur in den Cal29-Zellen, jedoch nicht in den RT112-Zellen gesteigert werden (Daten nicht gezeigt).

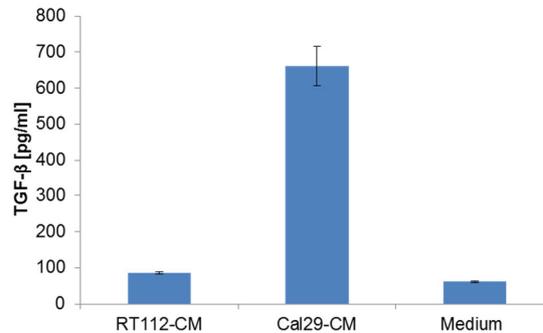


Abbildung 25: ELISA-Messung der TGF- β Konzentrationen.

Tumorzellen wurden 48 h in serumfreien DMEM kultiviert. TGF- β wurde in den Proben aktiviert und 50 μ l der Proben in Wells gegeben. Durch Zugabe des sekundären Antikörpers und Streptavidin-HRP konnte das Substrat umgesetzt und die Signale detektiert werden. Als Kontrolle diente serumfreies DMEM (Medium).

Aus den ELISA-Ergebnissen wird ersichtlich, dass RT112- und Cal29-Zellen TGF- β sekretieren. Somit wurde in späteren Versuchen TGF- β als Fibroblasten-Stimulanz verwendet (siehe 3.3.2).

4.3.1.2 Bestimmung der Expression von IL-1 in Tumorzellen

IL-1 α und IL-1 β können die Expression und Abgabe von IL-8 und anderen Zytokinen in Fibroblasten anregen (Schauer et al. 2013, Tjomsland et al. 2011). Aus diesem Grund wurde mittels eines Bioassays die Expression von IL-1 in den Medien der Ko-Kulturen und der Monokulturen getestet. Dazu wurden murine T-Helfer Zellen D10G4.1 (D10-Zellen) verwendet. Die Proliferation der Zellen kann durch IL-2 und geringe Konzentrationen von IL-1 α und IL-1 β angeregt werden.

Der Proliferationsassay wurde wie in 2.2.7 beschrieben durchgeführt und die Lumineszenz wurde in relativen Lichteinheiten (*relative light units* – RLU) gemessen.

Zur Validierung der Ergebnisse wurde eine IL-1 β Standardreihe mit rekombinantem humanen IL-1 β mitgeführt (Abbildung 26). Cal29CM zeigte ein hohes Lumineszenzsignal und konnte somit eine starke Proliferation der D10-Zellen auslösen, während RT112CM nur eine leichte Proliferationssteigerung gegenüber dem Kontrollmedium (serumfreies DMEM) erzielte (Abbildung 27 A,B). Medium der HFF und TAF sowie serumfreies

DMEM konnten die Proliferation der D10 Zellen nicht anregen. Fibroblasten, welche mit Tumor-konditioniertem Medium inkubiert wurden, zeigten wiederum eine Proliferationssteigerung der murinen T-Zellen.

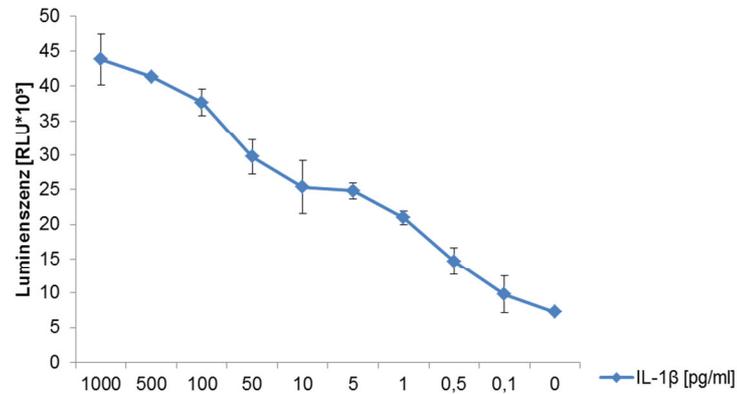


Abbildung 26: Proliferation der D10G4.1 Zellen nach vier Tagen Inkubation mit 0 bis 1000 pg/ml IL-1 β . 10.000 D10G4.1 Zellen wurden pro Well in 40 μ l Medium ausgesät. Dazu wurde 60 μ l Medium mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinanten IL-1 β gegeben. Nach vier Tagen bei 37 °C Inkubation wurde die Proliferation der Zellen mittels Cell Titer Glo[®] Lösung durch Messung am Glomax[®] bestimmt.

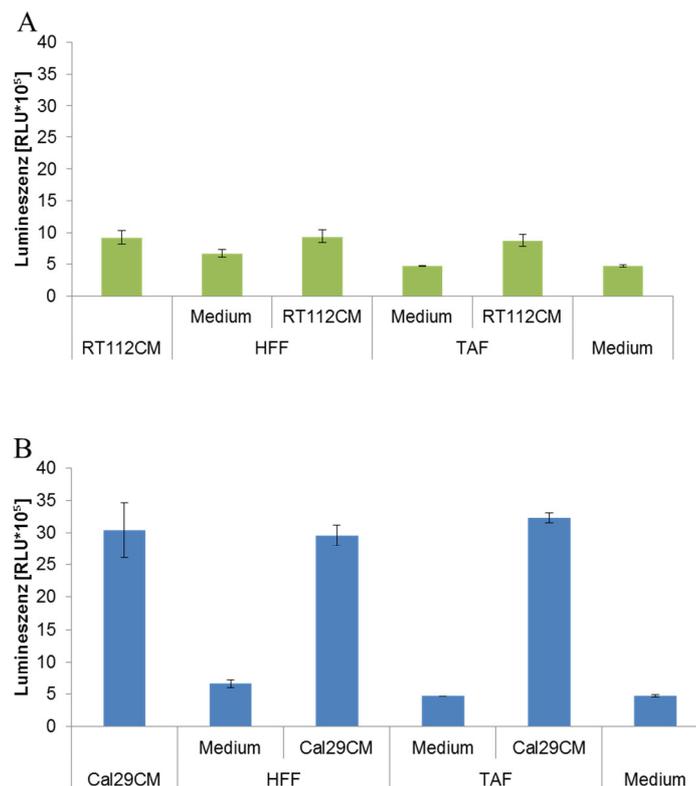


Abbildung 27: Proliferation der D10G4.1 Zellen nach vier Tagen Inkubation mit den Medien der behandelten Fibroblasten, den Tumor-konditionierten Medien (RT112CM, Cal29CM) und Kontroll-Medium (DMEM ohne FKS).

Es wurden 10000 D10G4.1 Zellen in 40 μ l Medium ausgesät und mit 60 μ l Probenmedium inkubiert. Die Messung der Proliferation der Zellen erfolgt nach Zugabe von Cell Titer Glo[®] Lösung mit Hilfe des Glomax[®].

Um zu klären, ob es sich um IL-1 α oder IL-1 β handelt, wurde zunächst mittels PCR die Genexpression überprüft. Sowohl IL-1 α , als auch IL-1 β wurde von den Tumorzellen exprimiert (Abbildung 28). Die IL-1 β -Expression war nicht in den Cal29- und RT112-Zellen, welche mit FibroblastenCM inkubiert wurden, erhöht. Als Negativkontrolle wurde nur der Mastermix ohne cDNA verwendet. Anschließend wurden mittels ELISA die IL-1 α und - β -Abgabe gemessen sowie die Ergebnisse des Bioassays und der PCR überprüft.

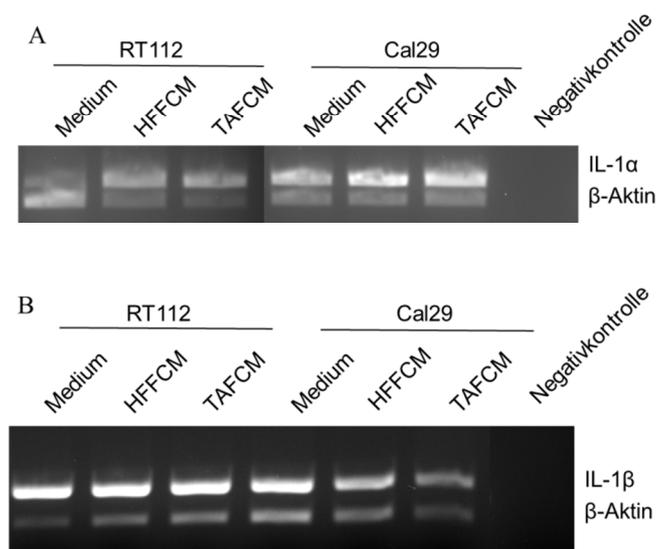


Abbildung 28: PCR-Nachweis der Expression von IL-1 α und - β von Tumorzellen. Tumorzellen wurden 24 h mit FibroblastenCM inkubiert und danach die mRNA isoliert. Durch reverse Transkription wurde die cDNA gewonnen. Mit Hilfe spezifischer Primer erfolgte die Amplifizierung von IL-1 α und - β , sowie β -Aktin. Die PCR-Produkte wurden auf einen 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. (A) Expression von IL-1 α und β -Aktin von Tumorzellen (B) Expression von IL-1 β und β -Aktin von Tumorzellen. Als Negativkontrolle diente der jeweilige PCR-Ansatz ohne cDNA.

Der IL-1 β -ELISA ergab geringe Werte beider TumorCM (Abbildung 29). Die Cal29-Zellen zeigten eine IL-1 β Sekretion von ca. 20 pg/ml in das serumfreie Medium nach 48 h. Betrachtet man die Konzentration von IL-1 β im Medium allein, so ist hier nur eine kleine Steigerung der Abgabe zu erkennen. Im RT112CM ist die IL-1 β Konzentration gleich der des Mediums und somit scheinen RT112 kaum IL-1 β abzugeben.

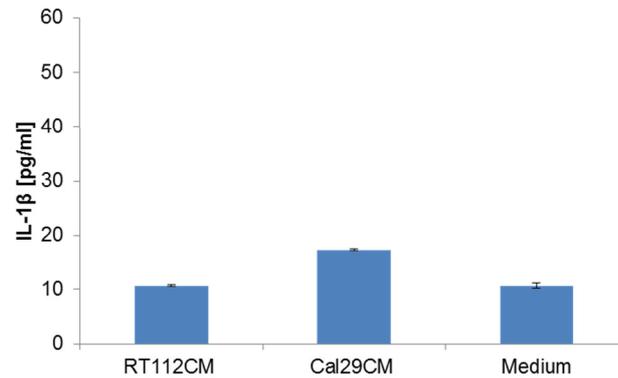


Abbildung 29: IL-1 β -Konzentration in den Tumor-konditionierten Medien und im serumfreien Medium. Dazu wurden primäre Anti-IL-1 β -Antikörper an ELISA-Platten immobilisiert. Nach Inkubation mit 100 μ l Tumormedium wurden die gebundenen Proteine mittels sekundären Antikörper gebunden. Nach Inkubation mit Streptavidin-Biotin konnte das Signal des gebundenen, umgesetzten TMB-Substrats gemessen werden. Die Werte wurden jeweils doppelt bestimmt.

Mittels IL-1 α -ELISA wurde im konditionierten Medium von Cal29-Zellen eine Menge von ca. 52 pg/ml gemessen (Abbildung 30). In den RT112CM konnte jedoch nur eine geringe Menge (ca. 6 pg/ml nach Abzug des serumfreien Mediums) nachgewiesen werden. Dies spiegelt das Ergebnis des Proliferationsassays der D10-Zellen wieder. Auch im serumfreien DMEM-Medium (Medium) wurde eine geringe Menge an IL-1 α gemessen. Die Konzentration ist jedoch geringer als die von IL-1 β . Eine verstärkte Abgabe von IL-1 α durch die Kultivierung der Tumorzellen mit Fibroblasten-konditioniertem Medium konnte jedoch nicht gezeigt werden (Abbildung 30 B). Im TAFCM ist die Menge an IL-1 α geringer als im HFFCM.

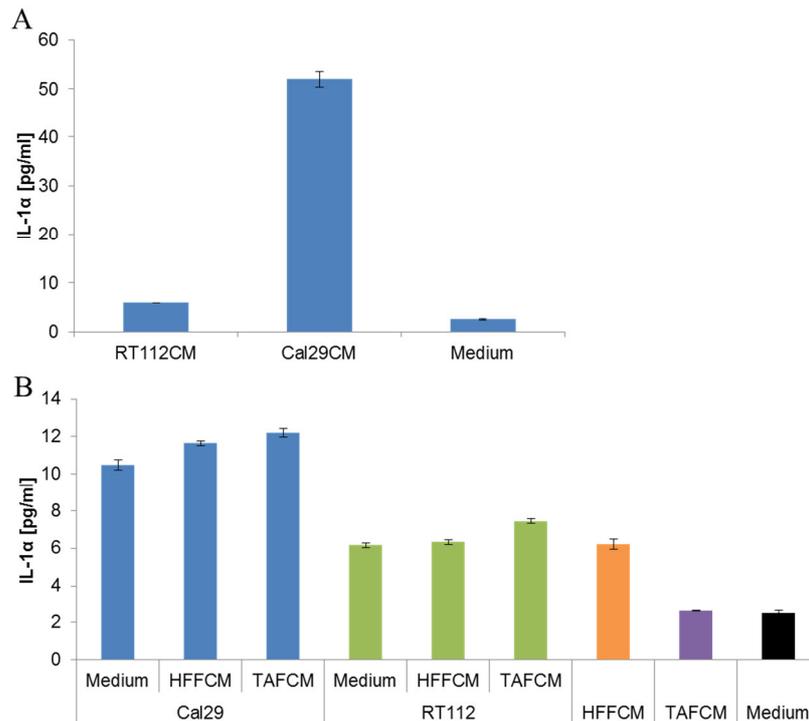


Abbildung 30: ELISA-Messungen der IL-1 α -Konzentration von Tumorzellen.

Es wurden Wells mit primären IL-1 α -Antikörper beschichtet. Nach Zugabe von 100 μ l Probe konnte das sich darin befindende IL-1 α an den Antikörper binden. Die Detektion des Proteins erfolgte durch Bindung eines sekundären Biotin-gekoppelten Antikörpers und Steptavidin-HRP, nach Umsetzung des TMB-Substrats. (A) IL-1 α -Konzentrationen der Tumor-konditionierten Medien nach 48 h. (B) IL-1 α -Konzentrationen der behandelten Tumorzellen nach 24 h und der Fibroblasten-konditionierten Medien nach 48 h. Als Kontrolle diente serumfreies DMEM.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Faktoren TGF- β , IL-1 α und - β von Blasen-tumorzellen exprimiert, jedoch nur TGF- β und IL-1 α in effektiven Konzentrationen sekretiert werden. Somit wurde für die folgenden Versuche TGF- β und IL-1 α zur Stimulation der Fibroblasten verwendet.

4.3.2 Funktionelle Effekte von Tumorzell-sezernierten Faktoren auf Fibroblasten

Da gezeigt werden konnte, dass sowohl IL-1 α als auch TGF- β von beiden Blasenkarzinomzelllinien sezerniert wurden, sollte nun deren Wirkung auf die Fibroblasten getestet werden. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse mit den Fibroblasten-Kulturen wurden IL-8 (ELISA) und MMP-2 (Zymographie) für die Testsysteme ausgewählt. Die Fibroblasten wurden mit rekombinanten IL-1 α und TGF- β , welche in Hungermedium (DMEM + 1% FKS) verdünnt waren, 24 h inkubiert. Daraufhin wurde das Medium abgenommen, zentrifugiert und getestet.

4.3.2.1 IL-8 Sekretion durch Fibroblasten nach IL-1 α und TGF- β Stimulation

Die Inkubation der Fibroblasten mit 10 ng/ml TGF- β führte nicht zu gesteigerten IL-8-Abgaben (Abbildung 31). Im Gegensatz dazu löste bereits 0,1 ng/ml rekombinantes IL-1 α eine erheblich gesteigerte IL-8-Sekretion der Fibroblasten aus. Zudem war zu erkennen, dass die HFF durch Inkubation mit 1 und 10 ng/ml sogar größere Mengen an IL-8 abgaben, als die TAF. Die Kombination von TGF- β und IL-1 α führte jedoch nicht zu einer Steigerung der IL-8-Konzentration im Medium.

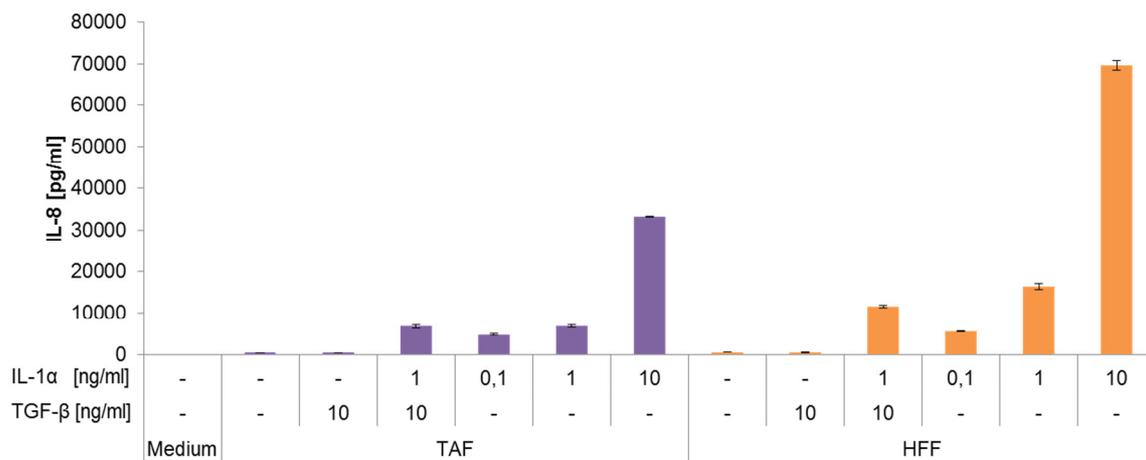


Abbildung 31: IL-8-Sekretion der HFF und TAF nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinanten IL-1 α und/oder TGF- β .

Nachdem die primäre Anti-IL-8-Antikörper an den ELISA-Platten gebunden hatte, wurden diese mit 100 μ l Fibroblasten-Medium inkubiert. Sich im Medium befindendes IL-8 wurde mit einem biotinolyten sekundären Antikörper gebunden. Durch Zugabe von Streptavidin-HRP und TMP-Substrat erfolgte die Detektion des Signals. Die Werte wurden jeweils doppelt bestimmt.

Aus der Analyse der IL-8-Konzentrationen wird deutlich erkennbar, dass (Tumorzell-sekretiertes-) IL-1 α und nicht TGF- β die IL-8-Sekretion der Fibroblasten anregt.

4.3.2.2 Induktion der Sekretion von MMPs in Fibroblasten durch IL-1 α und TGF- β

Im Kolonkrebs kann TGF- β die Expression von MMP-2 und MMP-9 in TAF erhöhen (Hawinkels et al. 2014). Um herauszufinden, ob dies auch bei Blasen-tumor-assoziierten Fibroblasten der Fall ist, wurden die Fibroblasten mit TGF- β und IL-1 α inkubiert und die Überstände mittels Zymographie auf MMP-Expression und Aktivierung untersucht.

