

Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Immunhistochemische Untersuchungen zur Bedeutung
des non-functional P2X7-Rezeptors für die Biologie des
Urothelkarzinoms vor dem Hintergrund seiner potenziellen
klinischen Verwendung als Biomarker**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Lütfrenk, Thomas

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Todenhöfer

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Kommos

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Harnblase.....	1
1.1.1 Anatomischer Aufbau, Lage und Funktion.....	1
1.1.2 Das Urothel.....	1
1.2 Urothelkarzinom.....	1
1.2.1 Epidemiologie	1
1.2.2 Ätiologie.....	2
1.2.3 Tumor-Klassifikation	3
1.2.4 Symptome und Klinik.....	5
1.2.5 Diagnostik und Staging.....	6
1.2.6 Prognose	7
1.2.7 Therapie und Nachsorge	8
1.2.8 Molekulare Marker.....	11
1.2.9 P2X ₇ -Rezeptor.....	15
1.3 Fragestellung.....	20
2 Material-Methodenteil.....	21
2.1 Patientenkollektiv.....	21
2.2 Datenbank.....	22
2.3 Tissue Microarray.....	22
2.4 Immunhistochemische Färbung	23
2.4.1 Funktionsprinzip der Immunhistochemie	24

2.4.2	Durchführung der Immunhistochemie.....	25
2.5	Auswertung der immunhistochemischen Färbung.....	27
2.5.1	Etablierung eines Scores zur Auswertung	28
2.5.2	Durchführung der Auswertung.....	30
2.6	Statistik	31
2.6.1	Evaluation des Patientenkollektives.....	31
2.6.2	Korrelations-Test	31
2.6.3	Outcome Uni- und Multivariat	32
2.7	Verwendete Software-Programme.....	32
2.8	Ethikvotum.....	33
2.9	Datenschutz.....	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Eigenschaften des Kollektivs.....	34
3.1.1	Geschlechts und Altersverteilung	34
3.1.2	Pathologische Daten: TNM-Klassifikation und Grading	34
3.2	Deskription des Färbeverhaltens bzgl. Expression und subzellulärer Verteilung des nfP2X₇.....	37
3.2.1	Deskription der Färbung	37
3.2.2	Auswertung der Expression in Normalgewebe und Tumorgewebe sowohl membranständig als auch zytoplasmatisch	38
3.3	Expression des nfP2X₇-Rezeptors in Normalgeweben im Vergleich zu Tumorgewebe.....	43
3.3.1	Membranständige Expression des nfP2X ₇ Rezeptor: Tumor <i>versus</i> Normalgewebe.....	44
3.3.2	Zytoplasmatische Expression des nfP2X ₇ Rezeptor: Tumor <i>versus</i> Normalgewebe.....	45

3.3.3	Expression des nfP2X ₇ Rezeptors: Tumor <i>versus</i> Normalgewebe desselben Patienten	46
3.4	Korrelation der Expression des nfP2X₇ Rezeptors mit epidemiologischen Daten.....	47
3.4.1	Korrelation des Alters bei der Operation mit der Expression des nfP2X ₇ Rezeptor	47
3.4.2	Korrelation des Geschlechts mit der Expression des nfP2X ₇ Rezeptor	48
3.5	Korrelation der Expression des nfP2X₇ Rezeptors mit klinischen, tumorspezifischen Daten	56
3.5.1	T-Stadium	56
3.5.2	N-Stadium.....	58
3.5.3	M-Stadium	59
3.5.4	Grading.....	60
3.6	Korrelation mit dem Krankheitsverlauf	61
3.6.1	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit der membranständigen Expression des nfP2X ₇ -Rezeptors.....	62
3.6.2	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit der zytoplasmatischen Expression des nfP2X ₇ -Rezeptors.....	65
3.6.3	Krankheitsspezifisches Überleben in Abhängigkeit der Expression des membranständigen nfP2X ₇ -Rezeptors.....	67
3.6.4	Krankheitsspezifisches Überleben in Abhängigkeit der zytoplasmatischen Expression des nfP2X ₇ -Rezeptors	69
3.6.5	Gesamtüberleben in Abhängigkeit der membranständigen Expression des nfP2X ₇ -Rezeptors.....	71
3.6.6	Gesamtüberleben in Abhängigkeit der zytoplasmatischen Expression des nfP2X ₇ -Rezeptors.....	74

4	Diskussion.....	76
4.1	Wesen und Intention der Arbeit	76
4.2	Expressionsverhalten vor dem Hintergrund der Gewebearten: benignes Urothel <i>versus</i> Urothelkarzinom	77
4.3	Expressionsverhalten vor dem Hintergrund der individuellen Patienteneigenschaften.....	78
4.4	Expressionsverhalten vor dem Hintergrund der klinisch pathologischen Tumordaten.....	80
4.5	Expressionsverhalten vor dem Hintergrund der prognostischen Wertigkeit.....	81
4.6	Limitationen der vorliegenden Arbeit.....	83
4.6.1	Patientenkollektiv.....	83
4.6.2	TMA-Technik und Proben.....	83
4.6.3	Inter- und Intraobservervariabilität	84
4.7	Schlussfolgerung.....	85
5	Zusammenfassung	87
6	Anhang	89
6.1	Tabellen.....	89
6.2	Abbildungen	92
7	Literaturverzeichnis.....	96
	Erklärungen zum Eigenanteil	105
	Veröffentlichungen.....	106
	Danksagung.....	107

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Aa	Arteriae
ABC 2.4.1.1	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
ALP	alkalischer Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
bzgl.	bezüglich
CDK	cyclin-dependent kinase
Cis	Carcinoma in situ
CRP	c-reaktives Protein
CSS	tumorspezifischem Überleben
CT	Computertomographie
Da	Dalton, Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	epithelialer Wachstumsfaktor Rezeptor
FDA	Food and Drug Administration
G	Grading
G ₁ -Phase	gap-phase
HER	human epidermal receptor
i.d.R.	in der Regel
IFN-γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-2	Interleukin-2
ISUP	International Society of Urological Pathology
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Fernmetastasen
mm	Millimeter
mM	Millimol
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Lymphknoten
nfP2X ₇ 1.2.8.5	Non-functional P2X7-Rezeptor
NNT	number needed to treat

Abkürzungsverzeichnis

OAS	<i>Gesamtüberleben</i>
PD	programmed cell death
PDD	<i>photodynamische Diagnostik</i>
PD-L	<i>programmed cell death ligand</i>
Q-Q-Diagrammen	<i>Quantil-Quantil-Diagrammen</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
S-Phase	<i>synthese-Phase</i>
T	<i>Primärtumor</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TME	<i>Tumor Microenvironment</i>
TNF- α	<i>Tumornekrose-Faktor alpha</i>
TURB	<i>transurethrale Resektion der Harnblase</i>
UICC	Union internationale contre le cancer
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

1 Einleitung

1.1 Harnblase

1.1.1 Anatomischer Aufbau, Lage und Funktion

Die Harnblase ist ein Hohlorgan, welche als Reservoir für den in den Nieren produzierten Harn dient (Aumüller *et al.*, 2010). Das physiologische Maximalvolumen liegt bei ca. 500 - 2000 ml (Aumüller *et al.*, 2010, Mersdorf *et al.*, 2006). Sie besteht aus verschiedenen Abschnitten, dem *Apex vesicae*, dem *Corpus vesicae*, dem *Fundus vesicae* und dem in die Harnröhre übergehenden kaudalen *Collum vesicae*. Ventral der Harnblase liegt die *Symphyse*, *kranial* sowie *dorsokranial* ist sie von *Peritoneum* bedeckt. Dorsal der Harnblase liegt beim Mann das *Rektum*, bei der Frau der *Uterus*. Beim Mann sitzt die Blase der Prostata auf.