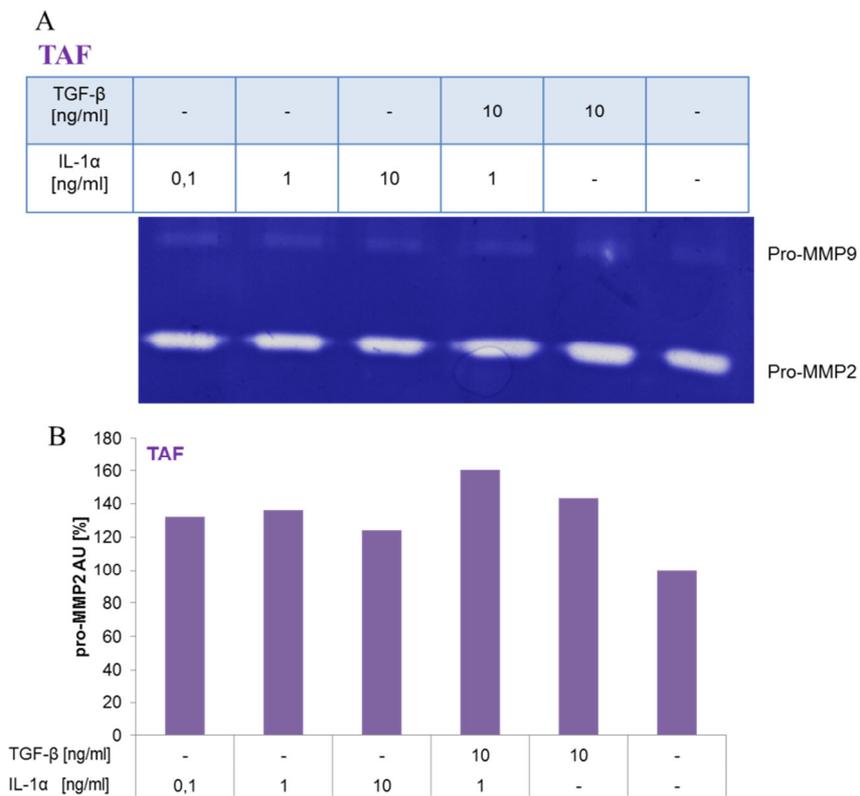


Abbildung 32: Zymographie von TAF inkubiert mit IL-1 α und TGF- β .

Die Fibroblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinanten IL-1 α und/oder TGF- β für 24 h inkubiert. Diese Medien wurden auf ein Zymographie-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung mit Coomassie-Lösung erfolgte die Entfärbung, wodurch durchsichtige Pro-MMP-2-Banden sichtbar wurden. Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels ImageJ. Medium ohne rekombinantes Protein wurde 100 % gesetzt und die Werte der inkubierten Medien darauf bezogen. (A) Zymographie-Gel Coomassie gefärbt (B) Densitometrische Auswertung des Zymographie-Gels von Medien der TAF. Es ist ein typisches Experiment von 2 unabhängigen Versuchen dargestellt (n=2).

Die Inkubation mit rekombinanten TGF- β und IL-1 α konnte die Abgabe des Pro-MMP-2-Proteins in beiden Fibroblasten-Typen erhöhen (Abbildung 32 und Abbildung 33). Zusätzlich scheint IL- α (10 ng/ml) in den HFF die MMP-9-Abgaben zu verstärken. Aktivierte MMP-2-Banden wurden mittels Zymographie nicht nachgewiesen.

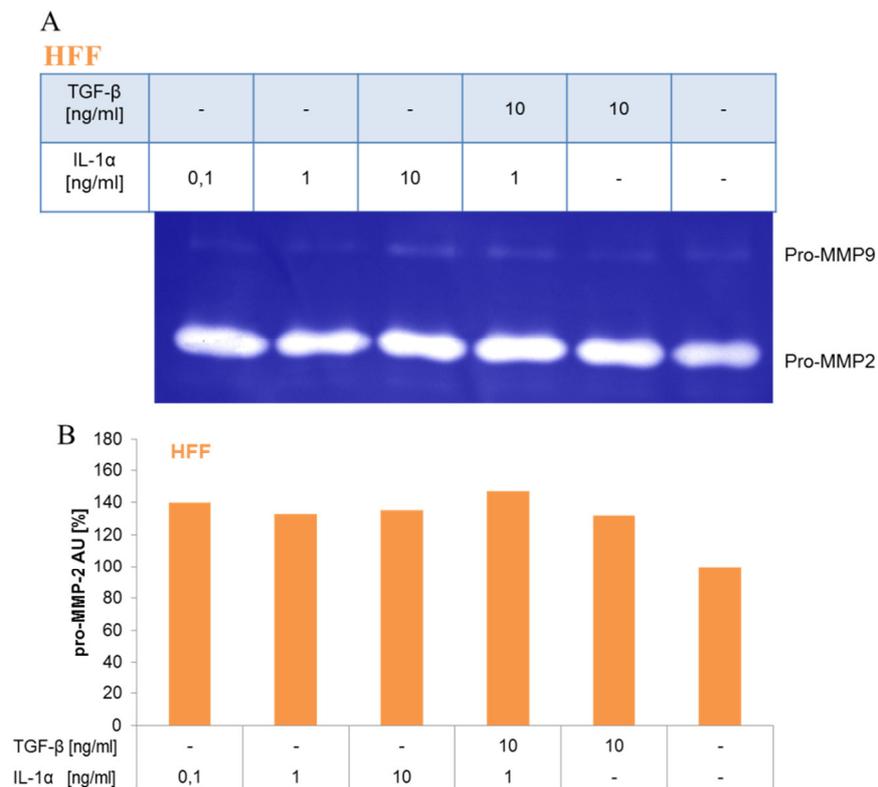


Abbildung 33: Pro-MMP-2-Sekretion von HFF inkubiert mit IL-1 α und TGF- β .

Die HFF wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinanten IL-1 α und/oder TGF- β für 24 h inkubiert. 12 μ l des Mediums wurden mit 12 μ l Ladepuffer gemischt und auf ein Zymographie-Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung des Gels, wurde durch Entfärbung Pro-MMP-2-Banden sichtbar. Diese wurden mittels ImagJ densitometrisch ausgewertet. (A) Zymographie-Gel von Medien von HFF (B) Densitometrische Auswertung des Zymographie-Gels von Medien von HFF. Als Kontrolle diente Medium der Fibroblasten ohne rekombinante Proteine nach 24 h. Diese Werte wurden 100 % gesetzt. Es ist ein typisches Experiment von 2 unabhängigen Versuchen dargestellt.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass (Tumorzell-sekretiertes) TGF- β und IL-1 α die Sekretion von Pro-MMP-2 in TAF und HFF erhöht. Eine Kombination beider Faktoren führte zu einer gesteigerten Pro-MMP-2-Abgabe. Weder IL-1 α noch TGF- β führten zu einer Aktivierung der sekretierten Pro-MMP-2 Proteine.

4.4 Wirkung von Fibroblasten auf Malignitätsparameter von Blasenkarzinom-Zellen

4.4.1 Untersuchung des Migrationsverhaltens der Tumorzellen unter Einfluss der Fibroblasten

Die Migration von Tumorzellen ist ein wichtiger Prozess in der Tumorprogression. Da ein migrationsfördernder Effekt von Fibroblasten auf Tumorzellen in anderen Tumorentitäten

bekannt ist, wurden Migrationsversuche durchgeführt, in denen die Blasen-tumorzelllinien in Gegenwart von HFF und TAF migrieren konnten. Die HFF als auch die TAF wurden für den Migrationsassay in die untere Kammer des „Boyden-Kammer“-Systems eingesät und konnten anwachsen. Einen Tag später wurden die Tumorzellen auf eine permeable Membran ausgesät, welche sich über den Fibroblasten befand und es den Tumorzellen ermöglichte, in Richtung der Fibroblasten zu migrieren. Mit Hilfe von Hämatoxylin wurden die Zellen angefärbt und nur die Tumorzellen auf der Membranunterseite wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Aus jeweils 3 Sichtfeldern (Abbildung 34) wurden die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung aus 3 verschiedenen Versuchen gebildet.

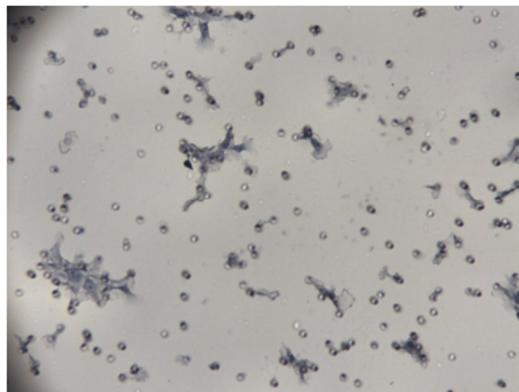


Abbildung 34: RT112 Zellen auf der Membran der „Boyden-Kammer“. Zunächst wurden Zellen mittels 4 %iger Paraformaldehydlösung fixiert. Nach der Färbung durch Hämatoxylin wurden die nicht migrierten Zellen entfernt. Nach Überführung der Membran auf einen Objektträger konnten die migrierten Zellen unter dem Mikroskop gezählt werden.

Sowohl die de-differenzierte Cal29-Blasenkarzinomzelllinie (Grad 4) als auch die epitheliale RT112-Zelllinie (Grad 2) migrierten zu den TAF, zeigten aber kaum Eigenmigration im serumfreien Medium (Abbildung 35). Cal29-Zellen migrierten in der Zeit von 18 h Stunden in einer größeren Anzahl, als Zellen der Linie RT112. Außerdem konnten die HFF die Migration der Cal29-Zellen, jedoch nicht der RT112-Zellen stimulieren.

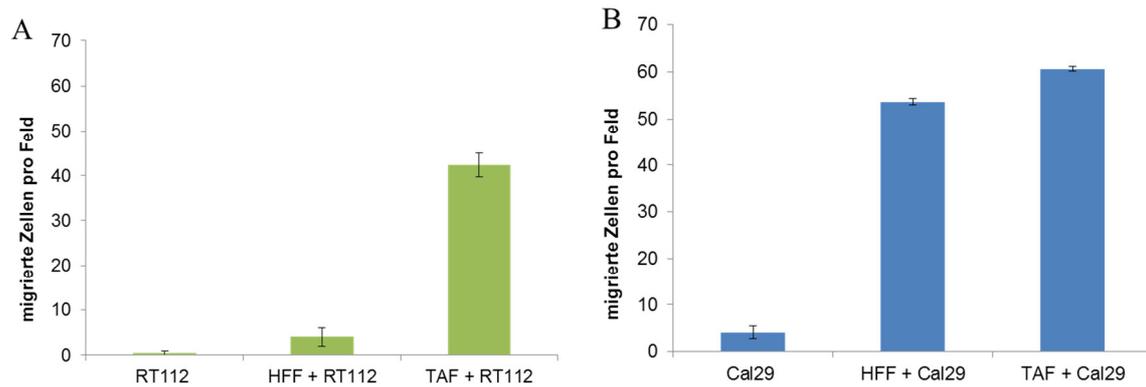


Abbildung 35: Migration von Tumorzellen in Monokultur und Ko-Kultur mit den Fibroblasten. Die Zellen konnten 18 h im serumfreien DMEM durch die Poren der Membran der „Boyden-Kammer“ migrieren. Nach Fixierung der Zellen, wurden diese mit Hämatoxylin gefärbt und nicht-migrierten Zellen entfernt. Es wurden migrierte Zellen von drei Feldern jeder Membran ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Jeder Migrationsversuch wurde dreimal (n=3) durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass TAF die Migration der Tumorzellen anregt. HFF können dazu die Migration von *high-grade* Cal29-Zellen steigern. Da beide Zelltypen räumlich voneinander getrennt waren, muss ein Fibroblasten-sekretiertes Chemokin für die Migration der Tumorzellen verantwortlich sein. Ob sich dieses Chemokin bereits in den Medium der Fibroblasten befindet oder ob es einer Aktivierung der Fibroblasten bedarf, sollte im folgenden Versuch untersucht werden.

4.4.2 Untersuchung des Migrationsverhaltens der Tumorzellen stimuliert durch Fibroblasten-konditioniertes Medium

Für die folgenden Versuche wurde ein sogenannter *Scratch*- oder auch Wundheilungs-assay etabliert. Dazu wuchsen die Zellen bis zur Konfluenz in einer 12-Well Platte. In den konfluenten Zellrasen wurde mittels einer Pipette (200µl) ein Kreuz „gekratzt“. Nach Inkubation der Zellen mit dem Testmedium konnten diese nun in die freien Flächen migrieren. Die Auswertung erfolgte mittels TScratch Software, welche zellfreie Fläche vor und nach 18 h misst.

Auch konditioniertes Fibroblasten Medium (HFFCM und TAFCM) konnte die Migration der Tumorzellen leicht steigern (Abbildung 36), jedoch nicht in dem Umfang wie die Fibroblasten in der Ko-Kultur. Auch hier war zu erkennen, dass die Cal29-Zellen in einem stärkeren Maß migrierten als die RT112-Zellen.

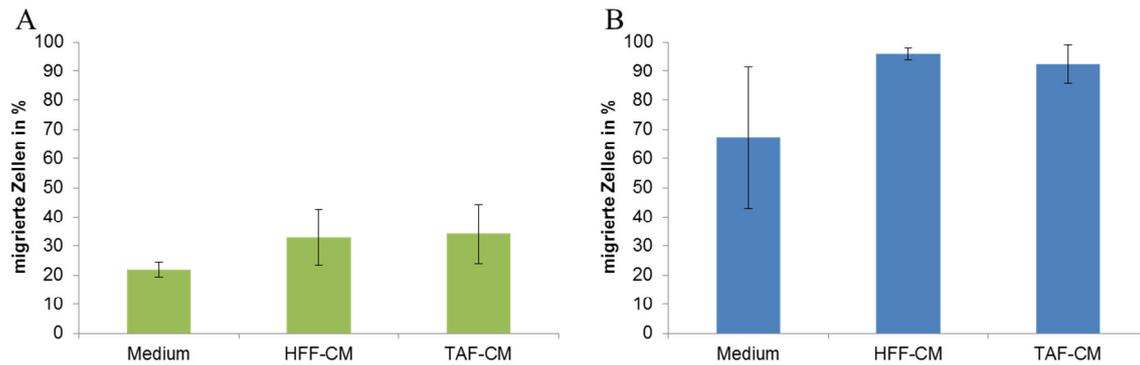


Abbildung 36: Migration von Tumorzellen in Gegenwart von konditionierten Fibroblasten Medium. Tumorzellen wurden in 12-Wellen ausgesät und in den konfluenten Zellrasen mit Hilfe einer Pipettenspitze ein Kreuz „gekratzt“. Nach 18 h Inkubation wurden die Zellen fotografiert. Die Migration der Zellen wurde mittels TScratch Software analysiert. Als Kontrolle dienten Tumorzellen, kultiviert in Medium mit 1 % FKS. (A) Migration der RT112-Zellen. (B) Migration der Cal29-Zellen. Es wurde jeweils der Mittelwert von drei verschiedenen Wells bestimmt (n=3).

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass die Anwesenheit der Fibroblasten für eine deutlich gesteigerte Migration von Tumorzellen notwendig ist. Zudem müssen Fibroblasten von Tumorzellen zur Sekretion des Chemokins angeregt werden. In folgenden Versuchen sollen einige Fibroblasten-sekretierte Faktoren auf den migrationsfördernden Effekt untersucht werden.

4.4.3 Einfluss definierter Zytokine auf das Migrationsverhalten von Blasenkarzinomzellen

Da die IL-8-Konzentrationen in den Ko-Kulturen mit der Migration korrelierten, wurde auch der migrationsfördernde Effekt von IL-8 vermutet. Da der Anteil an migrierten Zellen ungefähr gleich sein sollte, musste eine längere Inkubationszeit bei den RT112-Zellen als bei den Cal29-Zellen gewählt werden. Nach der Inkubation der Tumorzellen mit Hungermedium und rekombinantem IL-8 wurden Fotos nach 0 und 6 h bzw. 24 h gemacht und die Zellmigration mittels TScratch Software analysiert. Dabei wurden die zellfreien Flächen nach 0 und 6 h (24 h) gemessen und voneinander abgezogen. Die Ergebnisse des Scratch-assays konnten keinen migrationsfördernden Effekt von IL-8 zeigen. So scheint IL-8 eher einen hemmenden als einen fördernden Einfluss auf die Migration der RT112-Zellen auszuüben (Abbildung 37A). Da die IL-8-Konzentration in den Ko-Kulturen von RT112 mit den Fibroblasten viel kleiner war als die der Cal29 Ko-Kulturen, wurden für die Migrationsversuche geringere IL-8 Konzentrationen verwendet.

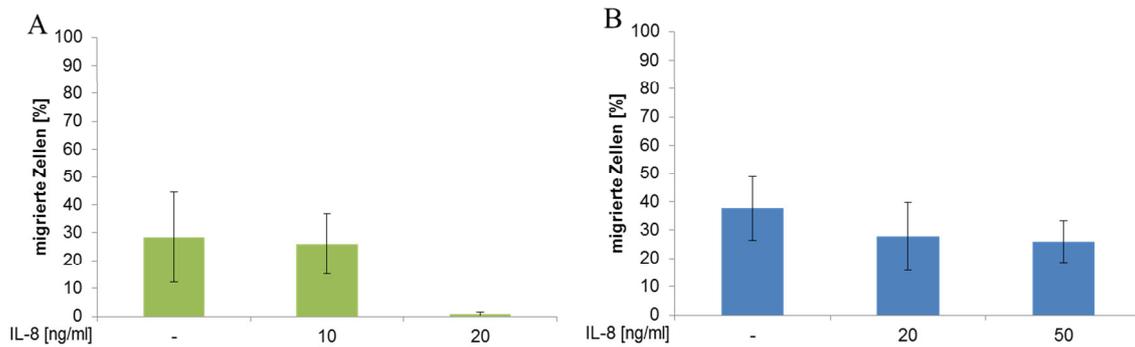


Abbildung 37: Migration der Tumorzellen in Gegenwart von rekombinanten IL-8. Aus konfluent gewachsenen Zellen wurden mittels Pipettenspitze Zellen entfernt. Es folgte die Inkubation der Zellen mit rekombinanten IL-8 in verschiedenen Konzentrationen. Zellen, welche in die zellfreie Fläche migrierten wurden mittels TScratch Software analysiert. (A) Migration der RT112-Zellen nach 24 h (B) Migration der Cal29-Zellen nach 6 h (n=2).

Da kein migrationsfördernder Effekt von IL-8 gezeigt werden konnte, sollten nun die anderen Faktoren, welche im Zytokinarray ein Signal gezeigt hatten, getestet werden. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von rekombinanten GM-CSF und MCP-1 verwendet. Dabei ergab sich, dass GM-CSF keine Wirkung auf die Migration der Zelllinien zeigte (Abbildung 38). Da RT112-Zellen langsamer migrieren, wurde hier ein Zeitintervall von 24 h und bei den Cal29-Zellen von 6 h gewählt.

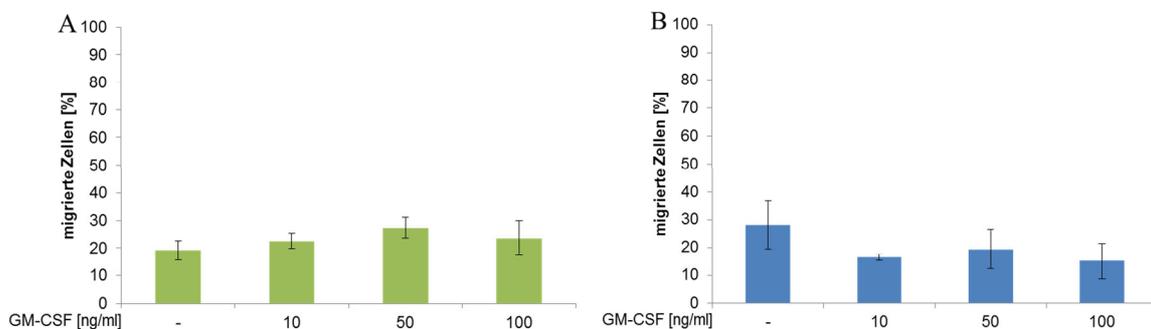


Abbildung 38: Migration der Zellen in Gegenwart von rekombinanten GM-CSF (n=3). Tumorzellen wurden in 12-Wellen ausgesät und wuchsen bis zur Konfluenz. Mittels einer Pipettenspitze wurde eine künstliche Wunde in den Zellrasen erzeugt. Die Migration in die „Wunde“ wurde mittels TScratch Software gemessen. (A) Migration der RT112-Zellen nach 24 h. (B) Migration der Cal29-Zellen nach 6 h.

In diesem Vorversuch schien jedoch MCP-1 einen positiven Effekt auf die Migration der RT112-Zellen auszuüben (Abbildung 39). Die RT112-Zellen zeigten einen geringen Anstieg der Migration (n=3) nach Inkubation mit 10 ng/ml rekombinanten MCP-1 im Vergleich zum Medium (DMEM + 1 % FKS) (Abbildung 40A). Durch die Inkubation der Zellen mit 50 bzw. 100 ng/ml MCP-1 konnte die Migration signifikanter gesteigert werden. Bereits nach 24 h war dieser Effekt erkennbar (Daten nicht gezeigt). Die Cal29-Zellen

migrierten auch verstärkt in Anwesenheit von MCP-1, aber es konnte kein konzentrationsabhängiger Effekt gezeigt werden.

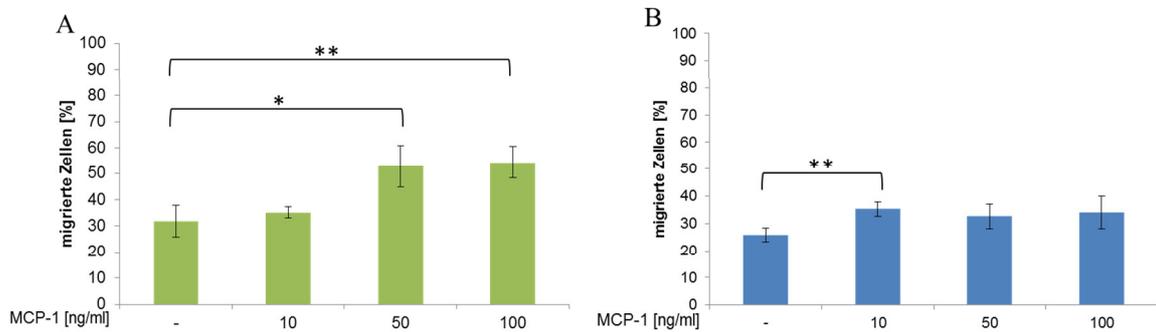


Abbildung 39: Migration von Tumorzellen in Gegenwart von rekombinanten MCP-1. Nachdem ein Kreuz in den konfluenten Tumorzellrasen „gekratzt“ wurde, konnten die Zellen in die freie Fläche migrieren. Gemessen wurde die Migration der Zellen mit der Software TScrach. (A) Migration der RT112-Zellen nach 48 h. (B) Migration der Cal29-Zellen nach 4 h. Signifikanztests wurden mittels T-Test durchgeführt.

Da die Migrationsassays der Ko-Kultur in einer „Boyden-Kammer“ erfolgten, sollte der Effekt des MCP-1 Proteins auch mittels dieses Assays verifiziert werden. Aufgrund der Vorversuche wurden zwei verschiedene MCP-1 Konzentrationen von 10 ng/ml und 50 ng/ml gewählt. Mit ansteigender MCP-1 Konzentration stieg auch die Zahl der migrierten Tumorzellen (Abbildung 40). Sowohl im Scratch-assay als auch in den Migrationsassays (n=3) mittels „Boyden-Kammer“ war zu erkennen, dass die differenzierte RT112-Zelllinie viel langsamer migrierte (48 h Inkubationszeit), als die Cal29-Zellen (6 h Inkubationszeit).

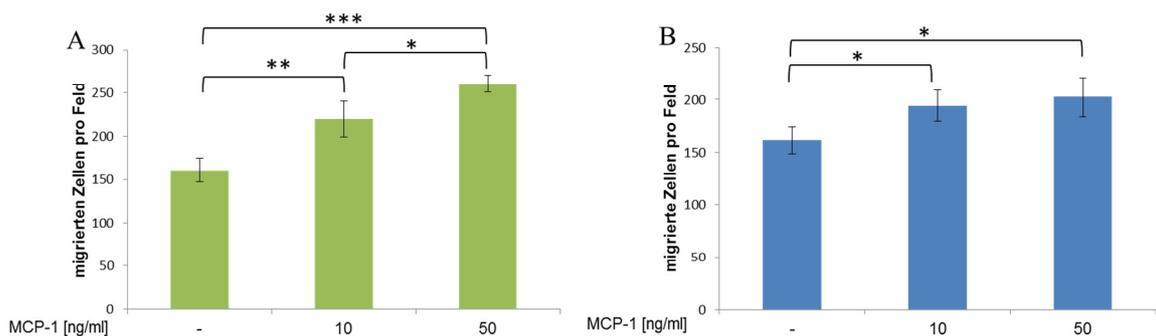


Abbildung 40: Migration von Tumorzellen in der „Boyden-Kammer“ in Gegenwart von rekombinanten MCP-1.

Nach Fixierung und Färbung der Zellen wurden nicht-migrierte Zellen von der Membran entfernt. An drei verschiedenen Stellen der Membran wurden migrierte Zellen gezählt. Pro Konzentration wurden 3 Membranen analysiert und der Mittelwert gebildet (n=3) (A) Migration der RT112-Zellen nach 48 h. (B) Migration der Cal29-Zellen nach 6 h. Signifikanz wurde mittel T-Test untersucht.

Die Migration von Blasen tumorzellen konnte durch MCP-1 gesteigert werden. Vorhergehende Versuche zeigten, dass MCP-1 von Fibroblasten sekretiert wird. Außerdem kann konditioniertes Medium der Cal29-Zellen die Sekretion des MCP-1 von TAF steigern, wie aus dem Zytokin-Assay hervorgeht.

4.4.4 Untersuchungen zum Invasionsverhalten von Blasenkarzinomzellen in Gegenwart von Fibroblasten

Die Untersuchung der Invasion der Tumorzellen erfolgte ebenfalls im Ko-Kulturmodell. Wie bei den Migrationsversuchen wurden Fibroblasten in das untere Well und Tumorzellen in das obere Well (Insert) eingesät. Bevor jedoch die Tumorzellen eingesät wurden, erfolgte die Aufbringung eines Matrigel[®] auf die Membran des Inserts. Dieses Matrigel[®] sollte die Basalmembran (BM) nachahmen. Die Invasionsversuche (n=3) wurden wie die Migrationsversuche im serumfreien Medium (DMEM) durchgeführt. Die Invasion der Tumorzellen wurde nach 20 h Ko-Kultur ausgewertet.

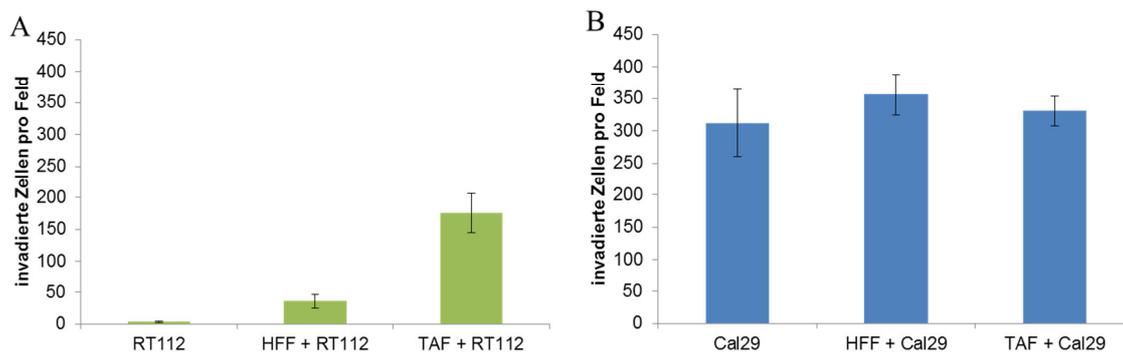


Abbildung 41: Invasionsanalysen der Tumorzellen in Ko-Kultur mit den HFF und TAF.

Auf die Membran der „Boyden-Kammer“ wurde Matrigel[®] aufgebracht. Tumorzellen wurden auf das Matrigel[®] ausgesät und konnten durch dieses zu den Fibroblasten migrieren. Die Zellen wurden mit 4 %igen Paraformaldehyd fixiert und mit Hämatoxylin gefärbt. Nicht-invadierte Zellen und Matrigel[®] wurde entfernt und invadierte Zellen von je drei Sichtfeldern unter dem Lichtmikroskop gezählt. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt und der Mittelwert gebildet (n=3). (A) Invasion der RT112-Zellen. (B) Invasion der Cal29-Zellen.

Die RT112-Zelllinie zeigte eine gesteigerte Invasion in der Ko-Kultur mit den HFF und den TAF (Abbildung 41A). Dabei war die Steigerung der Invasion mit den TAF jedoch deutlich höher als die in Gegenwart von HFF. Die Cal29-Zellen invadierten im serumfreien Medium (DMEM) viel stärker als die RT112-Zellen in Monokultur (Abbildung 41B). Die Invasion der Cal29-Zellen konnte nicht durch die Ko-Kultur mit den Fibroblasten

gesteigert werden. Dafür zeigten diese Zellen eine hohe Eigenmigration in Gegenwart des Matrigels®.

Diese Versuche zeigen, dass sowohl Migration als auch Invasion der RT112-Zellen durch TAF gesteigert wird. Bei Cal29-Zellen zeigt sich zudem ein Einfluss der Komponenten des Matrigels®. Gesteigerte Migration und Invasion sind auch Merkmale der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT). Die Wirkung von konditioniertem TAF Medium und MCP-1 auf EMT von RT112-Zellen soll im Folgenden getestet werden.

4.4.5 Einfluss Fibroblasten-sekretierter Faktoren auf Parameter der Epithelial-Mesenchymale Transition in Blasenkarzinomzellen

Es wurde untersucht, ob MCP-1 und TAFCM die RT112-Zelllinie zur Expression von Vimentin und zur Herunterregulierung von E-Cadherin führen kann. Aufgrund des epithelialen Charakters der RT112-Zellen, wie in Abbildung 13 dargestellt, wurde diese Blasenzelllinie für die Experimente verwendet. Dazu wurden auf Objektträgern fixierte RT112-Zellen mit der Avidin-Biotin-Komplex Methode (*avidin-biotin complex-method* – ABC-Methode) immunhistochemisch gefärbt (n=2). Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Die Zellen in je zwei Kammern wurden vier Tage mit TAFCM (B) oder mit 10 ng/ml und 50 ng/ml rekombinantem MCP-1 inkubiert (C;D). Als Kontrolle (A) diente Hungermedium, in welchem auch das MCP-1 gelöst war. Dem TAFCM wurde 1 % FKS zugegeben, bevor die Zellen damit inkubiert wurden, um gleiche Bedingungen zu schaffen und ein Überleben der Zellen zu sichern. Das Medium wurde jeden Tag erneuert.

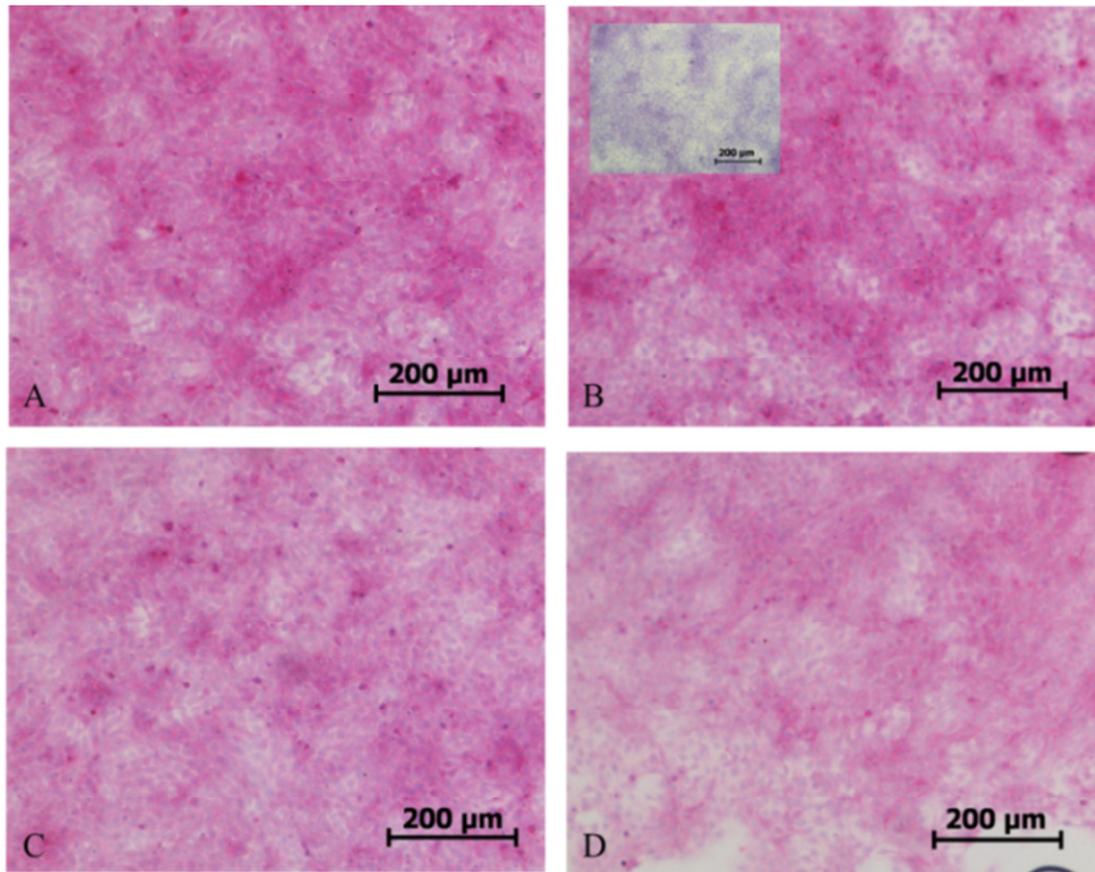


Abbildung 42: Immunhistochemische Färbung der RT112-Zellen. Nach Fixierung mit Acteon/Methanol erfolgte die Färbung nach ABC-Methode mittels Antikörpern gegen E-Cadherin (1:1000). (A) RT112-Zellen inkubiert mit DMEM + 1 %FKS (B) RT112-Zellen inkubiert mit TAFCM (C) RT112-Zellen inkubiert mit rekombinanten MCP-1 10 ng/ml (D) RT112-Zellen inkubiert mit rekombinantem MCP-1 50 ng/ml.

Es ließ sich jedoch kein Unterschied in der Expression von E-Cadherin von RT112-Zellen erkennen (Abbildung 42). Weder das TAFCM noch MCP-1 konnten einen Effekt hervorrufen. In der Negativkontrolle (Abbildung 42 in Bild B) sind nur die Zellkerne gefärbt. Diese Probe wurde wie die anderen Proben behandelt, es wurde lediglich kein primärer Antikörper verwendet.

Vimentin ist ein Protein, welches von mesenchymalen Zellen exprimiert wird. Wie schon erwähnt, exprimiert die epitheliale Zelllinie RT112 kein oder kaum Vimentin. Durch die Inkubation mit TAFCM sind vermehrte positive Färbungen der Zellen zu erkennen (Abbildung 43B). MCP-1, welches von den Fibroblasten exprimiert und auch sekretiert wird, wie in den vorherigen Ergebnissen gezeigt, scheint keinen Effekt auf die Vimentin-Expression der RT112-Tumorzellen auszuüben (Abbildung 43C,D).

Dies deutet darauf hin, dass TAF in der Lage sind, Tumorzellen zur EMT zu führen, um die Tumorprogression voran zu treiben. Dabei konnte noch nicht geklärt werden, welches Fibroblasten-sekretierte Protein für die verstärkte Vimentin-Expression der RT112-Zellen verantwortlich ist.

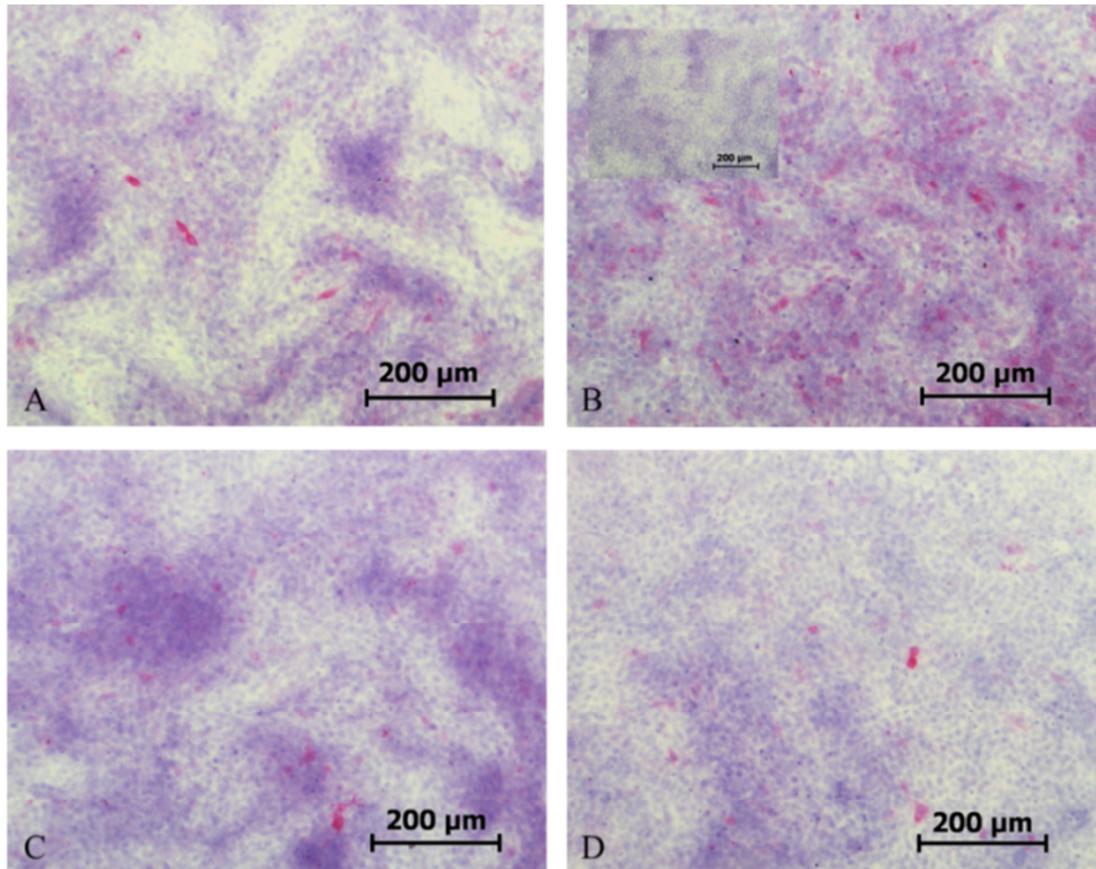


Abbildung 43: Immunhistochemische Färbung der RT112-Zellen.