1.1.2 Das Urothel

Das Urothel ist ein mehrschichtiges Epithel, welches die Schleimhaut eines großen Teils der ableitenden Harnwege bedeckt. Das Urothel besteht aus drei Schichten. Der Basalzellschicht, welche der Regeneration der Zellen dient, der Intermediärschicht, sowie der Superfizialschicht, welche von den so genannten Umbrella cells bedeckt ist (Lüllmann-Rauch, 2009). Das Epithel muss den sich stark verändernden und anspruchsvollen Gegebenheiten der Harnblase gerecht werden. Diese bestehen in den ständigen Volumenschwankungen durch unterschiedliche Harnblasenfüllung, sowie dem Schutz des subepithelialen Gewebe vor dem aggressiven Urin. Hierzu ist das Epithel von einer Glykokalix-Schicht bedeckt (Fry and Vahabi, 2016).

1.2 Urothelkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Laut dem Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts ist das Karzinom der Harnblase, zum Stand der letzten Erhebung 2014, in Deutschland bei Männern nach Prostata-, Lungen- und Darmkrebs, das vierthäufigste Tumorleiden. Bei Frauen nimmt es Position 14 ein (Abbildung 1).

Abbildung 3.o.1
 Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014
 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)

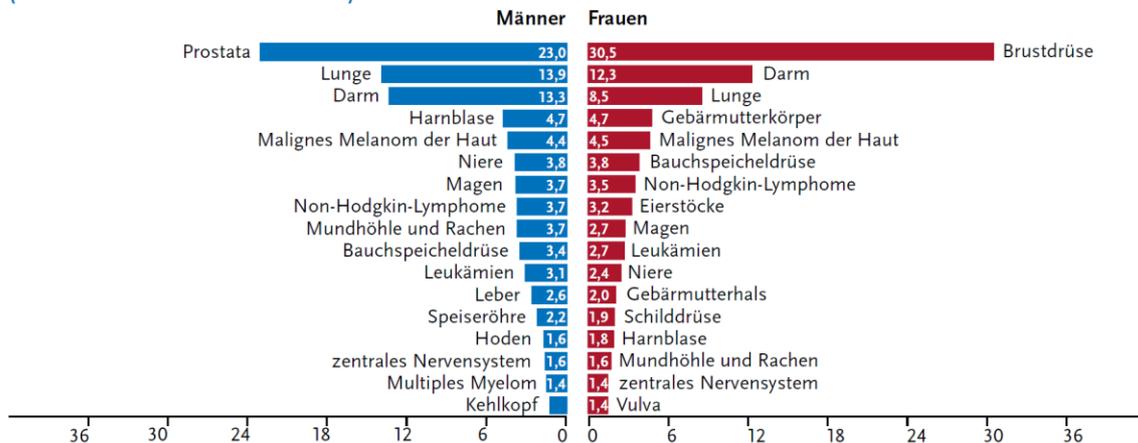


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014 (ohne nicht melanotischen Hautkrebs) (Koch-Institut, 2017).

2014 erkrankten ca. 22.430 Männer und 7100 Frauen an einem Harnblasenkarzinom. Der invasiv wachsende Teil hiervon lag bei den Männern bei 11.680 und bei den Frauen bei 4170, wobei das Erkrankungsrisiko linear mit dem Alter anstieg (Kraywinkel et al., 2018). Auch wenn die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten insgesamt seit 1990 deutlich rückläufig sind, kommt es durch den demographischen Wandel und die dadurch bedingt zunehmend älter werdende Bevölkerung, zu einem absoluten Anstieg der Neuerkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2014 bei Männern bei 74 Jahren und bei Frauen bei 76 Jahren (Koch-Institut, 2017).

1.2.2 Ätiologie

Die Entstehung des Harnblasenkarzinoms ist multifaktoriell, sodass nicht von einer einzelnen Ursache ausgegangen werden kann. Den wichtigsten Risikofaktor (ca. 50% der Fälle) stellt das Rauchen dar, wobei hier das passive Rauchen inkludiert ist. Aktives Rauchen erhöht das Risiko auf etwa das 4-fache. Ehemalige Raucher haben ein etwa 2,22-fach erhöhtes Risiko, wobei kein Unterschied zwischen Männern und Frauen besteht (Freedman *et al.*, 2011, Fernández, 2016). Die karzinogene Wirkung des Tabakrauches ist durch seine Inhaltsstoffe, wie aromatische Amine und polyzyklische aromatische

Kohlenwasserstoffe bedingt. Diese werden renal ausgeschieden. Durch die Speicherfunktion der Blase kommt es zu einer verlängerten Expositionszeit des Urothels mit den Substanzen. Im Tabak sind insgesamt mehr als 60 karzinogene Substanzen enthalten (Stern *et al.*, 2009).

Darüber hinaus besteht bei der Entstehung des Blasenkarzinoms auch eine genetische Komponente. Wenn ein Verwandter ersten Grades betroffen ist, verdoppelt sich das Risiko zu erkranken. Bei insgesamt 31% der Fälle ist davon auszugehen, dass eine genetische Komponente an der Entstehung des Karzinoms beteiligt ist (Murta-Nascimento *et al.*, 2007, Lichtenstein *et al.*, 2000).

Es gibt noch weitere Risikofaktoren, wie arbeitsplatzbedingte Exposition von aromatischen Aminen, chronische Entzündung des Urothels, ionisierende Strahlung im Rahmen einer Strahlentherapie sowie Chemotherapie (Fernández, 2016).

1.2.3 Tumor-Klassifikation

Nach dem Nachweis eines Harnblasenkarzinoms wird dieses nach dem TNM-Klassifikationssystem der UICC (Union internationale contre le cancer) eingeteilt. Hierbei werden die Ausdehnung des Primärtumors (T) die befallenen Lymphknoten (N) und die Fernmetastasen beurteilt (M). Es erfolgt eine weitere Einteilung nach der Tumorausdehnung. Die nicht-muskelinvasiven Tumore (pTis, pTa, pT1) und die muskelinvasiven Tumore (\geq pT2) werden hierbei unterschieden. Bei der Erstdiagnose weisen ca. 70-80% einen nicht-muskelinvasiven Tumor auf (Metts *et al.*, 2000). Diese Unterteilung dient der Bestimmung der Therapie und der Prognose.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation Harnblasenkarzinom (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016).

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt auf Primärtumor
Ta	Nichtinvasives papilläres Karzinom
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Tumor infiltrierte das subepitheliales Bindegewebe (<i>Lamina propria</i>)
T2	Tumor infiltrierte die Muskulatur
T2a	Tumor infiltrierte oberflächlich die innere Hälfte der Muskulatur
T2b	Tumor infiltrierte tief in die äußere Hälfte der Muskulatur
T3	Tumor infiltrierte das perivesikale Fettgewebe
T3a	Mikroskopie Infiltration
T3b	Makroskopische Infiltration
T4	Tumor infiltrierte die umliegenden Organe (Prostata, Samenblasen, Uterus, Vagina, Beckenwand)
T4a	Tumor infiltrierte das Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus oder Vagina
T4b	Tumor infiltrierte die Beckenwand oder Abdominalwand
N – regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem solitären Lymphknoten des kleinen Beckens
N2	Metastasen in multiplen Lymphknoten des kleinen Beckens
N3	Metastase (n) in Lymphknoten an <i>Aa. Iliacae communes</i>
M - Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2: Stadien-Einteilung Harnblasenkarzinom (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016).

	Stadien-Einteilung		
Stadium 0a	Ta	N0	M0
Stadium 0is	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2a-b	N0	M0
Stadium III	T3a-b	N0	M0
	T4a	M0	M0
Stadium IV	T4b	N0	M0
	jedes T	N1-3	M0
	jedes T	jedes N	M1

Neben der TNM Klassifikation werden Harnblasenkarzinome nach dem Grading der WHO (World Health Organization) und der ISUP (International Society of Urological Pathology) aus dem Jahr 2016 eingeteilt. Anhand von zytologischen Kriterien wird hierbei in low-grade (G1-G2) und high-grade (G2-G3) differenziert (Humphrey *et al.*, 2016, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016).

1.2.4 Symptome und Klinik

Das Leitsymptom des Harnblasenkarzinoms ist die schmerzlose Hämaturie. Bei ca. 80% der Patienten wird die Diagnose nach dem Auftreten einer Makro- oder Mikrohämaturie gestellt. Ursächlich hierfür können periodische Blutungen von Papillomen oder auch Blutungen aus Gefäßarrosionen des malignen Prozesses sein. Beim *Carcinoma in situ* (Cis) also auch beim muskelinvasivem Urothelkarzinom kommen eine erhöhte Miktionsfrequenz, Drang-Symptomatik und Dysurie hinzu. Im fortgeschrittenen Stadium können, Anämie, durch Tumorinfiltration in die Harnleiterostien, Flankenschmerzen, Appetitlosigkeit,

Gewichtsverlust, Knochenschmerzen oder suprapubische Schmerzen hinzukommen (Martini, 2016).

1.2.5 Diagnostik und Staging

Bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom werden folgende diagnostische Schritte eingeleitet. Es werden eine Urinzytologie, eine Sonographie und eine Zystoskopie durchgeführt. Bei einem Nachweis eines malignen Prozesses, kann je nach Entität, im Verlauf ein Staging mittels bildgebender Diagnostik (CT/MRT) sowie wie eine intravenöse Urographie durchgeführt werden (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016).

1.2.5.1 Labordiagnostik – Urinzytologie

Die Urinzytologie stellt eine nicht invasive Untersuchung zum Nachweis von malignen Urothelzellen dar. Hierzu werden die zellulären Bestandteile des Urins histologisch untersucht. Die Ergebnisse sind stark abhängig von der Art und vom Grading des Tumors sowie von der Probenqualität des Urins. Sowohl sehr große als auch High-grade Tumore können mit einer hohen Sensitivität und Spezifität diagnostiziert werden. Bei low-grade Tumoren ist diese Methode aber stark limitiert (Yafi *et al.*, 2015). Darüber hinaus besteht eine starke Interobserver-Variabilität (Sanchez-Carbayo, 2003).

1.2.5.2 Labordiagnostik - Zellgebundene Urindiagnostik und Uringebundene molekulare Marker

Um die geringe Aussagekraft der Urinzytologie bei low-grade Tumoren zu verbessern und die Sensitivität und Spezifität bei den high-grade Tumoren zu optimieren wird in der Forschung aktuell intensiv nach Urinmarkersystemen geforscht. Diese sollten technisch einfach, kostengünstig, zuverlässig und reproduzierbar, sowie eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen (Martini, 2016). Es existieren verschiedene Systeme und Ansätze, bei denen z.B. Oberflächenantigene der Tumorzellen wie CEA, EGFR, Cytokeratin 20 oder intrazelluläre chromosomale Veränderungen angefärbt werden. Diese unterscheiden sich in ihrer Sensitivität. Darüber hinaus sind sie einzeln im Allgemeinen noch nicht sensitiv und spezifisch genug, um die Zystoskopie

abzulösen (Yafi *et al.*, 2014). Durch eine Kombination verschiedener Tests ließe sich die Sensitivität aber gegebenenfalls erhöhen (Todenhofer *et al.*, 2013).

1.2.5.3 Invasive Diagnostik – Zystoskopie

Der Standard zum primären Nachweis eines Blasenkarzinoms ist die Weißlicht-Zystoskopie. Dies ist eine invasive Methode zur Spiegelung der Harnblase, welche auch im Rahmen der Therapie eingesetzt wird. Ihre Aussagekraft ist bezüglich flacher, im Schleimhautniveau wachsender Karzinome, insbesondere Cis eingeschränkt. Die Sensitivität liegt zwischen 67 – 84% (Doehn, 2012). Zur Verbesserung dieser, wird zunehmend die photodynamische Diagnostik (PDD) eingesetzt. Die Blase wird hierzu ca. 60-120 Minuten vor der Untersuchung mit 5-Aminolävulinsäure gefüllt. Es resultiert eine rote Markierung des erkrankten bzw. veränderten Gewebes unter Blaulicht. Dies steigert die Sensitivität auf 87-97% und senkt die Residualtumorraten im Vergleich zur Weißlichtzystoskopie signifikant (Jocham *et al.*, 2008). Eine mit Hilfe von PDD durchgeführte transurethrale Blasenresektion hat auch für Patienten einen positiven prognostischen Effekt, denen sich eine Zystektomie im Krankheitsverlauf anschließt (Gakis *et al.*, 2015). Im Rahmen einer Zystoskopie sollten bei zytologischem Verdacht auf ein Tumorgeschehen oder bei suspekten Befunden systematisch Biopsien entnommen werden, damit ein CIS nicht übersehen wird (Babjuk *et al.*, 2017).

1.2.6 Prognose

1.2.6.1 Überlebensrate und klinische Parameter

Die Prognose und das 10-Jahresüberleben beim Urothelkarzinom ist abhängig von verschiedenen Faktoren. Einerseits hängt das Überleben vom Tumorstadium, dem Downstaging vor der radikalen Zystektomie, sowie von prognosebedingenden Biomarkern ab. Die allgemeine 10-Jahres-Überlebenszeit nach radikaler Zystektomie liegt geschlechterübergreifend bei 44,3% und die krankheitsspezifische Überlebenszeit bei 66,8%. Abhängig vom Tumorstadium liegt das krankheitsspezifische 10-Jahres-Überleben im Stadium I bei 90,5%, im Stadium II bei 66,8%, im Stadium III (T3a/b) 59,7%, im Stadium IV (T4a/b) 36,6% und im Stadium IV (Tx N+) bei 16,7%. Durch eine TURB zum Downstaging im

Stadium II kann das krankheitsspezifische Überleben signifikant erhöht werden (Hautmann *et al.*, 2012).