Die Färbung erfolgte nach ABC-Methode mittels Antikörper gegen Vimentin (1:1500). (A) RT112-Zellen inkubiert mit DMEM + 1 % FKS (B) RT112-Zellen inkubiert mit TAFCM (C) RT112-Zellen inkubiert mit rekombinantem MCP-1 10 ng/ml (D) RT112-Zellen inkubiert mit rekombinantem MCP-1 50 ng/ml.

Cal29-Zellen wurden nicht immunhistochemisch untersucht, da diese Zellen mehr Vimentin exprimieren als RT112-Zellen.

5 Diskussion

Die Progression und Metastasierung von Tumoren wird durch ihre Mikroumgebung maßgeblich mitbestimmt. Dabei spielen die Interaktionen zwischen Tumor- und Stromazellen eine wichtige Rolle. Daher können neue Erkenntnisse über diese Wechselbeziehungen Beiträge zur Verbesserung der Behandlung und Früherkennung von Tumoren leisten. Hinsichtlich des Potenzials für Therapie und Diagnostik sind insbesondere sekretierte Proteine, wie beispielsweise Zytokine und Matrix-Metalloproteasen (*matrix metalloproteinases* – MMPs), interessant.

Im Blasenkarzinom scheinen vor allem Interleukin (*interleukin* – IL)-8, IL-10, IL-13, MMP-2 und MMP-9 in der Tumorentwicklung eine Rolle zu spielen (Staack et al. 2006, Kumar et al. 2010, Margel et al. 2011, Urquidi et al. 2012, Reis et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte in Cal29-Blasenkarzinomzellen eine höhere IL-8-Konzentration als der RT112-Monokultur festgestellt werden. Dieses Resultat stimmt mit Ergebnissen von Untersuchungen an Patientenmaterial aus Harnblasentumoren überein. Auch hier wurde IL-8 in hohen Konzentrationen in Urin, Blut und Tumorgewebe gefunden, die mit der Tumorprogression korrelieren (Sheryka et al. 2003, Koçak et al. 2004, Reis et al. 2012). Um die Interaktionen von Tumorzellen und Fibroblasten näher zu untersuchen, wurde ein Ko-Kulturmodell, in dem Blasenkarzinomzellen und Fibroblasten keinen direkten Kontakt miteinander haben, verwendet. Zunächst wurden IL-8-Konzentrationen in den Medien der Ko-Kulturen gemessen. In den Ko-Kulturen der beiden Tumorzelllinien mit den TAF kam es zu erhöhten IL-8-Abgaben, ebenso in der Ko-Kultur der Cal29-Zellen mit den HFF. Im Gegensatz dazu führte die Ko-Kultur der HFF mit den RT112-Zellen nicht zu einer Steigerung der IL-8-Sekretion. Ebenso konnte im Plattenepithelkarzinom der Haut, wo das Ko-Kultur System von Fibroblasten und epithelialen Zellen gut etabliert ist, eine Expressionssteigerung von IL-8 in den Fibroblasten nach der Ko-Kultivierung festgestellt werden (Kolář et al. 2012). Die IL-8-Expression konnte in diesem Fall durch FaDu-Tumorzellen in TAF, aber auch in normalen Fibroblasten, angeregt werden. Li und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das invasive Potenzial von Melanom-Zelllinien mit der Fähigkeit der Zellen, die Genexpression von Fibroblasten zu verändern, in Zusammenhang steht (Li et al. 2009): Die Ko-Kultivierung der zwei stark invasiven Tumorzelllinien BLM und MV3 mit

Fibroblasten führte zu einer stärkeren Beeinflussung der Genexpression von Chemokinen und Zytokinen in den Fibroblasten als die Ko-Kultivierung mit den nicht oder wenig invasiven Zelllinien WM164, A2058 und SK-Mel-28. Unter anderem wurde auch die IL-8-Expression der Fibroblasten durch die invasiveren Zelllinien stärker aktiviert. Diese Ergebnisse decken sich mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen. Dies macht deutlich, dass Tumorzellen umso mehr Einfluss auf Fibroblasten ausüben, je differenzierter sie sind. Eine Arbeit von Bouchelouche und Mitarbeitern untersuchte die IL-8-Sekretion von gesunden humanen Blasenmuskelzellen und konnte eine gesteigerte Abgabe nach Inkubation mit IL-1 β und Tumornekrosefaktor- α (*tumor necrosis factor- α* – TNF- α) zeigen (Bouchelouche et al. 2006). Dies lässt vermuten, dass Fibroblasten auch im Blasentumor für die IL-8-Sekretion verantwortlich sein könnten.

Um diese Annahme im vorliegenden Modell zu untersuchen, wurde die IL-8-Expression intrazellulär mittels Durchflusszytometrie in der Ko-Kultur der Cal29-Zellen mit HFF gemessen. Tatsächlich konnte so eine erhöhte IL-8-Expression in den Fibroblasten festgestellt werden. Ob diese jedoch auch mit der Sekretion des IL-8 ins Medium einhergeht, wurde mittels Enzym-gekoppelten Immunsandwich Technik (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA) untersucht. Dafür wurden zunächst konditionierte Medien (*conditioned medium* – CM) hergestellt. In den Monokulturen beider Fibroblasten-Zelllinien waren nur geringe IL-8-Konzentrationen messbar. Wurden die Fibroblasten jedoch mit den Medien der Tumorzellen inkubiert, stieg die IL-8-Sekretion der Fibroblasten an. Vor allem TAF, welche mit Medium der Cal29-Zellen behandelt wurden, zeigten einen erheblichen Anstieg an IL-8 im Medium, wohingegen RT112-konditioniertes Medium (RT112CM) zwar auch eine Steigerung der IL-8-Sekretion der Fibroblasten hervorrufen konnte, jedoch in viel geringerem Ausmaß. Im Gegensatz dazu konnte keine erhöhte IL-8-Abgabe der Tumorzellen nach Inkubation mit Fibroblasten-konditioniertem Medium (FibroblastenCM) nachgewiesen werden (siehe Anhang Abbildung A 3). Es ist daher naheliegend, dass die erhöhten IL-8-Mengen, welche bei Tumorpatienten unter anderem im Urin gemessen wurden, von den Fibroblasten im Tumor sekretiert werden. Um dies zu bestätigen, müssten Proben von Patienten, insbesondere die Fibroblasten, auf die Expression von IL-8 untersucht werden.

IL-8 ist ein pro-inflammatorisches Interleukin, welches zu der CXC-Subfamilie der Chemokine gehört (Übersichtsartikel Waugh und Wilson 2008). IL-8-Produktion steht mit Tumorwachstum, Angiogenese, Tumordinvasion und -migration in Verbindung (Ju et al. 2012, Merritt et al. 2008, Matsuo et al. 2009). Gleichfalls wird IL-8 auch während der Wundheilung verstärkt sekretiert (Spiekstra et al. 2007). Die Sekretion des Proteins kann durch IL-1, TNF- α , IL-17 und LPS erhöht werden (Georganas et al. 2000, Lang et al. 2004, Hwang et al. 2004, Angrisano et al. 2010). Lang und Mitarbeiter zeigten in T24-Blasentumorzellen, dass die Migration von durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) aktivierten Zellen, durch einen neutralisierenden IL-8-Antikörper zurückgesetzt werden konnte (Lang et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte die Migration von Tumorzellen jedoch nicht durch eine Inkubation mit rekombinantem IL-8 angeregt werden, obwohl die Tumorzellen IL-8-Rezeptoren exprimieren (siehe Anhang Abbildung A 4). Die von Lang und Kollegen verwendeten T24-Blasenkarzinomzellen, eine *high-grade* Tumorzelllinie mit unbekanntem Tumorstadium, reagiert allerdings anders auf IL-8 als die Zelllinien RT112 und Cal29. Trotzdem könnte die Inhibierung des IL-8, beispielsweise durch einen Antikörper, die Tumorprogression unterbrechen. Mian und Kollegen haben die Wirkung eines IL-8-Antikörpers auf Blasenkarzinomzellen im Maus-Modell getestet, wobei das Tumorwachstum durch 4-wöchige Verabreichung des Antikörpers verringert werden konnte (Mian et al. 2003). Weitere Untersuchungen mit einem inhibitorischen IL-8-Antikörper wurden bisher jedoch nicht im Blasenkarzinom durchgeführt, erscheinen aber sinnvoll, insbesondere, wenn (Stroma-) Fibroblasten mit einbezogen werden. Während der Wundheilung fördert IL-8 die Angiogenese, indem es die Einwanderung von Endothelzellen in die Wunde fördert (Li et al. 2003). Die *low-grade* RT112-Zellen scheinen kaum Faktoren abzugeben, welche TAF zur Sekretion von IL-8 anregen. Als nicht-metastasierende Tumorzellen ist die Bildung von Blutgefäßen noch nicht initiiert. Scheinbar müssen die Zellen erst differenzieren, bevor sie Metastasen bilden können (Übersichtsartikel Friedlander et al. 2013). Die Ergebnisse der Ko-Kultur stehen somit auch im Einklang mit dem bereits seit 1986 vermuteten Zusammenhang zwischen Wundheilung und Onkogenese (Dvorak 1986). Seitdem wird ein Tumor immer wieder als „nicht-heilende Wunde“ bezeichnet. So geben Fibroblasten zu Beginn der Wundheilung vor allem Kollagen in die Wunde ab um diese zu schließen (McDougall et al. 2006).

In der oben erwähnten Arbeit von Mian und Mitarbeitern wurde durch die Anti-IL-8-Antikörpergabe auch die Transkription von MMP-2 und -9 vermindert (Mian et al. 2003). IL-8 beeinflusst also auch die Expression von MMPs. Des Weiteren untersuchten Gerhards und Kollegen Urinproben von Blasenkarzinompatienten mittels Gelatine-Zymographie und stellten fest, dass erhöhte Abgabe, also Urinkonzentration, von MMP-2 und -9 mit dem Tumorstadium und -differenzierungsgrad korreliert (Gerhards et al. 2001). Da die MMPs in einer Pro-Form gebildet werden, deren Aktivierung durch andere Proteine erfolgt, wie Plasmin oder andere MMPs, könnte hier die Interaktion verschiedener Zelltypen von entscheidender Bedeutung sein. Diese Vermutung wurde in dem etablierten Ko-Kulturmodell weiter untersucht. Dazu wurde zunächst die Sekretion von (Pro-)MMP-2- und -9 in den Ko-Kulturen der Blasentumorzellen und Fibroblasten untersucht. Sowohl die Ko-Kulturen der *high-grade* Cal29-Zelllinie als auch die Ko-Kulturen der RT112-Zellen zeigten eine verstärkte Pro-MMP-2-Sekretion. Dies deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen von Patientenproben (Gerhards et al. 2001). (Pro-)MMP-9 war auch nach 18 h Ko-Kultur nicht nachweisbar. Möglicherweise kommt es erst nach längeren Zeiträumen der Ko-Kultur zu einer (Pro-)MMP-9-Anreicherung. Erhöhte Pro-MMP-2-Sekretion wurde in der Ko-Kultur der Cal29-Zellen mit den HFF festgestellt, wohingegen die Cal29-Zellen in Monokultur keine Sekretion von Pro-MMP-2 zeigten. Pro-MMP-2-Sekretion war jedoch in der Monokultur der RT112-Zelllinie messbar. Einerseits widerspricht dies den Ergebnissen von Gerhards und Kollegen sowie den eigenen Befunden aus den Ko-Kulturversuchen. Andererseits konnte in einer anderen Arbeit jedoch das gleiche Phänomen beobachtet werden. Die Expression von MMP-2 in den Zellen der *high-grade* Blasentumorzelllinien war geringer als in den *low-grade* Zelllinien (Chuang et al. 2010). Eine Untersuchung an Patientenproben ergab jedoch das Gegenteil und steht somit im Einklang mit den Ergebnissen von Gerhards und Kollegen (Chuang et al. 2010). Möglicherweise hängt dieses veränderte Verhalten der Zelllinien mit der fehlender dreidimensionale Struktur des Tumorgewebes oder den fehlenden Stromazellen zusammen (Chuang et al. 2010). Da MMP-2-mRNA in einer weiteren Arbeit hauptsächlich im Tumor-Stromazellen von Blasenkarzinompatienten gefunden wurde (Wallard et al. 2006), wurden in der weiteren Folge Fibroblasten und nicht Tumorzellen weiter auf MMPs untersucht. Erhöhte Mengen an Pro-MMP-2 konnte im Medium der TAF sowohl nach Kultivierung mit konditioniertem Medium der RT112- als auch der Cal29-Zelllinie festgestellt werden. So scheinen die TAF, stärker als die HFF, von den

Tumorzellen zur MMP-Abgabe angeregt zu werden. Nach der Inkubation der TAF mit den beiden Tumor-konditionierten Medien (TumorCM) wurde auch aktiviertes MMP-2 detektiert. Im Gegensatz dazu konnte im Medium der HFF aktives MMP-2 nur nach Kultivierung mit RT112CM nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis widerspricht jedoch dem aus den Ko-Kultur-Experimenten: Hier sekretierten Cal29-Zellen und HFF mehr Pro-MMP-2. Möglicherweise induzierten in diesem Fall die HFF Pro-MMP-2-Abgaben in den Cal29-Zellen, was die starke Bande in dem Zymographie-Gel der Ko-Kultur erklären könnte. Zudem ist eine gewisse Diversität nicht auszuschließen, da die HFF von unterschiedlichen Patienten stammen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten in diesem Ko-Kulturmodell hauptsächlich MMPs sekretieren. Dies konnte im Periodontium auch schon von Shimonishi und Kollegen nachgewiesen werden (Shimonishi et al. 2010). MMP-2 kann Proteine der EZM, wie Typ-IV Kollagen, auflösen und somit die Invasion von Zellen und Metastasierung fördern. Dies legt den Schluss nahe, dass diese Prozesse durch TAF vorangetrieben werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass MMP-2 sowie IL-8 zukünftig zur verbesserten Diagnostik des Harnblasenkarzinoms herangezogen werden könnten.

Die Aktivierung von Pro-MMP-2 zu MMP-2 an der Zellmembran erfolgt hauptsächlich durch einen Komplex von membrangebunden Membran-Typ Matrix Metalloproteinase-1 (*membrane type-1 matrix metalloproteinase* – MT1-MMP) und Gewebe-Metalloproteinase Inhibitor-2 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-2* - TIMP-2) (Seiki et al. 2003). MT1-MMP wird sowohl von Tumorzellen als auch von Fibroblasten exprimiert (Chenard et al. 1999). Zhang und Kollegen beschrieben, dass MT1-MMP exprimierende Fibroblasten die Invasion von Tumorzellen erhöhten (Zhang et al. 2006, Saeb-Parsy et al. 2008). Da in den Fibroblasten, welche mit TumorCM inkubiert wurden, aktiviertes MMP-2 detektiert wurde, wurde in weiterer Folge die MT1-MMP-Expression in den Fibroblasten weiter untersucht. Mangels ausreichendem TAF-Material für eine Proteinanalyse, wurden zunächst nur HFF getestet. Es war hier deutlich zu erkennen, dass das konditionierte Medium der Cal29-Zellen zu einer Steigerung der MT1-MMP-Proteinkonzentration in den HFF führte. Diese erhöhte MT1-MMP-Konzentration kann zu einer vermehrten Aktivierung der Pro-MMP-2-Proteine führen und somit zu einer gesteigerten Auflösung der EZM beitragen, wodurch wiederum die Invasion der Tumorzellen erleichtert wird. Das RT112CM konnte im Gegensatz zu Cal29CM, keine erhöhte MT1-MMP-Expression in

den HFF innerhalb von 24 h hervorrufen. Dies bestätigt wiederum, dass die *low-grade* RT112-Zellen ihre umgebenden Zellen weniger stark beeinflussen können als die *high-grade* Cal29-Zelllinie.

Diese Befunde wurden mittels real-time PCR auf mRNA-Eben genauer betrachtet. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den Western Blots steigt die mRNA-Menge des MT1-MMP-Gens in den HFF an, welche mit den TumorCM behandelt wurden. Erstaunlicherweise sank jedoch die MT1-MMP mRNA-Expression in den TAF nach Inkubation mit beiden TumorCM, was erwarten lässt, dass weniger Pro-MMP-2 zu MMP-2 aktiviert wird. Dies ist jedoch konträr zu den oben diskutierten Ergebnissen der Zymographie, die starke MMP-2-Banden in TAF-Medium zeigten. Möglicherweise war das gewählte Zeitintervall von 24 h nicht geeignet, um den Effekt der Tumorzellen auf die MT1-MMP-Expression der Fibroblasten zu untersuchen. Eine weitere Analyse der MMP-Sekretion der Fibroblasten über mehrere Tage oder der MMP-Expression über einige Stunden wäre in diesem Zusammenhang sinnvoll. Weiterhin wäre eine ergänzende Untersuchung der MT1-MMP-Expression in den Tumorzellen interessant. So beschrieben Fullár und Mitarbeiter beispielsweise, dass von Fibroblasten abgegebenes inaktives Pro-MMP-2 durch MT1-MMP, welches auf Tumorzellen exprimiert wird, in seine aktive MMP-2-Form gespalten wird (Fullár et al. 2012). Es ist zudem denkbar, dass sich im Medium der RT112 Zellen ein weiterer Faktor befindet, der Pro-MMP-2 aktiviert oder die Fibroblasten anregt einen solchen Faktor zu produzieren. Bei diesem Faktor könnte es sich zum Beispiel um MMP-7 handeln. So wurde in der Literatur beschrieben, dass lösliches MMP-7 Pro-MMP-2 aktiviert und dass dieses auch im Blasenkarzinompatienten vorhanden ist (Barille et al. 1999, Szarvas et al 2011). Zudem gibt es Arbeiten, die beschreiben, dass sich MMP-2 *in vitro* autolytisch aktiviert (Bergmann et al. 1995). Ob dies jedoch auch *in vivo* möglich ist, konnte bisher nicht gezeigt werden. Eine erhöhte Sekretion des Pro-MMP-2-Proteins kann auch durch Faktoren wie den extrazellulären Matrix Metalloproteinase Induktor (*extracellular matrix metalloproteinase inducer* – EMMPRIN), Thrombin, Kollagen I, transformierender Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor- β* – TGF- β) und IL-1 β verstärkt werden (Papadimitropoulou und Mamalaki 2013, Henderson et al. 2007, Dehnavi et al. 2009, Brown et al 2007). Auch EMMPRIN ist in Blasenkarzinompatienten hochreguliert (Xue et al 2011). Möglich ist auch, dass von den Tumorzellen eine latente Form des MT1-MMP-Proteins abgegeben wird, wie von Kazes und

Mitarbeitern beschrieben, und diese nach Aktivierung auch Pro-MMP-2 aktiviert (Kazes et al. 1998). Dass MT1-MMP hauptsächlich von Zellen des Blasen tumorstroma, aber auch von Epithelzellen exprimiert wird, konnte bereits gezeigt werden (Wallard et al. 2006). Hier wurde die RNA nach Laser-Mikrodissektion von gefrorenen Blasensektionen analysiert. Möglicherweise ist das TumorCM nicht ausreichend, um die MT1-MMP-Expression zu erhöhen, sondern die Anwesenheit der Tumorzellen erforderlich. Ein geeignetes Ko-Kulturmodell ist somit gerade für die Untersuchung von MMPs wichtig, da diese auch im Blasenkarzinom von den Tumor-Fibroblasten Wechselwirkungen beeinflusst werden.