Darüber hinaus haben ca. 30% der betroffenen Patienten ein bereits lokal fortgeschrittenes bzw. metastasiertes Karzinom bei der Erstdiagnose. Diese versterben unbehandelt nach ca. 6 Monaten, bzw. haben unter Therapie ein medianes Gesamtüberleben von etwa 14 Monaten (Keck, 2016). Neben dem Tumorstadium gibt es weitere, prognosebestimmende Co-Faktoren, die betrachtet und in die Therapieplanung einbezogen werden müssen. Bezüglich der Erstlinientherapie sind ein Karnofsky-Index unter 80%, sowie viszerale Metastasen ein negativer prognostischer Marker (Bajorin *et al.*, 1999). In Hinblick auf Zweitlinientherapien mit Vinflunine sind eine Anämie (Hb < 10 g/dl), Lebermetastasen und ein reduzierter Allgemeinzustand nach Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) mit einer signifikanten Lebenszeitverkürzung assoziiert (Bellmunt *et al.*, 2010). Weitere relevante klinische Laborparameter stellen erhöhte Level von alkalischer Phosphatase (ALP), Laktatdehydrogenase (LDH) und c-reaktivem Protein (CRP) dar (Nakagawa *et al.*, 2017).

1.2.7 Therapie und Nachsorge

Das Therapiekonzept beim Harnblasenkarzinom richtet sich nach verschiedenen Faktoren. Es ist abhängig vom Alter und Allgemeinzustand des Patienten, der Invasivität des Tumors, sowie des Grading und Staging. Bei einem Nachweis eines Karzinoms im Rahmen der Zystoskopie wird eine transurethrale Resektion der Harnblase (TURB) durchgeführt. Dies stellt die Standardtherapie eines nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms dar. Das im Rahmen der TURB gewonnene Gewebe wird vom Pathologen histologisch untersucht, um die Tumorausdehnung in den Muskel festzustellen. Daran werden im Anschluss ggf. weitere Diagnostik sowie das weitere Therapiekonzept angepasst (Woldu *et al.*, 2017).

1.2.7.1 Nicht muskelinvasives Blasenkarzinom

Beim Nachweis eines kleinen Ta low-grade Tumors sollte im Anschluss an die TURB eine einmalige intravesikale adjuvante Chemotherapie mit z.B. Mitomycin C erfolgen. Dies stellt auch die definitive Therapie in diesem Stadium dar (Babjuk *et al.*, 2017).

Bei unvollständiger Resektion, sowie bei intermediate- oder high-grade Ta Tumoren wird eine erneute Resektion innerhalb von 6 Wochen empfohlen. Neben der intravesikalen Chemotherapie besteht hier die Möglichkeit der intravesikalen Immuntherapie mit BCG (Bacillus Calmette-Guerin). Diese senkt im Vergleich zur Mitomycin C Therapie die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit signifikant, ist aber mit ausgeprägten lokalen (Zystitis, Pollakisurie, Makrohämaturie) sowie allgemeinen Nebenwirkungen (allgemeines Unwohlsein und Fieber) assoziiert (Babjuk *et al.*, 2017, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016). Bei fehlendem Ansprechen auf die lokale Therapie besteht die Möglichkeit der Therapieeskalation zur radikalen Zystektomie (Babjuk *et al.*, 2017, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016).

1.2.7.2 Muskelinvasives Blasenkarzinom

Im Falle des Nachweises eines muskelinvasiven Blasenkarzinoms sollte ein allgemeines Staging durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollten CT bzw. MRT Aufnahmen des *Abdomens* sowie des *Thorax* zum Nachweis von Lymphknotenveränderungen, sowie Fernmetastasen durchgeführt werden. Eine Knochenszintigraphie sollte nur im Fall von richtungsweisenden Symptomen durchgeführt werden. Für den Fall, dass keine Lymphknoten- und Fernmetastasen nachweisbar sind, wird die Durchführung einer Cisplatin haltigen neoadjuvanten Chemotherapie empfohlen. Diese dient der präoperativen Eradikation von Mikrometastasen (Sherif *et al.*, 2004, Witjes *et al.*, 2014). Den Goldstandard der Therapie beim muskelinvasiven, nicht metastasierten Blasenkarzinom stellt die radikale Zystektomie dar. Diese beinhaltet i.d.R. die Entfernung der gesamten Blase und der unmittelbaren Nachbarorgane, sowie der *pelvinen* Lymphknotenstationen. Die radikale Zystektomie kann sowohl offen, laparoskopisch als auch roboterassistiert durchgeführt werden. Sie sollte

innerhalb von drei Monaten nach Diagnosestellung durchgeführt erfolgen (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016). Nach der radikalen Zystektomie besteht die Möglichkeit der Anlage einer inkontinenten bzw. einer kontinenten Harnableitung. Die inkontinente Harnableitung beinhaltet unterschiedliche Formen der Harnleiterhautfisteln bzw. das *Ileum-* oder *Kolon-Conduit*. Zur kontinenten Harnableitung zählen katheterisierbare Pouchformen, die Anlage einer Neoblase oder die transrektale Harnableitung mittels Ureterosigmoideostomie. Die Harnableitung sollte sich nach dem Zustand und Wunsch des Patienten richten (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016, Witjes *et al.*, 2017). Eine Alternative zur radikalen Zystektomie mit kurativer Zielsetzung, stellt die transurethrale Resektion der Blase in Kombination mit einer platinhaltigen Radiochemotherapie dar. Bei fehlendem Ansprechen, Rezidiv oder schwerwiegenden Komplikationen sollte eine Salvage-Zystektomie angeschlossen werden (Rödel *et al.*, 2002, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016).

1.2.7.3 Systemische Therapie bei lokal fortgeschrittenem muskelinvasiven Blasenkarzinom

Im Rahmen der Therapie eines muskelinvasiven Blasenkarzinoms ($\geq T2$) sollten eine (neo)adjuvante Cisplatin haltige Kombinationschemotherapie durchgeführt werden. Die neoadjuvante Therapie beinhaltet ein Regime von mehreren Zyklen Chemotherapie, welche vor der Zystektomie erfolgt. Im Vergleich zur reinen Zystektomie reduziert die neoadjuvante Kombinationschemotherapie die Gesamtmortalität um 14% bei einer number needed to treat (NNT) von 13. Es liegen keine Vergleichsdaten zwischen adjuvanter und neoadjuvanter Therapie bzgl. des T2 Stadiums vor (Kitamura *et al.*, 2014). Die adjuvante Kombinationschemotherapie wird definitionsgemäß nach der Zystektomie und histopathologischen Diagnose eines organüberschreitenden muskelinvasiven Tumors ($\geq T3$) verabreicht. Darüber hinaus ist sie bei T-Stadium unabhängigen Nachweis von lymphatischen Metastasen (pN1) indiziert. In der Regel werden drei bis vier Zyklen gegeben (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016). Die adjuvante Kombinationschemotherapie reduziert die Gesamtmortalität um 26%

im Vergleich zur reinen Zystektomie. Dies entspricht einer NNT von 9 (Sternberg *et al.*, 2015).