Um weitere Zytokine, welche an der Interaktion von Tumorzellen und Fibroblasten im Blasenkarzinom beteiligt sind, zu identifizieren, wurde ein Zytokin-Array durchgeführt. Dieser Array ermöglicht die Untersuchung von 36 Zytokinen in einem Test. Es wurde sowohl konditioniertes Medium der Cal29-Zellen als auch das Medium der TAF, welche mit Cal29CM inkubiert wurden, analysiert. Die densitometrische Auswertung ergab, dass die Sekretion des Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktors (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor* – GM-CSF) und des Monozyten-chemotaktischen Proteins-1 (*monocyte chemotactic protein-1* – MCP-1/CCL2) im Medium der TAF erhöht war. Hinsichtlich der anderen erfassten Proteine wurde keine eindeutige Veränderung festgestellt und diese somit nicht weiter betrachtet. Die Interpretationen der Array-Ergebnisse ist jedoch problematisch, da nur zwei von drei Positivkontrollen identische Signale zeigten. Bei allen drei Positivkontrollen handelt es sich um ein identisches Protein. Weitere Auskunft dazu gibt der Hersteller nicht. Somit dürfte entweder in der Produktion des Arrays oder in der Versuchsdurchführung ein Fehler aufgetreten sein. Zudem ist es erstaunlich, dass IL-8 zwar im ELISA und Western Blot ein starkes Signal zeigte, auf dem Array jedoch nicht detektierbar war. Aufgrund dieser Probleme wurden die Ergebnisse mittels PCR überprüft.

Beide Tumormedien induzierten die Expression des GM-CSF-Gens in den TAF, wohingegen HFF nur das Medium der *high-grade* Cal29-Zelllinie zur Expression von GM-CSF anregen konnte. Die Ergebnisse bestätigen wieder, dass *high-grade* Tumorzelllinien stärker auf Fibroblasten wirken als *low-grade* Zelllinien. Ob auch die Sekretion des Proteins gesteigert wird, ist noch nachzuweisen. GM-CSF wird

hauptsächlich als immun-stimulierender Faktor beschrieben. Daher wurden klinische Anwendungen von GM-CSF für die Tumor-Therapie bereits getestet (Spitler et al. 2009, Higano et al. 2008, Fong et al. 2009). Beim nicht-invasiven Blasenkarzinom wurden zudem Patientenversuche mit einem GM-CSF produzierenden Adenovirus vorgenommen, deren Ergebnisse auf einen anti-Tumor-Effekt hinweisen (Burke et al. 2012). Andererseits wurde in einigen Tumorentitäten erhöhte GM-CSF-Expression nachgewiesen, die mit einer verstärkten Invasion der Tumorzellen in Zusammenhang steht (Gutschalk et al. 2013, Ninck et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte für beiden Blasentumorzelllinien weder eine Wirkung von GM-CSF auf die Proliferation (Daten nicht gezeigt) noch auf die Migration festgestellt werden. GM-CSF zeigte somit weder eine tumorfördernde noch ein tumorhemmende Wirkung. Möglicherweise spielt es, ebenso wie bei der Wundheilung, eine Rolle bei der Migration und Proliferation von Endothelzellen (Bussolino et al. 1991). Dies könnte in der Zukunft anhand eines weiteren Ko-Kulturmodells, welches zusätzlich Endothelzellen beinhaltet, getestet werden. Die erhöhte Expression in den Fibroblasten legt zudem einen tumorfördernden Effekt nahe, welcher möglicherweise mit der Angiogenese verbunden ist.

MCP-1 ist ein Chemokin, welches die Migration von Monozyten, T-Gedächtniszellen und Natürlichen Killerzellen (NK) aktiviert (Übersichtsartikel Conti und Rollins 2004). Es ist an der Regulierung des Wachstums, der Angiogenese und der Metastasierung von verschiedenen Tumoren, wie Prostata-, Mamma- und Kolonkarzinom, beteiligt (Lin et al. 2013). Des Weiteren korreliert die MCP-1-Konzentration im Urin mit dem Tumorstadium des Blasenkarzinoms (Amann et al. 1998). Auch TAF sekretieren MCP-1 (Lin et al. 2012). Beide konditionierten Tumormedien induzierten die MCP-1-Expression jedoch nur in den TAF und nicht in den HFF. Zudem war kein Unterschied in der MCP-1-Expression der TAF nach Inkubation mit den beiden unterschiedlichen Tumormedien erkennbar. Eine Wirkung auf die Proliferation war ebenfalls nicht zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnten die Ergebnisse des Zytokin-Arrays durch die PCR-Ergebnisse bestätigt werden. Die Arbeit von Bouchelouche und Kollegen zeigt, dass die MCP-1-Sekretion in gesunden humanen glatten Blasenmuskelzellen durch Inkubation mit IL-1 β und TNF- α stimuliert werden kann (Bouchelouche et al. 2004). Das entstehende pro-inflammatorische Milieu ist ferner für die Ausbildung von Tumoren relevant. MCP-1 fördert die Migration von Monozyten. Kommt es gleichzeitig zu einer Sekretion des vaskulären endothelialen

Wachstumsfaktors (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) durch die Monozyten, wird die Einwanderung von Endothelzellen in den Tumor gefördert (Leek et al. 2000). Dies führt zur Angiogenese, was den Tumorzellen erleichtert, in andere Gewebe auszuwandern und Metastasen zu bilden.

Eine Voraussetzung für Metastasierung ist die Fähigkeit von Tumorzellen zu migrieren bzw. zu invadieren. Daher wurde im Ko-Kulturmodell untersucht, ob die Blasentumor-assoziierten Fibroblasten die Migration und Invasion von Tumorzellen fördern und – wenn ja – welcher Faktor dafür verantwortlich ist. Da in der vorliegenden Arbeit der Differenzierungsgrad der Tumorzellen beachtet wurde, musste ein Messpunkt gewählt werden, an dem beide Zelllinien zur Migration angeregt werden konnten. Eine Inkubationszeit von 18 h erwies sich als geeignet, da zu diesem Zeitpunkt beide Zelllinien migrieren konnten. Die de-differenzierte Cal29-Zelllinie weist aufgrund des mesenchymalen Charakters eine erhöhte Eigenmigration im Vergleich mit der gut differenzierten RT112-Zelllinie auf. HFF konnten die Migration der RT112-Zellen kaum anregen. Dies entspricht der Erwartung, da HFF einen nicht-aktivierten, „normalen“ Fibroblastentyp darstellen. Jedoch migrierten RT112-Zellen, trotz ihrer Herkunft aus nicht-metastasiertem invasivem Tumor in Gegenwart der TAF. Im Gegensatz dazu migrierten Cal29-Zellen sowohl in Gegenwart der TAF als auch der HFF. Beide Tumorzelllinien zeigten erhöhte Mobilität in Gegenwart der TAF. Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen in anderen Tumorentitäten gestützt. So zeigten unter anderem Hu und Mitarbeiter, dass Magentumorzellen SGC7901 in der Ko-Kultur („Boyden“ Kammer) mit TAF zur Migration und Invasion angeregt werden (Hu et al. 2013). Auch Prostata-Tumor-Stammzellen können unter dem Einfluss von TAF verstärkt migrieren (Luo et al. 2013). Das Risiko der Metastasenbildung ist also erhöht, wenn sich Fibroblasten im Tumorgewebe befinden. Durch Inkubation mit FibroblastenCM konnte die Migration der beiden Zelllinien, Cal29 und RT112, nur leicht gesteigert werden. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen TAF- und HFF-konditioniertem Medium festgestellt werden. Dies verdeutlicht, dass für die Migration der Tumorzellen die Wechselwirkungen zwischen den Zelltypen entscheidend sind und nicht isolierte Faktoren, die von Fibroblasten sekretiert werden.

Die Basalmembran (BM) stellt eine Barriere zwischen normalem adulten Epithel und Bindegewebe dar (Pitelka et al. 1980). Nach proteolytischer Auflösung der BM durch beispielsweise MMPs, können Epithel- und andere Zellen in die Blut- und Lymphbahn gelangen. Die Invasion der RT112-Zellen wurde durch die Ko-Kultur mit den TAF erhöht. Die Cal29-Zellen zeigten im Invasionsassay eine derart hohe Eigenmigration, dass der Einfluss der Fibroblasten nicht näher untersucht werden konnte. Für die Invasionsversuche wurde auf die Membran zusätzlich ein Matrigel[®] aufgetragen, welches als Modell der BM dienen sollte. Die enorme Migration der Cal29-Zellen könnte durch die Interaktion mit Komponenten des Matrigel[®] hervorgerufen werden. Der epidermale Wachstumsfaktor (epidermal growth factor – EGF), welches eine Komponente des Matrigels[®] darstellt, regt beispielsweise die Migration von Cal29-Zellen an (Cattan et al. 2001). Um den Einfluss der Komponenten des Matrigels[®] zu vermindern, ist eine Verwendung von Wachstumsfaktor-reduzierten Matrigel[®] möglich. Dieses beinhaltet geringere Konzentrationen von EGF, insulinähnlichen Faktore-1 (*insulin-like growth factor-1* – IGF-1), Blutplättchen-Wachstumsfaktor (*platelet-derived growth factor* – PDGF), und TGF- β als das herkömmliche Matrigel[®]. Weitere Invasionsversuche unter Verwendung von Wachstumsfaktor-reduzierten Matrigel[®] wären sinnvoll. Die gesteigerte Migration und Invasion im indirekten Ko-Kultur-Modell zeigt, dass sekretierte Chemokine eine bedeutende Rolle bei den Tumor-Stroma-Wechselwirkungen und bei der Tumorprogression spielen. Solche Chemokine könnten auch Angriffspunkte einer Antikörper-Tumorstroma-Therapie sein. So wurde bereits gezeigt, dass die Inhibierung des Fibroblasten-sekretierten Aktivierungsprotein (*fibroblast activating protein* – FAP) das Tumorwachstum mindert (Narra et al. 2007, Santos et al. 2009).

Eine Arbeit von Gaggioli und Mitarbeitern zeigte, dass es im Plattenepithelkarzinom der Haut zu einer kollektiven Migration von Tumorzellen kommt, die von einer „Fibroblasten-Führungszelle“ geleitet werden (Gaggioli et al. 2007). Dies wäre auch im Blasenkarzinom denkbar, müsste aber mit einem direkten Ko-Kultur-Modell untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in der Ko-Kultur von TAF mit beiden Tumorzelllinien IL-8 erhöht ist und durch die Kultivierung mit Cal29CM GM-CSF- und MCP-1- und IL-8-Sekretion gesteigert wird. Daher wurde die migrationsfördernde

Wirkung dieser Faktoren auf die Tumorzellen weiter untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass rekombinantes MCP-1 eine Steigerung der Migration hervorrief, wobei die *low-grade* RT112-Zelllinie stärker auf das Protein reagierte als die Cal29-Zellenlinie. Die Migration der Zellen wurde durch rekombinantes MCP-1 dosisabhängig gesteigert.

Dass die Migration in Blasen-tumorzelllinien durch MCP-1 angeregt wird, wurde auch von Chiu und Mitarbeitern gezeigt (Chiu et al. 2012). Hier wurde jedoch ein *autokriner loop* des MCP-1-Proteins beschrieben. Höher maligne Blasen-tumorzelllinien produzieren dabei mehr MCP-1 als weniger maligne und migrierten auch schneller. Dieser *autokrine loop* könnte durch Fibroblasten-sekretiertes MCP-1 angeregt werden. Der Zytokin-Array des Mediums der Cal29-Zellen zeigte jedoch keine erhöhte MCP-1-Sekretion der Tumorzellen nach Inkubation mit TAF-konditioniertem Medium (TAFCM) (siehe Anhang Abbildung A 2). Auch in anderen Tumorentitäten, wie z.B. dem Hepatokarzinom, wurde gezeigt, dass TAF-sekretiertes MCP-1 die Migration der Tumorzellen erhöhen kann (Dagoussat et al. 2010). Zudem wurde durch Inkubation mit Medium von hoch invasiven Melanom-Zelllinien die Sekretion von IL-8, IL-1 β und MCP-1 durch Fibroblasten verstärkt (Li et al. 2009). Ob auch von (Blasen-tumor-assoziierten) Fibroblasten abgegebenes MCP-1 parakrin auf die Tumorzellen wirkt, müsste nun zusätzlich mit einem inhibitorischen Antikörper oder durch verminderte Expression mittels sh (si) RNA getestet werden.

Da eine Aktivierung der Migration auch bei der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) eine Rolle spielt, wurde geprüft, ob TAFCM die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin in den epithelialen RT112-Zellen induzieren kann. Für die EMT-Versuche wurden nur RT112-Zellen verwendet, da diese im Gegensatz zu Cal29-Zellen E-Cadherin exprimieren. Anhand immunohistochemischer Färbung wurde gezeigt, dass TAFCM-Inkubation die Zahl Vimentin-positiv RT112-Zellen erhöht, die Behandlung jedoch keinen Einfluss auf die E-Cadherin-Expression hatte. Inkubation mit MCP-1 verursachte weder eine Änderung der Vimentin- noch der E-Cadherin-Expression. PCR-Untersuchungen von RT112-Zellen nach viertägiger Inkubation mit MCP-1 deuteten jedoch auf eine erhöhte Vimentin-Expression hin (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise könnten Langzeit-Inkubationen (ein bis zwei Wochen) oder Ko-Kultur-Versuche zu eindeutigeren Ergebnissen führen. Im Mammakarzinom konnten Angelucci und

Mitarbeiter bereits zeigen, dass Ko-Kultivierung mit TAF zu einer Herabregulierung von E-Cadherin und einer Hochregulation von Vimentin in den MCF-7-Zellen führt. Wurden die Zellen jedoch mit normalen Fibroblasten ko-kultiviert, stieg die E-Cadherin-Expression an (Angelucci et al. 2012). Eine Steigerung der Invasion von RT112-Zellen kann sowohl TGF- β allein als auch in Ko-Stimulation mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor-1 (*fibroblast growth factor-1* – aFGF) induzieren, wobei auch erhöhte Vimentin-Expression in den invadierten RT112-Zellen nachweisbar ist (Schulte et al. 2012). Diese Befunde deuten darauf hin, dass EMT durch TAF induzierbar ist. Durch die verstärkte Expression von Vimentin sind die Zellen in der Lage zu migrieren. Das zeigt, dass Fibroblasten Tumorzellen nicht nur durch die Sekretion von Chemokinen, wie MCP-1, sondern auch durch Expressions-Veränderung von malignitätsrelevanten Genen, wie Vimentin, beeinflussen können.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von Faktoren, die von Tumorzellen abgegeben werden und die Fibroblasten aktivieren können. Zu den bekanntesten bereits beschriebenen dieser Faktoren gehören IL-1 α/β und TGF- β . Die Rolle von IL-1 im Tumor ist unklar und wird kontrovers diskutiert. Einerseits scheint es als pro-inflammatorisches Protein die Immunantwort zu unterstützen und somit als Tumorsuppressor zu wirken, andererseits scheint es auch die TAF zu aktivieren, wie es beispielsweise im Plattenepithelkarzinom oder im Ovarialkarzinom gezeigt wurde (Tjomsland et al. 2011, Übersichtsartikel Schauer et al. 2011, Übersichtsartikel Voronov 2013). In den Blasen-tumorzelllinien J82, 5637 und HTB9 wurde die Expression von IL-1 α nachgewiesen (Hedges et al. 1994, Quentmeier et al. 1997, Watanabe und Kobayashi 1994). Das Blut von Blasenkarzinom-Patienten wurde nur in 2 von 30 Fällen positiv auf IL-1 α hin untersucht; 5 von 30 Proben waren positiv auf IL-1 β (Kuo et al. 1998). Seddighzadeh und Mitarbeiter untersuchten sowohl die Expression der IL-1-mRNA mittels RT-PCR als auch das IL-1 α -Protein mit immunhistochemischen Methoden in Blasen-tumorproben. Sie konnten zeigen, dass geringe IL-1 α Mengen im Tumor mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Seddighzadeh et al. 2001 und 2003). Bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass IL-1 β nicht oder nur in sehr geringen Mengen abgegeben wird, beide untersuchten Tumor-Zelllinien jedoch IL-1 β -mRNA exprimierten. Dies steht gleichwohl im Einklang mit den Ergebnissen aus Untersuchungen an Patienten (Kuo et al. 1998). Entsprechend dem höheren invasiven Potenzial sekretierten

die Cal29-Zellen höhere Mengen IL-1 α als RT112-Zellen. Dies widerspricht allerdings den Ergebnissen von Seddighzadesh, da Prognose bei *low-grade* Tumoren meist besser ist als bei *high-grade* Tumoren. Nun konnten in einer neueren Arbeit gezeigt werden, dass die Expression des Transkriptionsfaktors BLCA-4 im Blasenkarzinom mit IL-1 α korreliert (Feng et al. 2012). Da eine hohe BLCA-4-Expression mit einer schlechten Prognose für Blasenkrebspatienten verbunden ist, könnten weitere Untersuchungen zur Rolle von IL-1 α im Blasenkarzinom sinnvoll sein (Zhao et al. 2012).