1.2.7.4 Systemische Therapie bei metastasiertem Blasenkarzinom

Das Therapieregime eines metastasierten Blasenkarzinoms beinhaltet eine Kombinationschemotherapie aus Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin oder Gemcitabin und Cisplatin (Stenzl *et al.*, 2011). Abhängig von allgemeinen Risikofaktoren wie viszeralen Metastasen sowie niedrigem Karnofsky-Index, kann mit diesen Kombinationen ein medianes Gesamtüberleben zwischen 12-16 Monaten erreicht werden (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016, Bajorin *et al.*, 1999).

1.2.8 Molekulare Marker

Neben den klinisch/pathologischen Markern liegt ein Forschungsschwerpunkt bei den molekularen Markern. Habuchi *et al.* hatten diese 2005 für das Blasenkarzinom in sechs Gruppen unterteilt: (1) Mikrosatelliten-assoziierte Marker, (2) (Proto-)Onkogene, (3) Tumor-Suppressor-Gene, (4) Zellzyklusregulatoren, (5) angiogenese Faktoren und (6) extrazelluläre Matrixadhäsionsmoleküle. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Marker wie Ki-67 und p53 eine gute Vorhersagekraft aufweisen könnten (Habuchi *et al.*, 2005). Allerdings ist die Zahl verlässlicher und für das Urothelkarzinom spezifischer Molekularer Marker sehr begrenzt (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016).

1.2.8.1 Proto-Onkogene

Zu den für das Blasenkarzinom gehörigen, relevanten (Proto-)Onkogenen gehören unter anderem die epithelialen Wachstumsfaktoren (EGFR) sowie das Produkt des HER-2(neu) Gens (Habuchi *et al.*, 2005). Nach Aktivierung des EGFR durch seinen Liganden werden die RAS / RAF / MEK, PI3K / AKT / mTOR und JAK Signalkaskaden eingeleitet. Diese beeinflussen die Zellproliferation und -differenzierung, induzieren eine Apoptoseresistenz und -inhibition, sowie eine Zellzyklusprogression. Der HER-2(neu) Rezeptor stellt einen Subtyp des EGFR dar und aktiviert entsprechend ebenfalls die beiden erstgenannten

Signalkaskaden. Im Falle einer Mutation oder Überexpression des Rezeptors wird somit das Wachstum der Zellen stimuliert (Huang and Fu, 2015, Habuchi *et al.*, 2005, Carneiro *et al.*, 2015).

Mutationen in den Onkogenen Ras und FGFR3 konnten vor allem in low-Grade Tumoren nachgewiesen werden, hatten aber bezüglich der Prognose keinen signifikanten Einfluss. (Habuchi *et al.*, 2005). Da der Rezeptor aber auf etwa 40% aller Blasenkarzinome überexprimiert ist, stellt er ein Forschungsobjekt für die zielgerichtete Blasenkarzinomtherapie dar (Carneiro *et al.*, 2015).

1.2.8.2 Tumor-Suppressor-Gene und Zellzyklusregulatoren

Im Gegensatz zum Ras und FGFR3 sind das Protein p53 und das Retinoblastom-Protein vor allem in den high-grade Tumoren verändert (Mitra *et al.*, 2007, Habuchi *et al.*, 2005). Das Protein p53 ist ein regulatorisches Protein, welches als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird (Efeyan and Serrano, 2007). Es unterbricht bei jeglicher Art von genomischen Stress den Zellzyklus beim Übertritt von der G₁ in die S-Phase, damit entsprechend DNA-Reparaturen durchgeführt werden können. Bei zu großen DNA-Schädigungen leitet es die Apoptose ein. p53 wird in jeder Zelle des menschlichen Körpers synthetisiert. Die Synthese wird durch eine autoregulatorische Feedbackschleife mit dem Protein MDM2 gesteuert. Bei einem Funktionsverlust des Protein p53 oder bei einer Überfunktion von MDM2 kann es somit zu einem unkontrollierten Wachstum von mutierten Zellen kommen (Vassilev *et al.*, 2004).

Ein ähnlich wirkendes Tumor-Suppressor-Genprodukt ist das Retinoblastom-Protein. Wie p53 reguliert es die Progression des Zellzyklus am Übergang zwischen der G₁ und S-Phase. In seiner aktiven Form ist es an das Protein E2F gebunden. Durch Phosphorylierung wird es inaktiviert und E2F wird abgelöst. Dieses wiederum ist an der DNA-Synthese beteiligt. Die Phosphorylierung wird durch Cycline gesteuert. (Mitra *et al.*, 2007).

Die zwischengeschalteten Zyklusregulatoren p14, p16, p21, p27 und Ki-67 dienen unter anderem als Bindeglied der oben genannten Signalwege und können ebenfalls als unabhängige Prognosefaktoren für das Urothelkarzinom

betrachtet werden (Mitra *et al.*, 2007). Durch die Aktivierung von p53 wird p21 transkribiert. Das führt zu einer Hemmung von CDK4 und resultiert in einem Zell-Zyklusarrest. Im Fall einer Mutation von p21 führt dies zu einem Ausbleiben der Inaktivierung des Retinoblastom-Proteins und somit zu einer Zellproliferation. Dies ist in Abbildung 2 veranschaulicht.

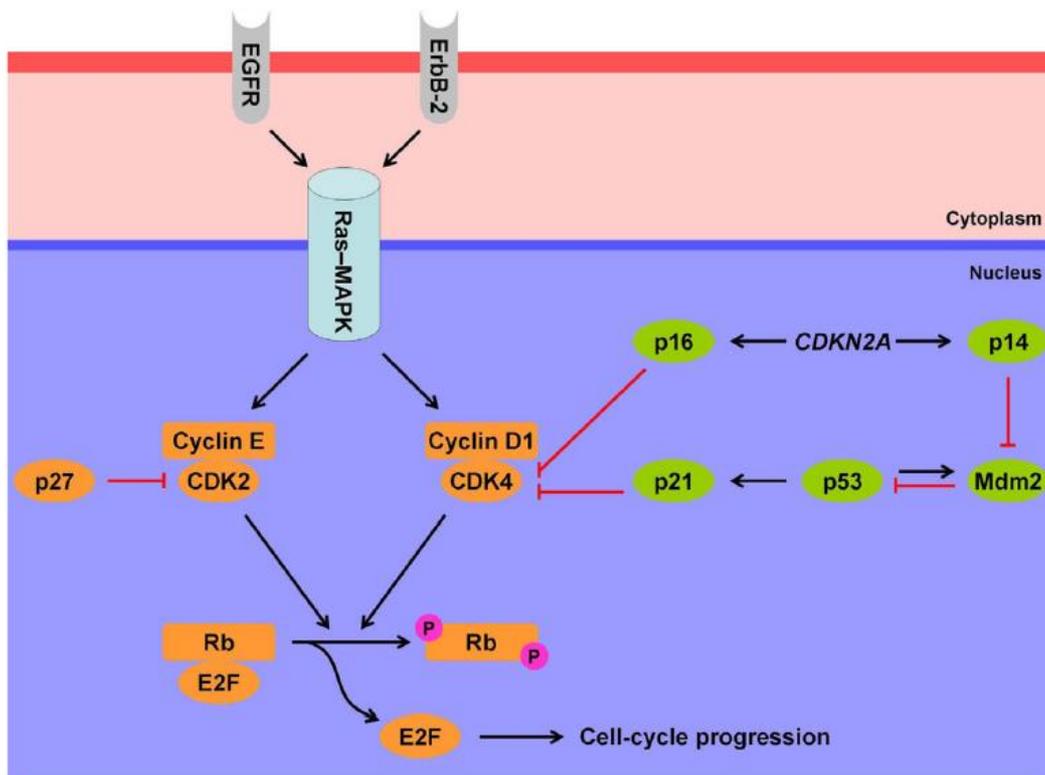


Abbildung 2: Interaktionen zwischen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (grau), p53 (grün) und Retinoblastomprotein (orange)-Pathways im Kontext der Zell-Zyklus-Kontrolle (Mitra *et al.*, 2012).

1.2.8.3 Neue Therapieansätze und Forschungsschwerpunkte

Auf Grund der guten Resultate bei der Therapie von Patienten mit nicht muskelinvasivem Urothelkarzinom mit BCG, stellt die Immuntherapie einen Forschungsschwerpunkt bei Therapie des muskelinvasiven Blasenkarzinoms dar. Beim BCG besteht die Problematik, dass es sehr unspezifisch die Immunreaktion provoziert und somit mit starken unerwünschten Nebenwirkungen einhergeht. Das Ziel der Forschung zu modernen

Krebstherapie ist es, diese Effekte nicht nur lokal sondern auch systemisch bei metastasierten Karzinomen zu erzielen und dabei möglichst zielgerichtet und Nebenwirkungsarm zu sein (Jones *et al.*, 2016).

Dabei wurde in den letzten Jahren ein besonderer Fokus auf den programmed cell death 1 (PD-1) Rezeptor und den programmed cell death ligand 1 (PD-L1) und PD-L2 gelegt (Jones *et al.*, 2016). Der PD-1 ist ein Rezeptor, der vor allem auf T-Lymphozyten, aber auch auf anderen hämatopoetischen Immunzellen exprimiert wird. Durch die Aktivierung mit PD-L1 und PD-L2 wird die immunologische Funktion der T-Zelle herunterreguliert. Sie verliert die Fähigkeit proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin-2 (IL-2), Interferon-gamma (IFN- γ) und Tumornekrose-Faktor alpha (TNF- α), sowie zytolytische Moleküle wie Perforin, zu sezernieren (Ohaegbulam *et al.*, 2015). Diese Liganden kommen physiologisch in gesundem Gewebe vor, um sich vor einer Autoimmunreaktion durch die T-Zellen zu schützen. Somit dienen PD-1 und PD-L1 einer Homöostase im Immunsystem. Aber auch einige Tumore exprimieren diesen Liganden auf der Zelloberfläche, sodass das Immunsystem von diesen herunterreguliert wird. Dies macht sie zu potenziellen Zielen für eine Immuntherapie (Sunshine and Taube, 2015).

Es konnte in mehreren klinischen Phase 1 Studien die Wirksamkeit dieses Therapieansatzes nachgewiesen werden. Powles *et al.* beschrieben 2014 die Wirkung von Atezolizumab (MPDL3280A) bei metastasierten Urothelkarzinompatienten. Er berichtet von einer Ansprechrate von 41% der Patienten mit positivem PD-L1 Status der Tumorzellen. Hinzu kommt, dass dieser Wirkstoff verglichen mit den etablierten Chemotherapeutika von älteren Patienten sowie Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion besser toleriert wird (Powles *et al.*, 2014, Petrylak *et al.*, 2018). Massard *et al.* berichteten 2016 vergleichbare Ergebnisse mit dem Wirkstoff Durvalumab (MEDI4736). In einer multizentrischen Phase 1 / 2 Studie konnte er ein ansprechen von 46,6% der Patienten mit positiven PD-L1 Status bei geringen Nebenwirkungen nachweisen (Massard *et al.*, 2016).

Aus diesem Grund wurde Atezolizumab neben Pembrolizumab, einem weiteren PD-L1-Inhibitor, von der *Food and Drug Administration* (FDA) im Jahr 2017, zur Therapie eines Urothelkarzinoms bei Patienten mit Cis-Platin-Unverträglichkeit, zugelassen.

Neben der systemischen Therapie beschreiben Railkar *et al.* 2017 einen neuen lokalen Therapieansatz der Photoimmuntherapie bei EGFR positiven Urothelkarzinomen. Es konnte *in vitro* und *in vivo* am Tierexperiment dargelegt werden, dass mittels infraroter Bestrahlung des Tumors, welcher mittels EGFR-Antikörper markiert war, eine Tumornekrose induziert werden konnte. Er nutzte den Anti-EGFR-Antikörper Panitumumab und kombinierte diesen mit einem Photoabsorber (Railkar *et al.*, 2017).

Auch wenn die Ergebnisse der zahlreichen Studien vielversprechend sind und die richtige Richtung aufweisen, so zeigen sie nicht die erhofften Ansprechraten. Sie wirken auch bislang nicht spezifisch genug, da sie auf Proteine abzielen, die nicht allein tumortypisch sind. Darüber hinaus sichern sie bislang auch nicht das Langzeitüberleben betroffener Patienten. Aus diesem Grund ist es umfassend wichtig, weitere Moleküle zu identifizieren, die eine hohe Tumorspezifität aufweisen, für Medikamente zugänglich sind und hohe Ansprechraten haben, um ein Langzeitüberleben zu sichern.

1.2.9 P2X₇-Rezeptor

Der P2X₇-Rezeptor gehört der Familie der P2X-Rezeptoren an. Diese werden auch als Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)-gesteuerter P2X-Rezeptor Kationenkanal bezeichnet. Durch die Anwesenheit von extrazellulärem ATP bildet der P2X-Rezeptor einen Kanal, der selektiv Kationen (hauptsächlich Kalzium) über die Zellemembran transportiert. Die Rezeptoren kommen ausschließlich bei Wirbeltieren vor und werden durch sieben Gene kodiert. Sie werden an verschiedenen Stellen im Körper exprimiert (LEHEN *et al.*, 2019, Valera *et al.*, 1994).

Der Kanal selbst besteht aus je drei Rezeptor-Untereinheiten. Der Rezeptor P2X₇ besitzt wie die anderen Mitglieder der P2X-Familie zwei Transmembrandomänen, eine extrazelluläre Schleife, die die ATP-Bindungsstelle enthält und eine intrazelluläre N- und C-terminal (*Egan et al., 2006*). Im Gegensatz zu den anderen Vertretern unterscheidet sich P2X₇ durch eine um 200 Aminosäuren verlängerte C-terminale Domäne und heteropolymerisiert nicht mit anderen Kanälen der P2X-Familie (*Surprenant et al., 1996*). Durch die Anwesenheit von ATP öffnet sich der Kanal zum Kationenfluss. Hierbei wird Natrium und Calcium von extrazellulär nach intrazellulär und Kalium aus der Zelle transportiert. Dies ist abhängig von der Expositionszeit des ATP. Durch eine kurze ATP-Exposition (weniger als eine Sekunde) kommt es innerhalb von Millisekunden zu einer Permeabilität für kleine Kationen. Bei einer fortbestehenden Exposition über mehr als zehn bis sechzig Sekunden, verändert sich dieses Verhalten (*Virginio et al., 1999*). Der Kanal dilatiert und wird für Moleküle bis zu einer Größe von 900 Da permeabel (*Auger et al., 2005*). Dies ist in Abbildung 3 dargestellt. Der Rezeptor ist relativ unempfindlich für ATP. Er braucht vergleichsweise hohe Konzentrationen um aktiviert zu werden (EC_{50} 800 μ mol/L) (*Surprenant et al., 1996, Gilbert et al., 2017*). Diese finden sich in der Regel nicht im Extrazellularraum. Daher wird der Rezeptor auch als Danger-Receptor bezeichnet, da er nur in entzündetem Gewebe bzw. in Gewebe mit viel Zellumsatz aktiviert wird. (*Skaper et al., 2009*).