TGF- β 1-Serumkonzentrationen sind in Blasentumorpatienten höher als in gesunden Menschen (Eder et al. 1996). Allerdings wurde von derselben Gruppe ein Jahr später eine Arbeit veröffentlicht, in der die TGF- β -mRNA in Gewebeproben von Blasenkarzinompatienten untersucht und dort eine verminderte Expression in den Proben festgestellt wurde. Des Weiteren wurde gezeigt, dass TAF der Blase ähnliche Mengen an TGF- β -mRNA produzierten, aber nur geringe Mengen des Proteins ins Medium abgaben (Eder et al. 1997). Die Autoren vermuteten, dass dies an einer *autokrinen* Aufnahme der Fibroblasten von TGF- β liegt (Eder et al. 1997). Außerdem korreliert der Verlust des TGF- β -Rezeptor-1 (TGF- β R1) positiv mit dem Differenzierungsgrad der Blasentumorproben von Patienten (Lee et al. 1999). De-differenzierte Cal29-Zellen exprimieren also möglicherweise kaum oder keinen TGF- β R1. Dadurch würde anderen Zellen, wie z.B. den Fibroblasten, mehr TGF- β zur Aufnahme zur Verfügung stehen. Zudem wurde von Tokunaga und Mitarbeitern gezeigt, dass die verminderte Expression des TGF- β R1 in Proben von Blasentumorpatienten mit einer verminderten Überlebensrate verbunden ist (Tokunaga et al. 1999). In gesunden humanen Blasenmuskelzellen führt die Inkubation mit TGF- β 1 zur Herabregulation von Connexin 43 (Cx 43) (Neuhaus et al. 2009). Da Connexine an der Bildung von Gap-Junctions beteiligt sind, hat deren verminderte Expression einen schlechteren Zell-Zell-Kontakt zur Folge. Auch in den Fibroblasten ist eine solche Wirkung von TGF- β denkbar, wodurch den Zellen das Einwandern in den Blasenmuskel erleichtert würde. Cal29-Zellen sekretierten mehr TGF- β als RT112-Zellen, was mit stärkerem Einfluss auf Fibroblasten einhergeht. Eine verstärkte Sekretion von IL-1 α und TGF- β nach Inkubation der Tumorzellen mit FibroblastenCM konnte jedoch nicht festgestellt werden (Daten zu TGF- β nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass Fibroblasten die Expression von Genen der Tumorzellen, welche wiederum die Malignität der Fibroblasten fördern, nicht beeinflussen können.

Wurden TAF mit Cal29CM kultiviert, so wurde mehr IL-8 abgegeben als nach der Inkubation mit der weniger IL-1 α sekretierenden RT112-Zelllinie. Da IL-8 möglicherweise die Angiogenese fördert, bedeutet dies, dass IL-1 α -Konzentrationen im Tumor mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind, anders als von Seddighzadeh und Kollegen postuliert wurde (Seddighzadeh et al. 2001). Des Weiteren konnte in anderen Arbeiten bereits gezeigt werden, dass der IL-1-Rezeptor auf der Oberfläche von TAF exprimiert wird (Tjomsland et al. 2011). Um die Wirkung von IL-1 α und TGF- β auf die Fibroblasten zu testen, wurde die IL-8- und MMP-2-Sekretion analysiert. Rekombinantes IL-1 α konnte in den Fibroblasten die Sekretion von IL-8 initiieren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Tjomsland und Mitarbeitern im Pankreaskarzinom. Schauer und Kollegen zeigten, dass von Ovarialkarzinomzellen sekretiertes IL-1 β über nuklearen Faktor- κ B (*nuclear factor- κ B* - NF- κ B) die Expression von IL-8 steigert (Schauer et al. 2013). Die Beteiligung des NF- κ B Signalweges wäre auch in den Blasen-TAF denkbar, da ferner MCP-1-Transkription über NF- κ B aktiviert wird (Martin et al. 1997).

TNF- α ist ein weiterer Faktor, welcher die IL-8-Sekretion beeinflusst (John et al. 1998). In dieser Arbeit wurden jedoch keine weiteren Studien mit TNF- α durchgeführt, da es hauptsächlich von Makrophagen sekretiert wird. Allerdings wurde im Serum von Blasentumorpatienten eine erhöhte TNF- α Konzentration nachgewiesen (Jeong et al. 2004). Ferner produzieren beispielsweise Mammakarzinomzellen TNF- α , was möglicherweise auch für Blasenkarzinomzellen zutreffen könnte, aber noch nicht untersucht wurde (Stuelten et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit hatte die Inkubation der Fibroblasten mit TGF- β keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-8, führte aber zu einer erhöhten Sekretion von Pro-MMP-2. Zudem scheint IL-1 α bei einer Konzentration von 10 ng/ml in den HFF die MMP-9-Sekretion leicht zu erhöhen. Tumorzell-sekretiertes TGF- β induzierte die Pro-MMP-2 Sekretion der Fibroblasten. Auch in anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass TGF- β MMP-2 Expression erhöhen kann (Overall et al. 1991, Kim et al. 2005, Hawinkel et al 2014). In den Mammakarzinomzellen MCF10A führte die TGF- β Inkubation zur Aktivierung von p38 MAPK, welches die Expression von MMP-2 (-9) anregte (Kim et al. 2005). Da weder rekombinantes IL-1 α noch TGF- β eine Aktivierung von Pro-MMP-2 bewirkte, scheint sich in den Medien der Tumorzellen ein weiterer Faktor zu befinden, welcher die MMPs aktiviert oder Fibroblasten anregt, Pro-MMP-2 zu MMP-2 zu wandeln. Wie schon erwähnt können aber auch andere

Faktoren, wie EMMPRIN die Abgabe von Pro-MMP-2 auslösen. Dies zeigt zudem, wie komplex das System der Tumor-Fibroblasten-Interaktionen ist.

6 Schlussfolgerungen

Die im Rahmen dieser Arbeit demonstrierten Interaktionen von Fibroblasten, vor allem Tumor-assoziierten Fibroblasten (TAF), mit Blasenkarzinomzellen fördern die Malignität der Tumorzellen. Dies bestätigt die Bedeutung der Forschungen an TAF, welche in den letzten Jahren in den Fokus gerückt ist. Es wird in Zukunft attraktiv sein, Medikamente zu entwickeln, welche sich spezifisch gegen Funktionen und Proteinen von TAF richten. Eine Angriffsmöglichkeit solcher Pharmaka bieten Fibroblasten-sekretierte Zytokine. Im Blasenkarzinom könnte, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, Interleukin-8 (*interleukine-8* – IL-8), Matrix-Metalloproteinase-2 (*matrix metalloproteinase-2* – MMP-2) oder Makrophagen-Chemotaktisches Protein-1 (*monocyte chemotactic protein-1* – MCP-1) ein geeignetes Ziel sein. Da diese Faktoren auch bei der Angiogenese eine Rolle spielen, ist ein Ausbau des Zwei-Zell-Ko-Kulturmodells zu einem Drei-Zell-Modell durch die zusätzliche Verwendung von Endothelzellen sinnvoll. IL-8, welches keine Wirkung auf die Tumorzellen zeigte, könnte die Rekrutierung von Endothelzellen fördern, wie in anderen Arbeiten beschrieben wurde.

Andererseits sind es die Tumorzellen, welche ihre Mikroumgebung beeinflussen. Die meisten Forschungsarbeiten gehen davon aus, dass die Tumorzellen die sich in ihrer Nähe befindenden Fibroblasten aktivieren. Tumorzell-sekretierte Faktoren, wie IL-1 oder Transformierender Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor- β* – TGF- β) können Fibroblasten aktivieren. Dieses konnte in verschiedenen Arbeiten und auch in dieser Arbeit in Blasenkarzinomzellen gezeigt werden. Hier fiel auf, dass der Differenzierungsgrad der Tumorzellen eine Rolle spielt. Die de-differenzierten „*high-grade*“ Cal29-Zellen gaben höhere Konzentrationen an IL-1 α und TGF- β ab als die gut differenzierten RT112-Zellen. So üben die Cal29-Zellen auch einen größeren Einfluss auf die Fibroblasten aus, wie man unter anderem in der IL-8-Sekretion der Fibroblasten erkennen konnte.

Der zudem in der vorliegenden Arbeit betrachtete Unterschied zwischen nicht-aktiven „normalen“ humanen Vorhaut-Fibroblasten (*human foreskin fibroblasts* – HFF) und Blasentumor-assoziierten Fibroblasten war vor allem bei der Migration der Tumorzellen zu erkennen. So konnte TAF, jedoch nicht HFF die Migration der „*low-grade*“ RT112-Zellen verstärken. Ferner war die, durch Tumorzellen aktivierte, IL-8-Sekretion der TAF höher als

die der HFF. Die verstärkte Untersuchung der veränderten Merkmale zwischen nicht-aktiven Fibroblasten und TAF ist wichtig für die TAF-Identifizierung und Anti-TAF-Therapie. Hier könnte das etablierte Ko-Kulturmodell verwendet werden und die Proteinexpression weiter charakterisiert werden.

Weiterhin ist es sinnvoll, die Signaltransduktion der Tumorzellen und Fibroblasten zu untersuchen. Hierfür wäre der Einsatz des konditionierten Mediums, welche in der vorliegenden Arbeit generiert wurde, möglich.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adhim Z, Matsuoka T, Bito T, Shigemura K, Lee KM, Kawabata M, Fujisawa M, Nibu K, Shirakawa T. 2011. In vitro and in vivo inhibitory effect of three Cox-2 inhibitors and epithelial-to-mesenchymal transition in human bladder cancer cell lines. *Br J Cancer* 105: 393-402.
- Alexa A, Baderca F, Lighezan R, Izvernariu D. 2009. Myofibroblasts reaction in urothelial carcinomas. *Rom J Morphol Embryol* 50: 639-643.
- Allen M, Louise Jones J. 2011. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol* 223: 162-176.
- Amann B, Perabo FG, Wirger A, Hugenschmidt H, Schultze-Seemann W. 1998. Urinary levels of monocyte chemo-attractant protein-1 correlate with tumour stage and grade in patients with bladder cancer. *Br J Urol* 82: 118-121.
- Angelucci C, Maulucci G, Lama G, Proietti G, Colabianchi A, Papi M, Maiorana A, De Spirito M, Micera A, Balzamino OB, Di Leone A, Masetti R, Sica G. 2012. Epithelial-stromal interactions in human breast cancer: effects on adhesion, plasma membrane fluidity and migration speed and directness. *PLoS One* 7: e50804.
- Angrisano T, Pero R, Peluso S, Keller S, Sacchetti S, Bruni CB, Chiariotti L, Lembo F. 2010. LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC Microbiology* 10: 172.
- Barillé S, Bataille R, Rapp MJ, Harausseau JL, Amiot M. 1999. Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation. *J Immunol* 163: 5723-5728.
- Bergmann U, Tuuttila A, Stetler-Stevenson WG, Tryggvason K. 1995. Autolytic activation of recombinant human 72 kilodalton type IV collagenase. *Biochemistry* 34: 2819-2825.
- Billips BK, Forrestal SG, Rycyk MT, Johnson JR, Klumpp DJ, Schaeffer AJ. 2007. Modulation of host innate immune response in the bladder by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75: 5353-5360.
- Bouchelouche K, Alvarez S, Horn T, Nordling J, Bouchelouche P. 2006. Human detrusor smooth muscle cells release interleukin-6, interleukin-8, and RANTES in response to proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Urology* 67: 214-219.
- Bouchelouche K, Alvarez S, Andersen L, Nordling J, Horn T, Bouchelouche P. 2004. Monocyte chemoattractant protein-1 production by human detrusor smooth muscle cells. *J Urol* 171: 462-466.

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Briest F, Berndt A, Clement J, Junker K, Eggeling F, Grimm S, Friedrich K. 2012. Tumor-stroma interactions in tumorigenesis: lessons from stem cell biology. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 1871-1887.
- Brown RD, Jones GM, Laird RE, Hudson P, Long CS. 2007. Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 200-205.
- Burke JM, Lamm DL, Meng MV, Nemunaitis JJ, Stephenson JJ, Arseneau JC, Aimi J, Lerner S, Yeung AW, Kazarian T, Maslyar DJ, McKiernan JM. 2012. A first in human phase 1 study of CG0070, a GM-CSF expressing oncolytic adenovirus, for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol* 188: 2391-2397.
- Busch S, Rydén L, Stål O, Jirström K, Landberg G. 2012. Low ERK phosphorylation in cancer-associated fibroblasts is associated with tamoxifen resistance in premenopausal breast cancer. *PLoS One* 7: e45669.
- Bussolino F, Ziche M, Wang JM, Alessi D, Morbidelli L, Cremona O, Bosia A, Marchisio PC, Mantovani A. 1991. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest* 87: 986-995.
- Cattan N, Rochet N, Mazeau C, Zanghellini E, Mari B, Chauzy C, Stora de Novion H, Amiel J, Lagrange JL, Rossi B, Gioanni J. 2001. Establishment of two new human bladder carcinoma cell lines, CAL 29 and CAL 185. Comparative study of cell scattering and epithelial to mesenchyme transition induced by growth factors. *Br J Cancer* 85: 1412-1417.
- Chambers M, Kirkpatrick G, Evans M, Gorski G, Foster S, Borghaei RC. 2013. IL-4 inhibition of IL-1 induced Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression in human fibroblasts involves decreased AP-1 activation via negative crosstalk involving of Jun N-terminal kinase (JNK). *Exp Cell Res* 319: 1398-1408.
- Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. 2002. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12877-12882.
- Chenard MP, Lutz Y, Mechine-Neuville A, Stoll I, Bellocq JP, Rio MC, Basset P. 1999. Presence of high levels of MT1-MMP protein in fibroblastic cells of human invasive carcinomas. *Int J Cancer* 82: 208-212.
- Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Williamson SR, Lopez-Beltran A, Montironi R. 2011. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Hum Pathol* 42: 455-481.

- Chiu HY, Sun KH, Chen SY, Wang HH, Lee MY, Tsou YC, Jwo SC, Sun GH, Tang SJ. 2012. Autocrine CCL2 promotes cell migration and invasion via PKC activation and tyrosine phosphorylation of paxillin in bladder cancer cells. *Cytokine* 59: 423-432.
- Chuang CK, Pang ST, Chuang TJ, Liao SK. 2010. Profiling of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases proteins in bladder urothelial carcinoma. *Oncol Lett* 1: 691-695.
- Cirri P, Chiarugi P. 2011. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res* 1: 482-497.
- Conti I, Rollins BJ. 2004. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol* 14: 149-154.
- Dagouassat M, Suffee N, Hlawaty H, Haddad O, Charni F, Laguillier C, Vassy R, Martin L, Schischmanoff PO, Gattegno L, Oudar O, Sutton A, Charnaux N. 2010. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 secreted by hepatic myofibroblasts promotes migration and invasion of human hepatoma cells. *Int J Cancer* 126: 1095-1108.
- Dehnavi E, Soheili ZS, Samiei S, Ataei Z, Aryan H. 2009. The effect of TGF-beta2 on MMP-2 production and activity in highly metastatic human bladder carcinoma cell line 5637. *Cancer Invest* 27: 568-574.
- Depner S, Lederle W, Gutschalk C, Linde N, Zajonz A, Mueller MM. 2012. Cell type specific interleukin-6 induced responses in tumor keratinocytes and stromal fibroblasts are essential for invasive growth. *Int J Cancer*.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29: 313-326.
- Dudás J, Fullár A, Bitsche M, Schartinger V, Kovalszky I, Sprinzl GM, Riechelmann H. 2011. Tumor-produced, active interleukin-1 β regulates gene expression in carcinoma-associated fibroblasts. *Exp Cell Res* 317: 2222-2229.
- Dvorak HF. 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315: 1650-1659.
- Eck SM, Côté AL, Winkelman WD, Brinckerhoff CE. 2009. CXCR4 and matrix metalloproteinase-1 are elevated in breast carcinoma-associated fibroblasts and in normal mammary fibroblasts exposed to factors secreted by breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7: 1033-1044.
- Eder IE, Stenzl A, Hobisch A, Cronauer MV, Bartsch G, Klocker H. 1996. Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 in serum and urine from patients with bladder carcinoma. *J Urol* 156: 953-957.

- Eder IE, Stenzl A, Hobisch A, Cronauer MV, Bartsch G, Klocker H. 1997. Expression of transforming growth factors beta-1, beta 2 and beta 3 in human bladder carcinomas. *Br J Cancer* 75: 1753-1760.
- Enkelmann A, Heinzelmann J, von Eggeling F, Walter M, Berndt A, Wunderlich H, Junker K. 2011. Specific protein and miRNA patterns characterise tumour-associated fibroblasts in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 137: 751-759.
- Feng C, Wu Z, Guo T, Jiang H, Guan M, Zhang Y, Wen H, Ding Q. 2012. BLCA-4 expression is related to MMP-9, VEGF, IL-1 α and IL-8 in bladder cancer but not to PEDF, TNF- α or angiogenesis. *Pathol Biol (Paris)* 60: e36-40.
- Fong L, Kwek SS, O'Brien S, Kavanagh B, McNeel DG, Weinberg V, Lin AM, Rosenberg J, Ryan CJ, Rini BI, Small EJ. 2009. Potentiating endogenous antitumor immunity to prostate cancer through combination immunotherapy with CTLA4 blockade and GM-CSF. *Cancer Res* 69: 609-615.
- Fonsatti E, Altomonte M, Coral S, Cattarossi I, Nicotra MR, Gasparollo A, Natali PG, Maio M. 1997. Tumour-derived interleukin 1alpha (IL-1alpha) up-regulates the release of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) by endothelial cells. *Br J Cancer* 76: 1255-1261.
- Friedlander TW, Premasekharan G, Paris PL. 2013. Looking back, to the future of circulating tumor cells. *Pharmacol Ther.*
- Fullár A, Kovalszky I, Bitsche M, Romani A, Schartinger VH, Sprinzl GM, Riechelmann H, Dudás J. 2012. Tumor cell and carcinoma-associated fibroblast interaction regulates matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res* 318: 1517-1527.
- Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E. 2007. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 9: 1392-1400.
- Gao MQ, Kim BG, Kang S, Choi YP, Park H, Kang KS, Cho NH. 2010. Stromal fibroblasts from the interface zone of human breast carcinomas induce an epithelial-mesenchymal transition-like state in breast cancer cells in vitro. *J Cell Sci* 123: 3507-3514.
- Georganas C, Liu H, Perlman H, Hoffmann A, Thimmapaya B, Pope RM. 2000. Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J Immunol* 165: 7199-7206.
- Gerhards S, Jung K, Koenig F, Daniltchenko D, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA. 2001. Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma. *Urology* 57: 675-679.

- Gout S, Huot J. 2008. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron* 1: 69-83.
- Green CE, Liu T, Montel V, Hsiao G, Lester RD, Subramaniam S, Gonias SL, Klemke RL. 2009. Chemoattractant signaling between tumor cells and macrophages regulates cancer cell migration, metastasis and neovascularization. *PLoS One* 4: e6713.
- Gutschalk CM, Yanamandra AK, Linde N, Meides A, Depner S, Mueller MM. 2013. GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression. *Cancer Med* 2: 117-129.
- Hawinkels LJ, Paauwe M, Verspaget HW, Wiercinska E, van der Zon JM, van der Ploeg K, Koelink PJ, Lindeman JH, Mesker W, Ten Dijke P, Sier CF. 2014. Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF- β signaling in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* 33: 97-107.
- Hedges S, Agace W, Svensson M, Sjögren AC, Ceska M, Svanborg C. 1994. Uroepithelial cells are part of a mucosal cytokine network. *Infect Immun* 62: 2315-2321.
- Henderson N, Markwick LJ, Elshaw SR, Freyer AM, Knox AJ, Johnson SR. 2007. Collagen I and thrombin activate MMP-2 by MMP-14-dependent and -independent pathways: implications for airway smooth muscle migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L1030-1038.
- Higano CS, Corman JM, Smith DC, Centeno AS, Steidle CP, Gittleman M, Simons JW, Sacks N, Aimi J, Small EJ. 2008. Phase 1/2 dose-escalation study of a GM-CSF-secreting, allogeneic, cellular immunotherapy for metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 113: 975-984.
- Hu C, Wang Z, Zhai L, Yang M, Shan L, Chai C, Liu M, Wang L. 2013. Effects of cancer-associated fibroblasts on the migration and invasion abilities of SGC-7901 gastric cancer cells. *Oncol Lett* 5: 609-612.
- Hung TT, Wang H, Kingsley EA, Risbridger GP, Russell PJ. 2008. Molecular profiling of bladder cancer: involvement of the TGF-beta pathway in bladder cancer progression. *Cancer Lett* 265: 27-38.
- Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU, Kim HY. 2004. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Res Ther* 6: R120-128.
- Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. 2010. Bladder cancer in 2010: how far have we come? *CA Cancer J Clin* 60: 244-272.
- Jenkins G. 2008. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1068-1078.

- Jeong P, Kim EJ, Kim EG, Byun SS, Kim CS, Kim WJ. 2004. Association of bladder tumors and GA genotype of -308 nucleotide in tumor necrosis factor- α promoter with greater tumor necrosis factor- α expression. *Urology* 64: 1052-1056.
- John M, Au BT, Jose PJ, Lim S, Saunders M, Barnes PJ, Mitchell JA, Belvisi MG, Chung KF. 1998. Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th-2 cytokines and corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 84-90.
- Ju D, Sun D, Xiu L, Meng X, Zhang C, Wei P. 2012. Interleukin-8 is associated with adhesion, migration and invasion in human gastric cancer SCG-7901 cells. *Med Oncol* 29: 91-99.
- Jung DW, Che ZM, Kim J, Kim K, Kim KY, Williams D. 2010. Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. *Int J Cancer* 127: 332-344.
- Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. 1993. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 159: 197-207.
- Kalluri R, Zeisberg M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 392-401.
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420-1428.
- Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. 2013. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol* 25: 76-84.
- Kazes I, Delarue F, Hagège J, Bouzahir-Sima L, Rondeau E, Sraer JD, Nguyen G. 1998. Soluble latent membrane-type 1 matrix metalloprotease secreted by human mesangial cells is activated by urokinase. *Kidney Int* 54: 1976-1984.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141: 52-67.
- Kim ES, Kim MS, Moon A. 2005. Transforming growth factor (TGF)- β in conjunction with H-ras activation promotes malignant progression of MCF10A breast epithelial cells. *Cytokine* 29: 84-91.
- Koga K, Aoki M, Sameshima T, Hamasaki M, Egawa N, Seiki M, Toole BP, Suzumiya J, Nabeshima K. 2011. Synthetic emmprin peptides inhibit tumor cell-fibroblast interaction-stimulated upregulation of MMP-2 and tumor cell invasion. *Int J Oncol* 39: 657-664.
- Kolář M, Szabo P, Dvořánková B, Lacina L, Gabius HJ, Strnad H, Sáčková J, Vlček C, Plzák J, Chovanec M, Cada Z, Betka J, Fík Z, Pačes J, Kovářová H, Motlík J, Jarkovská K, Smetana K. 2012. Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biol Cell* 104: 738-751.

- Koçak H, Oner-Iyidoğan Y, Koçak T, Oner P. 2004. Determination of diagnostic and prognostic values of urinary interleukin-8, tumor necrosis factor-alpha, and leukocyte arylsulfatase-A activity in patients with bladder cancer. *Clin Biochem* 37: 673-678.
- Kumar B, Koul S, Petersen J, Khandrika L, Hwa JS, Meacham RB, Wilson S, Koul HK. 2010. p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity. *Cancer Res* 70: 832-841.
- Kuo JY, Ohmoto Y, Yoshida O. 1998. Interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta production in peripheral whole blood from patients with urological cancer. *Hinyokika Kyo* 44: 397-402.
- Lang A, Lahav M, Sakhnini E, Barshack I, Fidler HH, Avidan B, Bardan E, Hershkoviz R, Bar-Meir S, Chowers Y. 2004. Allicin inhibits spontaneous and TNF-alpha induced secretion of proinflammatory cytokines and chemokines from intestinal epithelial cells. *Clin Nutr* 23: 1199-1208.
- Lang K, Niggemann B, Zanker KS, Entschladen F. 2002. Signal processing in migrating T24 human bladder carcinoma cells: role of the autocrine interleukin-8 loop. *Int J Cancer* 99: 673-680.
- Lebret SC, Newgreen DF, Thompson EW, Ackland ML. 2007. Induction of epithelial to mesenchymal transition in PMC42-LA human breast carcinoma cells by carcinoma-associated fibroblast secreted factors. *Breast Cancer Res* 9: R19.
- Lee DH, Yang SC, Hong SJ, Chung BH, Chung HJ, Tokunaga H, Kim IY, Song YS, Lerner SP, Morton RA. 1999. The loss of expression of transforming growth factor-beta receptors correlates with the histopathologic tumor grade in bladder transitional cell carcinoma patients. *Yonsei Med J* 40: 118-123.
- Lee SJ, Park SS, Cho YH, Park K, Kim EJ, Jung KH, Kim SK, Kim WJ, Moon SK. 2008. Activation of matrix metalloproteinase-9 by TNF-alpha in human urinary bladder cancer HT1376 cells: the role of MAP kinase signaling pathways. *Oncol Rep* 19: 1007-1013.
- Leef G, Thomas SM. 2013. Molecular communication between tumor-associated fibroblasts and head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 49: 381-386.
- Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Harris AL. 2000. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* 190: 430-436.
- Leonardi GC, Candido S, Cervello M, Nicolosi D, Raiti F, Travali S, Spandidos DA, Libra M. 2012. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma (review). *Int J Oncol* 40: 1733-1747.

- Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. 2003. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 170: 3369-3376.
- Li L, Dragulev B, Zigrino P, Mauch C, Fox JW. 2009. The invasive potential of human melanoma cell lines correlates with their ability to alter fibroblast gene expression in vitro and the stromal microenvironment in vivo. *Int J Cancer* 125: 1796-1804.
- Lin TH, Liu HH, Tsai TH, Chen CC, Hsieh TF, Lee SS, Lee YJ, Chen WC, Tang CH. 2013. CCL2 increases $\alpha\beta 3$ integrin expression and subsequently promotes prostate cancer migration. *Biochim Biophys Acta* 1830: 4917-4927.
- Lin ZY, Chuang YH, Chuang WL. 2012. Cancer-associated fibroblasts up-regulate CCL2, CCL26, IL6 and LOXL2 genes related to promotion of cancer progression in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Pharmacother* 66: 525-529.
- Lindemann-Docter K, Knüchel R. 2008. [Update on urothelial carcinoma histopathology]. *Pathologe* 29: 331-338.
- Liotta LA, Kohn EC. 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411: 375-379.
- Loeffler M, Krüger JA, Niethammer AG, Reisfeld RA. 2006. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest* 116: 1955-1962.
- Luo Y, Lan L, Jiang YG, Zhao JH, Li MC, Wei NB, Lin YH. 2013. Epithelial-mesenchymal transition and migration of prostate cancer stem cells is driven by cancer-associated fibroblasts in an HIF-1 α / β -catenin-dependent pathway. *Mol Cells* 36: 138-144.
- Margel D, Pevsner-Fischer M, Pevsner-Fischer M, Baniel J, Yossepowitch O, Cohen IR. 2011. Stress proteins and cytokines are urinary biomarkers for diagnosis and staging of bladder cancer. *Eur Urol* 59: 113-119.
- Martin T, Cardarelli PM, Parry GC, Felts KA, Cobb RR. 1997. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur J Immunol* 27: 1091-1097.
- Masters JR, Hepburn PJ, Walker L, Highman WJ, Trejdosiewicz LK, Povey S, Parkar M, Hill BT, Riddle PR, Franks LM. 1986. Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res* 46: 3630-3636.
- Matsuo Y, Ochi N, Sawai H, Yasuda A, Takahashi H, Funahashi H, Takeyama H, Tong Z, Guha S. 2009. CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 α co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 124: 853-861.

- McConkey DJ, Choi W, Marquis L, Martin F, Williams MB, Shah J, Svatek R, Das A, Adam L, Kamat A, Siefker-Radtke A, Dinney C. 2009. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28: 335-344.
- McDougall S, Dallon J, Sherratt J, Maini P. 2006. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 364: 1385-1405.
- Merritt WM, Lin YG, Spannuth WA, Fletcher MS, Kamat AA, Han LY, Landen CN, Jennings N, De Geest K, Langley RR, Villares G, Sanguino A, Lutgendorf SK, Lopez-Berestein G, Bar-Eli MM, Sood AK. 2008. Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth. *J Natl Cancer Inst* 100: 359-372.
- Mian BM, Dinney CP, Bermejo CE, Sweeney P, Tellez C, Yang XD, Gudas JM, McConkey DJ, Bar-Eli M. 2003. Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor-kappaB. *Clin Cancer Res* 9: 3167-3175.
- Min C, Eddy SF, Sherr DH, Sonenshein GE. 2008. NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *J Cell Biochem* 104: 733-744.
- Mishra P, Banerjee D, Ben-Baruch A. 2011. Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy. *J Leukoc Biol* 89: 31-39.
- Morales A, Eidinger D, Bruce AW. 2002. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. 1976. *J Urol* 167: 891-893; discussion 893-895.
- Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Brilloff S, Walter J, Karnatz N, Lamszus K, Rogiers X, Broering DC. 2007. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am J Pathol* 171: 1608-1618.
- Narra K, Mullins SR, Lee HO, Strzemkowski-Brun B, Magalong K, Christiansen VJ, McKee PA, Egleston B, Cohen SJ, Weiner LM, Meropol NJ, Cheng JD. 2007. Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 6: 1691-1699.
- Neuhaus J, Heinrich M, Schwalenberg T, Stolzenburg JU. 2009. TGF-beta1 inhibits Cx43 expression and formation of functional syncytia in cultured smooth muscle cells from human detrusor. *Eur Urol* 55: 491-497.
- Ninck S, Reisser C, Dyckhoff G, Helmke B, Bauer H, Herold-Mende C. 2003. Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 106: 34-44.

- Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G, Winder T, Yang D, LaBonte MJ, Wilson PM, Ladner RD, Lenz HJ. 2011. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer* 128: 2038-2049.
- Okochi M, Matsumura T, Yamamoto AS, Nakayama E, Jimbow K, Honda H. 2013. Cell behavior observation and gene expression analysis of melanoma associated with stromal fibroblasts in a three-dimensional magnetic cell culture array. *Biotechnol Prog* 29: 135-142.
- Overall CM, Wrana JL, Sodek J. 1991. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* 266: 14064-14071.
- Papadimitropoulou A, Mamalaki A. 2013. The glycosylated IgII extracellular domain of EMMPRIN is implicated in the induction of MMP-2. *Mol Cell Biochem* 379: 107-113.
- Paraiso KH, Smalley KS. 2013. Fibroblast-mediated drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol* 85: 1033-1041.
- Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4: 617-629.
- Perabo FG, Kamp S, Schmidt D, Lindner H, Steiner G, Mattes RH, Wirger A, Pegelow K, Albers P, Kohn EC, von Ruecker A, Mueller SC. 2001. Bladder cancer cells acquire competent mechanisms to escape Fas-mediated apoptosis and immune surveillance in the course of malignant transformation. *Br J Cancer* 84: 1330-1338.
- Pitelka DR, Hamamoto ST, Taggart BN. 1980. Basal lamina and tissue recognition in malignant mammary tumors. *Cancer Res* 40: 1600-1611.
- Quentmeier H, Zaborski M, Drexler HG. 1997. The human bladder carcinoma cell line 5637 constitutively secretes functional cytokines. *Leuk Res* 21: 343-350.
- Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. 2007. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett* 256: 137-165.
- Reis ST, Leite KR, Piovesan LF, Pontes-Junior J, Viana NI, Abe DK, Crippa A, Moura CM, Adonias SP, Srougi M, Dall'Oglio MF. 2012. Increased expression of MMP-9 and IL-8 are correlated with poor prognosis of Bladder Cancer. *BMC Urol* 12: 18.
- Resnick MJ, Bassett JC, Clark PE. 2013. Management of superficial and muscle-invasive urothelial cancers of the bladder. *Curr Opin Oncol* 25: 281-288.
- Richter P, Umbreit C, Franz M, Berndt A, Grimm S, Uecker A, Böhmer FD, Kosmehl H. 2011. EGF/TGF β 1 co-stimulation of oral squamous cell carcinoma cells causes an epithelial-mesenchymal transition cell phenotype expressing laminin 332. *J Oral Pathol Med* 40: 46-54.

- Rippaus N. 2011. Inducible epithelial mesenchymal transition (EMT) model in urinary bladder carcinoma [MasterThesis]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister der Länder e.V. (Hrsg). 2012. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8.Ausgabe. Berlin
- Roy R, Yang J, Moses MA. 2009. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* 27: 5287-5297.
- Saeb-Parsy K, Veerakumarasivam A, Wallard MJ, Thorne N, Kawano Y, Murphy G, Neal DE, Mills IG, Kelly JD. 2008. MT1-MMP regulates urothelial cell invasion via transcriptional regulation of Dickkopf-3. *Br J Cancer* 99: 663-669.
- Santos AM, Jung J, Aziz N, Kissil JL, Puré E. 2009. Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J Clin Invest* 119: 3613-3625.
- Schauer IG, Sood AK, Mok S, Liu J. 2011. Cancer-associated fibroblasts and their putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 13: 393-405.
- Schauer IG, Zhang J, Xing Z, Guo X, Mercado-Urbe I, Sood AK, Huang P, Liu J. 2013. Interleukin-1 β promotes ovarian tumorigenesis through a p53/NF- κ B-mediated inflammatory response in stromal fibroblasts. *Neoplasia* 15: 409-420.
- Schulte J, Weidig M, Balzer P, Richter P, Franz M, Junker K, Gajda M, Friedrich K, Wunderlich H, Östman A, Petersen I, Berndt A. 2012. Expression of the E-cadherin repressors Snail, Slug and Zeb1 in urothelial carcinoma of the urinary bladder: relation to stromal fibroblast activation and invasive behaviour of carcinoma cells. *Histochem Cell Biol* 138: 847-860.
- Seddighzadeh M, Steineck G, Jansson O, Larsson P, Wijkström H, Adolfsson J, Portwood N, Hansson J, Linder S. 2001. Low interleukin-1alpha messenger RNA levels predict decreased overall survival time of patients with urinary bladder carcinoma. *Br J Cancer* 84: 329-334.
- Seddighzadeh M, Larsson P, Ulfgren AC, Onelöv E, Berggren P, Tribukait B, Torstensson A, Norming U, Wijkström H, Linder S, Steineck G. 2003. Low IL-1alpha expression in bladder cancer tissue and survival. *Eur Urol* 43: 362-368.
- Seiki M. 2003. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett* 194: 1-11.
- Sheryka E, Wheeler MA, Hausladen DA, Weiss RM. 2003. Urinary interleukin-8 levels are elevated in subjects with transitional cell carcinoma. *Urology* 62: 162-166.
- Shimonishi M, Takahashi I, Terao F, Komatsu M, Kikuchi M. 2010. Induction of MMP-2 at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament. *J Periodontal Res* 45: 309-316.

- Shintani Y, Sawada Y, Inagaki T, Kohjimoto Y, Uekado Y, Shinka T. 2007. Intravesical instillation therapy with bacillus Calmette-Guérin for superficial bladder cancer: study of the mechanism of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *Int J Urol* 14: 140-146.
- Spiekstra SW, Breetveld M, Rustemeyer T, Scheper RJ, Gibbs S. 2007. Wound-healing factors secreted by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in skin substitutes. *Wound Repair Regen* 15: 708-717.
- Spitler LE, Weber RW, Allen RE, Meyer J, Cruickshank S, Garbe E, Lin HY, Soong SJ. 2009. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, sargramostim) administered for 3 years as adjuvant therapy of stages II(T4), III, and IV melanoma. *J Immunother* 32: 632-637.
- Staack A, Badendieck S, Schnorr D, Loening SA, Jung K. 2006. Combined determination of plasma MMP2, MMP9, and TIMP1 improves the non-invasive detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *BMC Urol* 6: 19.
- Sternlicht MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516.
- Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG, Roberts AB. 2005. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *J Cell Sci* 118: 2143-2153.
- Subramaniam KS, Tham ST, Mohamed Z, Woo YL, Mat Adenan NA, Chung I. 2013. Cancer-associated fibroblasts promote proliferation of endometrial cancer cells. *PLoS One* 8: e68923.
- Szarvas T, Singer BB, Becker M, Vom Dorp F, Jäger T, Szendroi A, Riesz P, Romics I, Rübber H, Ergün S. 2011. Urinary matrix metalloproteinase-7 level is associated with the presence of metastasis in bladder cancer. *BJU Int* 107: 1069-1073.
- Tjomsland V, Spångeus A, Vålilä J, Sandström P, Borch K, Druid H, Falkmer S, Falkmer U, Messmer D, Larsson M. 2011. Interleukin 1 α sustains the expression of inflammatory factors in human pancreatic cancer microenvironment by targeting cancer-associated fibroblasts. *Neoplasia* 13: 664-675.
- Tlsty TD, Coussens LM. 2006. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* 1: 119-150.
- Tokunaga H, Lee DH, Kim IY, Wheeler TM, Lerner SP. 1999. Decreased expression of transforming growth factor beta receptor type I is associated with poor prognosis in bladder transitional cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 5: 2520-2525.
- Tseng-Rogenski S, Liebert M. 2009. Interleukin-8 is essential for normal urothelial cell survival. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F816-821.
- Urquidi V, Chang M, Dai Y, Kim J, Wolfson ED, Goodison S, Rosser CJ. 2012. IL-8 as a urinary biomarker for the detection of bladder cancer. *BMC Urol* 12: 12.

- van der Meijden AP. 1998. Bladder cancer. *BMJ* 317: 1366-1369.
- Visse R, Nagase H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839.
- Voronov E, Dotan S, Krelin Y, Song X, Elkabets M, Carmi Y, Rider P, Idan Cohen, Romzova M, Kaplanov I, Apte RN. 2013. Unique Versus Redundant Functions of IL-1 α and IL-1 β in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 4: 177.
- Wallard MJ, Pennington CJ, Veerakumarasivam A, Burt G, Mills IG, Warren A, Leung HY, Murphy G, Edwards DR, Neal DE, Kelly JD. 2006. Comprehensive profiling and localisation of the matrix metalloproteinases in urothelial carcinoma. *Br J Cancer* 94: 569-577.
- Wang P, Nishitani MA, Tanimoto S, Kishimoto T, Fukumori T, Takahashi M, Kanayama HO. 2007. Bladder cancer cell invasion is enhanced by cross-talk with fibroblasts through hepatocyte growth factor. *Urology* 69: 780-784.
- Watanabe N, Kobayashi Y. 1994. Selective release of a processed form of interleukin 1 alpha. *Cytokine* 6: 597-601.
- Waugh DJ, Wilson C. 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14: 6735-6741.
- Wu MH, Hong HC, Hong TM, Chiang WF, Jin YT, Chen YL. 2011. Targeting galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts inhibits oral squamous cell carcinoma metastasis by downregulating MCP-1/CCL2 expression. *Clin Cancer Res* 17: 1306-1316.
- Xue YJ, Lu Q, Sun ZX. 2011. CD147 overexpression is a prognostic factor and a potential therapeutic target in bladder cancer. *Med Oncol* 28: 1363-1372.
- Zhang J, Liu J. 2013. Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 137: 200-215.
- Zhang W, Matrisian LM, Holmbeck K, Vick CC, Rosenthal EL. 2006. Fibroblast-derived MT1-MMP promotes tumor progression in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 6: 52.
- Zhao Q, Shen WH, Chen ZW, Zhou ZS, Ji HX. 2012. High expression level of BLCA-4 correlates with poor prognosis in human bladder cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 5: 422-427.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Tumorzellen und Tumorstroma.	3
Abbildung 1.2: Hypothesen zur Herkunft von TAF.	5
Abbildung 1.3: Darstellung einiger Faktoren, die von TAF synthetisiert werden und auf andere Zellen wirken.	6
Abbildung 1.4: Interaktionen von Fibroblasten und Tumorzellen.	10
Abbildung 1.5: Aufbau der Matrix Metalloproteinasen.	11
Abbildung 1.6: Epitheliale und mesenchymale Markerproteine der EMT und damit assoziierte zelluläre Eigenschaften.	12
Abbildung 1.7: Chematischer Aufbau der Blase mit den verschiedenen Tumor (T-) Stadien.	14
Abbildung 1.8: Wichtige genetische und epigenetische Veränderungen beim Blasenkarzinom.	15
Abbildung 9: Ablauf der quantitativen PCR.....	34
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Zytokin-Arrays bei gebundenem Zytokin und Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes durch Chemolumineszenz.....	35
Abbildung 11: Aufbau eines Durchflusszytometers	36
Abbildung 3.12: Aufbau der „Boyden-Kammer“ mit Fibroblasten und Tumorzellen	43
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung der Blasen-tumor-Zelllinien RT112 und Cal29.....	46

Abbildung 14: IL-8-ELISA Messung in Ko-Kulturen von Fibroblasten und Blasentumorzellen (n=2).	48
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Monokultur und Ko-Kultur von Cal29-Zellen und HFF.	49
Abbildung 16: Pro-MMP-2-Sekretion von Monokulturen und Ko-Kulturen von Blasentumorzellen und Fibroblasten.	51
Abbildung 17: IL-8-ELISA der Medien von Fibroblasten inkubiert mit Tumor- konditionierten Medium.	52
Abbildung 18: IL-8-Nachweis in Medien von Fibroblasten und konditionierte Tumormedien mittels Western Blot.	53
Abbildung 19: Zymographie der Medien der Fibroblasten inkubiert mit serumfreien Medium oder Tumor-konditionierten Medium für 24 h.	54
Abbildung 20: Relative Signalstärke der Pro- und MMP-2-Banden des Zymographie-Gels.	54
Abbildung 21: Western Blot-Analyse der MT1-MMP Expression von Fibroblasten.	56
Abbildung 22: Zwei Membranen des Zytokin Arrays, wobei eine mit Cal29CM und eine weitere mit Medium der TAF, welches mit Cal29CM kultiviert war, inkubiert wurde.	57
Abbildung 23: Nachweis der Produkte der GM-CSF-PCR.	58
Abbildung 24: Nachweis der Produkte der MCP-1 und β -Aktin PCR.	58
Abbildung 25: ELISA-Messung der TGF- β Konzentrationen.	60
Abbildung 26: Proliferation der D10G4.1 Zellen nach vier Tagen Inkubation mit 0 bis 1000 pg/ml IL-1 β	61

Abbildung 27: Proliferation der D10G4.1 Zellen nach vier Tagen Inkubation mit den Medien der behandelten Fibroblasten, den Tumor-konditionierten Medien (RT112CM, Cal29CM) und Kontroll-Medium (DMEM ohne FKS).	61
Abbildung 28: PCR-Nachweis der Expression von IL-1 α und - β von Tumorzellen.....	62
Abbildung 29: IL-1 β -Konzentration in den Tumor-konditionierten Medien und im serumfreien Medium.....	63
Abbildung 30: ELISA-Messungen der IL-1 α -Konzentration von Tumorzellen.	64
Abbildung 31: IL-8-Sekretion der HFF und TAF nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinanten IL-1 α und/oder TGF- β	65
Abbildung 32: Zymographie von TAF inkubiert mit IL-1 α und TGF- β	66
Abbildung 33: Pro-MMP-2-Sekretion von HFF inkubiert mit IL-1 α und TGF- β	67
Abbildung 34: RT112 Zellen auf der Membran der „Boyden-Kammer“.....	68
Abbildung 35: Migration von Tumorzellen in Monokultur und Ko-Kultur mit den Fibroblasten.	69
Abbildung 36: Migration von Tumorzellen in Gegenwart von konditionierten Fibroblasten Medium.....	70
Abbildung 37: Migration der Tumorzellen in Gegenwart von rekombinatem IL-8.....	71
Abbildung 38: Migration der Zellen in Gegenwart von rekombinanten GM-CSF (n=3).	71
Abbildung 39: Migration von Tumorzellen in Gegenwart von rekombinanten MCP-1.	72
Abbildung 40: Migration von Tumorzellen in der „Boyden-Kammer“ in Gegenwart von rekombinanten MCP-1.	72

Abbildung 41: Invasionsanalysen der Tumorzellen in Ko-Kultur mit den HFF und TAF.	73
Abbildung 42: Immunhistochemische Färbung der RT112-Zellen.	75
Abbildung 43: Immunhistochemische Färbung der RT112-Zellen.	76
8.2 Tabellenverzeichnis	
Tabelle 1: Daten zu verwendeten TAF, welche aus Zystektomien gewonnen wurden.....	20
Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Puffer	20
Tabelle 3: verwendete Chemikalien	22
Tabelle 4: verwendete Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 5: verwendete Enzyme.....	24
Tabelle 6: verwendete Zytokine	24
Tabelle 7: verwendete Kits	24
Tabelle 8: verwendete Primer	25
Tabelle 9: verwendete Primer für die Real-Time PCR.....	25
Tabelle 10: verwendete Primär- und Sekundärantikörper	26
Tabelle 11: verwendete Geräte	26
Tabelle 12: verwendete Software	27
Tabelle 13: Reaktionsgemisch der cDNA Synthese mit Komponenten der Firma Fermentas.	30
Tabelle 14: Reaktionsgemisch der PCR	31
Tabelle 15: PCR-Programm zur Amplifikation von DNA Produkten.	32

Tabelle 16: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Trenngels mit Gelatine oder Collagen und des Sammelgels für die Zymographie.....	39
Tabelle 17: Zusammensetzung des NP-40-Lysepuffers	40
Tabelle 18: Zusammensetzung eines 12 und 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Trenngels und des SDS-Polyacrylamid-Sammelgels.....	41
Tabelle 19: PCR-Programm der Mycoplasmen-PCR.....	45

8.3 Zusätzliche Daten und Ergebnisse

	E	D	C	B	A
1	PK				PK
2	PK				PK
3	RANTES	IL-32 α	IL-10	IL-1 α	C5a
4	RANTES	IL-32 α	IL-10	IL-1 α	C5a
5	SDF-1	CXCL10	IL-12 p70	IL-1 β	CD154
6	SDF-1	CXCL10	IL-12 p70	IL-1 β	CD154
7	TNF- α	CXCL11	IL-13	IL-1ra	G-CSF
8	TNF- α	CXCL11	IL-13	IL-1ra	G-CSF
9	sTREM-1	CCL2	IL-16	IL-2	GM-CSF
10	sTREM-1	CCL2	IL-16	IL-2	GM-CSF
11		MIF	IL-17	IL-4	CXCL1
12		MIF	IL-17	IL-4	CXCL1
13		CCL3	IL-17E	IL-5	CCL1
14		CCL3	IL-17E	IL-5	CCL1
15		CCL4	IL-23	IL-6	CD54
16		CCL4	IL-23	IL-6	CD54
17		PAI-1	IL-27	IL-8	IFN- γ
18		PAI-1	IL-27	IL-8	IFN- γ
19	NK				PK
20	NK				PK

Abbildung A 1: Matrize des Zytokin-Arrays.
Positivkontrolle (PK), Negativkontrolle (NK)

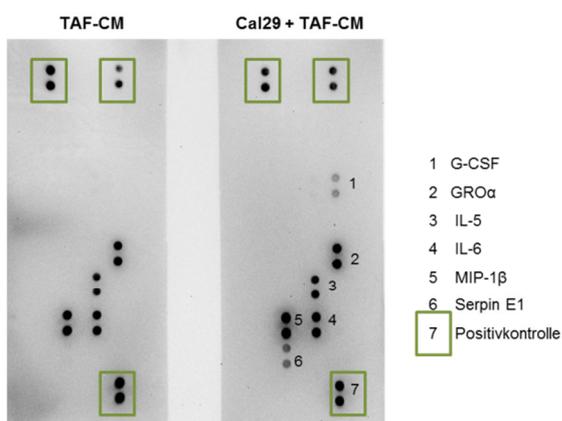


Abbildung A 2: Zwei Membranen des Zyokine-Arrays.
Eine Membran inkubiert mit TAF-CM und die andere mit Medium der Cal29 Zellen nachdem sie mit TAF-CM inkubiert wurden.

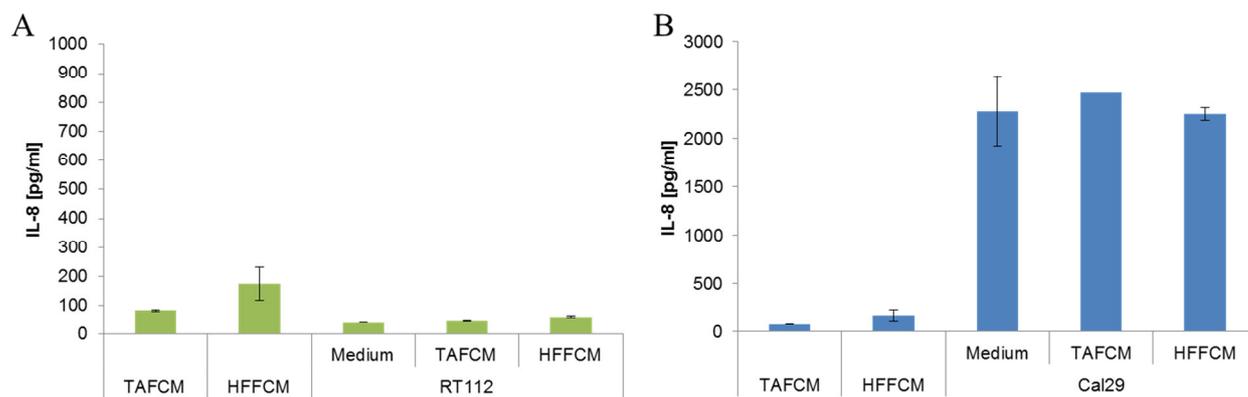


Abbildung A 3: IL-8-Konzentrationen der Tumorzellen nach Inkubation mit FibroblastenCM. RT112-Zellen inkubiert mit FibroblastenCM und FibroblastenCM allein (A). Cal29-Zellen inkubiert mit FibroblastenCM und FibroblastenCM allein (B).

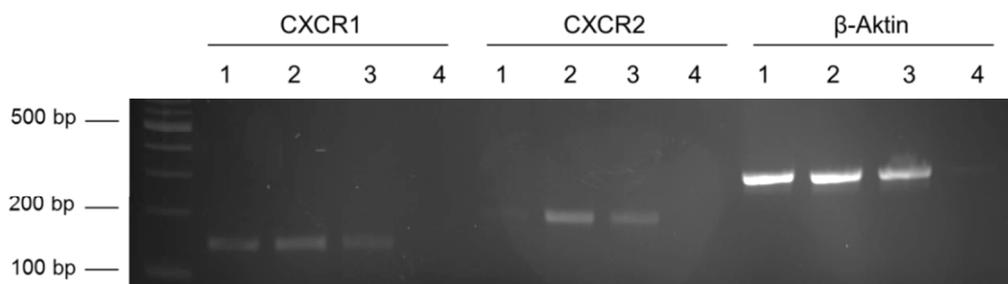


Abbildung A 4: Expression der IL-8 Rezeptoren der Blasentumorzelllinien. Cal29-Zellen (1), RT112-Zellen (2), T24-Zellen (3), Wasser/Negativkontrolle (4). Als Ladekontrolle diente die Expression von β-Aktin.

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Grimm
Vorname: Susanne
Geburtsdatum: 02.November 1984
Geburtsort: Weimar
Familienstand: ledig, 1 Kind
Anschrift: Huttenstraße 4, 07743 Jena
Telefon: 0176 22356183
e-mail: susigrimm@gmx.de

Schulbildung:

09.1991 – 08.1995 Grundschule „Gotthold Ephraim Lessing“, Apolda
09.1995 – 06.2003 Gymnasium „Bergschule“, Apolda
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

10.2003 – 01.2009 Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller Universität, Jena
Schwerpunkte: Genetik, Medizinische Mikrobiologie, Pharmakologie
Diplomarbeit mit dem Thema:
„Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut
anhand der Expression verschiedener Gene“
am Institut für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Jena
Abschluss: Diplom-Biologie (Note: 1,6)

Seit 02.2009 Promotion am Institut für Biochemie II, Universitätsklinikum Jena
Thema:
„Untersuchungen zu Zytokin-vermittelten Interaktionen von
Tumorzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten im
Blasenkarzinom“

Berufliche Erfahrungen:

- 06.2008 – 09.2008 Universitätsklinikum Jena
 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
- 02.2009 – 08.2011 Universitätsklinikum Jena, Institut für Biochemie II, AG
 Signaltransduktion
 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
- 09.2011 – 10.2012 Elternzeit
- 11.2012 – 08.2013 Stipendium der Graduiertenakademie Jena
 Wissenschaftliche Mitarbeiterin

8.5 Referenzen

Publikationen:

Richter P, Umbreit C, Franz M, Berndt A, Grimm S, Uecker A, Böhmer FD, Kosmehl H. 2011. EGF/TGF β 1 co-stimulation of oral squamous cell carcinoma cells causes an epithelial-mesenchymal transition cell phenotype expressing laminin 332. *J Oral Pathol Med* 40: 46-54.

Briest F, Berndt A, Clement J, Junker K, Eggeling F, Grimm S, Friedrich K. 2012. Tumor-stroma interactions in tumorigenesis: lessons from stem cell biology. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 1871-1887.

Grimm S, Jennek S, Singh R, Enkelmann A, Junker K, Rippaus N, Berndt A, Friedrich KH. Malignancy of bladder cancer cells is enhanced by cancer associated fibroblasts through a multifaceted cytokine-chemokine loop. [zur Publikation eingereicht]

Poster:

Grimm S, Wagner K, Bähring F, Friedrich KH, Pachmann K, Clement JH (2009)
Characterization of circulating tumor cells by single cell RT-PCR
1. Postgraduate-Symposium on Cancer Research (09. Mai 2009, Dornburg)

Bähring F, Grimm S, Wagner K, Müller U, Hochhaus A, Clement JH (2009)
BMP-signalling in circulating epithelial cells
Advances in qPCR (17.-18. September 2009, Berlin)

Grimm S, Briest F, Junker K, Berndt A, Friedrich KH
Tumor-associated fibroblasts enhance migration and invasiveness of bladder carcinoma cells
2. Postgraduate-Symposium on Cancer Research (24. April 2010, Dornburg)

Grimm S, Jennek S, Friedrich KH
Tumor-associated fibroblasts enhance migration and invasiveness of bladder carcinoma cells
4. Mildred Scheel Cancer Conference (19.-21. Mai 2010, Königswinter/Bonn)

Grimm S, Jennek S, Junker K, Berndt A, Friedrich KH
Tumor-associated fibroblasts enhance migration and invasiveness of bladder carcinoma cells
2. Symposium Tumor Microenvironment: Bedeutung für Tumorbologie und Klinik (18. Juni 2010, Jena)

Grimm S, Junker K, Berndt A, Friedrich KH
Tumor-associated fibroblasts enhance migration and invasiveness of bladder carcinoma cells
14. STS Meeting 2010: Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes (18.-20. Oktober 2010, Weimar)

Grimm S, Jennek S, Bratsch J, Wohlmann A, Motha V, Junker K, Friedrich KH
Malignancy of bladder cancer cells is enhanced by tumor associated fibroblasts through a cytokine-chemokine loop
105. AACR Annual Meeting 2014 (5.-9. April 2014, San Diego, CA; USA)

Vorträge:

Grimm S, Junker K, Berndt A, Friedrich KH
Malignancy-associated interactions between bladder cancer cells and fibroblasts
3. Postgraduate-Symposium on Cancer Research (30. April 2011, Dornburg)

Grimm S, Sing R, Junker K, Berndt A, Friedrich KH
Monocyte chemotactic protein (MCP-1) is a mediator of communication between bladder cancer cells and tumor associated fibroblasts
5. Postgraduate-Symposium on Cancer Research (27. April 2013, Dornburg)

8.6 Förderung

Diese Arbeit wurde gefördert:

- vom Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE):
Projekt-Nr. 2008 FE 9034, Verbund-Nr. 2008 VF 0010
Projekt-Nr. 2011 FR 9053, Verbund-Nr. 2011 VE 0017
- mit Mitteln des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) Jena
- durch ein Stipendium der Graduierten-Akademie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

8.7 Danksagung

Meinem herzlichen Dank gilt Professor Dr. KH Friedrich für die Möglichkeit diese Arbeit durchzuführen und zudem mit fachlichem Wissen zu unterstützen. Ich bin froh, dass er mir die Change gegeben hat dies auch nach der Elternzeit in einen „kinderfreundlichen“ Rahmen fortzusetzen.

Ich bedanke mich bei Professor Dr. O Krämer für das Interesse an der Arbeit und die Übernahme der Gutachterfunktion.

Besonderen Dank gilt den Arbeitsgruppen Pathologie und Urologie des Universitätsklinikums Jena, vor allem deren Leitern Prof. Dr. A Berndt und Prof. Dr. K Junker (jetzt Universitätsklinikum des Saarlandes), deren Unterstützung auf praktischer und theoretischer Ebene diese Arbeit bereichert haben.

Der Arbeitsgruppe Biochemie II danke ich für die schöne Zeit, vielen wissenschaftlichen und „außerwissenschaftlichen“ Gesprächen. Vor allem Nadine Knutti und Susanne Jennek für deren Unterstützung auf allen Ebenen.

Ich danke meinen „Diplomarbeitersfreundinnen“ Kathleen Wagner und Franziska Bähring für die Freundschaft, welche über die Arbeit hinaus und immer noch viel gepflegt wird.

Astrid Enkelmann danke ich für die Bereitstellung der Zellen, wissenschaftlichen Ratschlägen und ich hoffe, dass die gemeinsamen Treffen fortgeführt werden.

Meinen Brüdern Andreas und Christian Grimm danke ich dafür, dass sie ihre „kleine Schwester“ immer unterstützen.

Meinen Freund Sven Lockenvitz und unserer Tochter Hermine danke ich für die Unterstützung und Aufmunterung besonders während der „Schreibzeit“ der Arbeit.

Besonderen Dank gilt meinen Eltern Eckhard und Margit Grimm ohne deren immerwährend Beitrag, Hilfe und Ermutigung ich niemals meine Promotion geschafft hätte. Sie gaben und geben mir immer wieder die Freiheit mein Leben so zu gestalten wie ich es für richtig halte. Die zusätzliche „Tagesmutteraktivität“ hat mir die Zeit gegeben um auch mit Kind meine Arbeit zu Ende zu bringen.

8.8 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. KH Friedrich und apl. Prof. Dr. A Berndt

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift