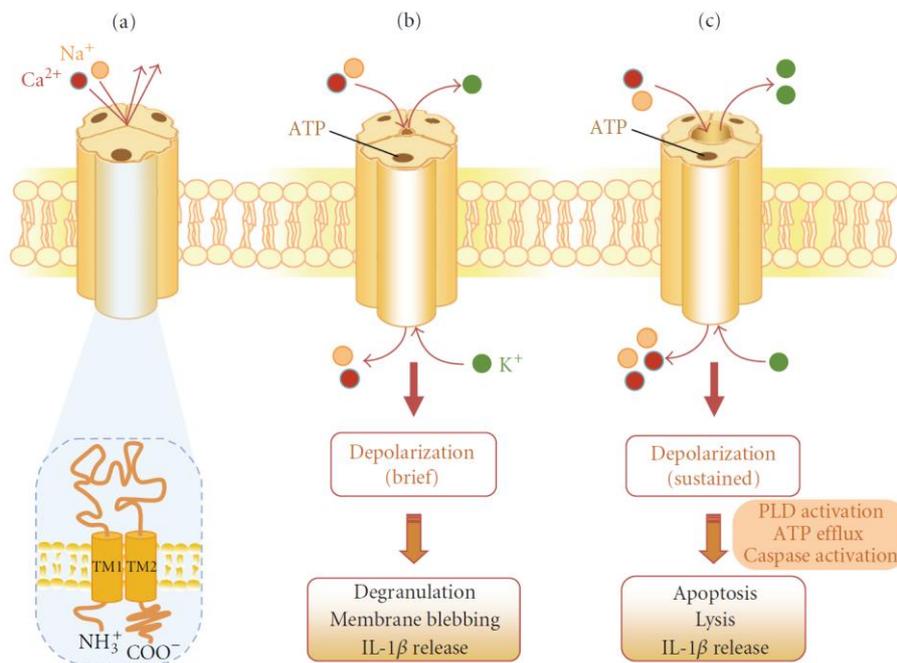


Abbildung 3: Struktur und Signalfunktion des P2X7-Rezeptors. (a) Jeder P2X7-Rezeptor ist ein Trimer, mit drei Proteinuntereinheiten, die um die für Kationen permeable Pore angeordnet sind. Die Untereinheiten haben eine gleiche Topologie, mit 2 Plasmamembran übergreifende Domänen (TM1 und TM2), einem großen Loop mit der ATP Bindungsstelle und 10 ähnlich beanstandete Cysteine und Glykosylierungsstellen sowie intrazelluläre Carboxyl- und Aminoterminis. (b) eine kurze Aktivierung (<10 Sekunden) des P2X7-Rezeptors resultiert in einer schnellen reversiblen Kanalöffnung, welcher für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ permeabel ist. Die akute Rezeptoraktivierung triggert eine Reihe von intrazellulären Abläufen, wie Depolarisation, Degranulation und Membran-Blebbing, sowie andren Signalkaskaden. (c) Eine fortbestehende Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Dilatation des Kanals, was zu einer Membranpassierbarkeit für kationische Moleküle bis zu einer Größe von 900 Da. Darüber hinaus resultiert diese Aktivierung in manchen Zellen in einer Induktion der Apoptose / Zell-Lyse, sowie durch die Aktivierung der Caspase-1 in einer Freisetzung von Interleukin (IL)-1β (Skaper *et al.*, 2009).

Durch den hohen Calciumeinstrom sowie den unselektiven Einstrom durch den dilatierten Kanal, werden verschiedene pro-apoptotische / zytolytische / proinflammatorische Prozesse in Gang gesetzt (Orrenius *et al.*, 2003, Di Virgilio *et al.*, 1998). Einerseits wird eine intrazelluläre Homöostase begünstigt, was zum Absterben der Zelle führt, andererseits werden apoptotische Signalwege eingeleitet, die beispielsweise die Caspase-1 (Auger *et al.*, 2005) oder Caspase

3 / 7 aktivieren (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005). Darüber hinaus induziert die hohe intrazelluläre Calciumkonzentration die Stickstoff-Monoxid-Synthase-Aktivität, was ebenfalls in Apoptose resultiert (Batra and Al-Hijji, 1998, Slater *et al.*, 2003).

Im Vergleich hierzu, hat der Rezeptor unter kurzer Stimulation einen entgegengesetzten Effekt. Wenn er keine dilatierte Pore bildet, wirkt er Wachstumsstimulierend auf die Zelle (Adinolfi *et al.*, 2005). Adinolfi *et al.* konnten 2009 nachweisen, dass NFATc1, ein Transkriptionsfaktor mit Schlüsselfunktion, eine zentrale Rolle in der P2X₇-vermittelten Wachstumsstimulation spielt (Adinolfi *et al.*, 2009). Im Jahr 2012 konnte sie diesen Effekt auch in einem in vivo Experiment an Tumorzellen nachweisen (Adinolfi *et al.*, 2012). Darüber hinaus resultiert aus der P2X₇ Aktivierung die Migration sowie Invasion von Krebszellen (Jelassi *et al.*, 2011).

1.2.9.1 *Non-functional* P2X₇-Rezeptor (nfP2X₇)

Im Jahr 1999 wurden von Baricordi *et al.* erstmals das Vorkommen des Rezeptors in der Zellmembran leukämischer Zellen nachweisen (Baricordi *et al.*, 1999). 2003 wurden diese auch erstmals in epitheliale Tumorgewebe beschrieben (Slater *et al.*, 2003). Worthington *et al.* berichteten 2002, dass der P2X₇-Rezeptor durch Punktmutationen im Bereich der ATP-Bindungsstelle, seine Funktion einbüßen kann, sodass keine Ionen mehr über die Zellmembran gelangen können (Worthington *et al.*, 2002). Dies wurde von Cheewatrakoolpong *et al.* im Jahr 2005 spezifiziert. Er beschrieb bestimmte *Splice*-Varianten in der Expression des Rezeptormoleküls. Diese führen zur Unfähigkeit des Rezeptor-Trimers bei langer und hoher ATP-Exposition eine dilatierte Pore zu bilden. Sluyter *et al.* ergänzten dies 2011 um Single-nucleotide polymorphism (SNP), die in dem gleichen Effekt resultieren (Sluyter and Stokes, 2011, Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005). Der veränderte Kanal hat durch diese Mutationen im Vergleich zum Wildtyp (WT) Kanal nur eine statt 3 aktive Bindungsstellen für ATP (Barden *et al.*, 2014, Sluyter and Stokes, 2011). Dies führt zum Bestehen bleiben des nicht dilatierten, wachstumsfördernden und promigrantischen Effekt des Ionen-Kanals (Sluyter and Stokes, 2011), der nicht dazu in der Lage ist den Zelltod einzuleiten.

Somit wurde er als Non-functional P2X₇-Rezeptor bezeichnet (Barden *et al.*, 2003).

Der Hohe Zellumsatz innerhalb von Tumoren führt darüber hinaus dazu, dass im Tumor Microenvironment (TME) die ATP Konzentration hoch genug ist, um den Rezeptor dauerhaft zu stimulieren (Falzoni *et al.*, 2013, Gilbert *et al.*, 2019) und somit den Wachstumsreiz zu geben.

Slater *et al.* untersuchten 2004 insgesamt 139 Prostatagewebeproben auf den nfP2X₇-Rezeptor. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass der Rezeptor in Resektionspräparaten, welche sich als benigne herausstellten, nicht nachweisbar war. Im Gegensatz dazu, war er in jedem pathologischen Gewebe, Gleason-Score unabhängig, exprimiert.

Bereits im Jahr 2003 wurde von Barden *et al.* ein Antikörper gegen den nfP2X₇-Rezeptor entwickelt. Dieser ist spezifisch gegen das Epitop E200, welches für den *non-functional* Rezeptor spezifisch ist, und keine Affinität zum WT-Rezeptor aufweist (Gilbert *et al.*, 2017, Barden *et al.*, 2003).

2017 veröffentlichen Gilbert *et al.* die Ergebnisse einer Phase I klinischen Studie des Antikörpers BIL010t gegen das E200 Epitop beim Basalzellkarzinom. Es konnte eine Effektivität bzgl. der Größe und der histologischen Regression bei guter Verträglichkeit nachgewiesen werden, sodass eine Phase II Studie geplant ist (Gilbert *et al.*, 2017).

1.3 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand eines gut charakterisierten Kollektivs von Patienten mit high-grade Urothelkarzinom, die Expression des *non-functional* P2X₇-Rezeptors darzustellen und mit klinischen Daten gegenüberzustellen. Es sollte untersucht werden, ob äquivalent zum Prostatakarzinom ebenfalls eine hohe Spezifität des Rezeptors für maligne entartete Zellen des Urothelkarzinoms besteht, ohne dass benigne Zellen diesen exprimieren. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die in der Literatur beschriebenen Rezeptoreigenschaften auch auf das Urothelkarzinom zutreffen.

Im Einzelnen sollten die subzellulären Unterschiede eruiert werden, ob eine Expression ausschließlich auf der Zellemembran vorhanden ist, oder ebenfalls ein Rezeptornachweis im Zytoplasma gelingt.

Für den Fall des Nachweises einer Rezeptorexpression im Zytoplasma, sollte außerdem untersucht werden, ob ein Unterschied zwischen der zytoplasmatischen und membranständigen Rezeptorexpression bezüglich der Dignität der Zelle besteht.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, zu prüfen, ob sich anhand der Expression des Rezeptors eine klinische Prognose bzgl. des T-Stadiums und Metastasierungswahrscheinlichkeit ableiten lässt, da dieser laut Literatur wachstumsstimulierend wirken soll, sowie die Invasion und Metastasierung begünstigt.

Vor der Annahme der Tumorspezifität des nfP2X₇-Rezeptors, sollte geprüft werden, ob dieser als klinischer Marker zur Diagnostik des high-grade Urothelkarzinoms eingesetzt werden kann.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob der nfP2X₇-Rezeptor einen prognosebestimmenden Effekt hat, bzw. ob sich eine Prognose abhängig von der Expression auf das Überleben und den Krankheitsverlauf ableiten lässt.

2 Material-Methodenteil

2.1 Patientenkollektiv

Die Grundlage der Studie bildete ein Kollektiv von Patienten, das bereits im Rahmen anderer Projekte erstellt und zu einem Tissue Microarray (TMA) verarbeitet wurde (Rausch et al., 2015).

Zu diesem Zweck ist eine Gesamtdatenbank mit allen Patienten erstellt worden, die sich einer Zystektomie auf Grund eines Blasenkarzinoms unterzogen haben. Der Behandlungszeitraum für den Studieneinschluss lag zwischen Dezember 1984 und Dezember 2006. Zu jedem eingeschlossenen Patienten wurden weitere persönliche und klinische Daten erfasst. Die zur weiteren Auswertung erstellten Datenbank enthielt nun die Parameter Name, Alter, Geschlecht, Anschrift, Operationsdatum, die Tumoreinteilung nach TNM, sowie die klinischen Verlaufsdaten (Therapie, Rezidiv und tumorabhängiges Versterben) nach der Zystektomie.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob Paraffinblöcke des Tumorgewebes im Archiv der Pathologie vorhanden waren. Dies war essenziell, um im Verlauf einen TMA aus diesen zu erstellen. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung waren noch Blöcke bis zum Januar 1996 im Archiv gelagert, sodass das Kollektiv nun auf einen Zeitraum zwischen Januar 1996 und Dezember 2006 kondensiert wurde. Darüber hinaus war es zur weiteren Verarbeitung nötig, dass genug Tumorgewebe in den entsprechenden Blöcken, sowie ein entsprechendes histologisches Schnittpräparat zur Vorbereitung vorhanden war. Das Schnittpräparat wurde zum Einzeichnen repräsentativer Areale malignen und benignen Gewebes (circled) auf dem Objektträger genutzt. Ziel war es, möglichst zwei Präparate mit benignem als auch malignem Gewebe zu erhalten.

Das Gesamtkollektiv enthielt am Ende 112 Patienten.

2.2 Datenbank

Die Datenbank zur Auswertung der Ergebnisse enthält heute folgende Kategorien und Spalten: Name, Vorname, Geschlecht, Geburtsdatum, Operationsdatum, Pathologienummer, Block-Nummer Karzinom, Blocknummer Benignes Gewebe, TMA-Nummer, Array-Position Tumor, Array Position benignes Gewebe, T, N, M, G, *Cis*, Therapie, Rezidiv, tumorabhängiges Versterben, Overall-Survival, zytoplasmatische Auswertung nfP2X7 und die membranständige Auswertung nfP2X7.

2.3 Tissue Microarray

Das erstmalig 1998 von Kononen beschriebene Verfahren des Tissue Microarray dient der gleichzeitigen Untersuchung einer großen Anzahl von Geweben. Hierzu werden Gewebestanzchen (Donor) aus verschiedenen Geweben mittels Stanzzylinder entnommen und diese in einem leeren Paraffinblock (Recipient) eingebracht. Die Gewebezylinder können zwischen 0,6 mm und 3 mm im Durchmesser groß und sollten 3 bis 4 mm lang sein. Auf diese Weise gelang es Kononen bis zu 1000 Stanzen aus unterschiedlichen Gewebeproben in einen Paraffinblock einzubetten und in einem nächsten Schritt gleichzeitig zu untersuchen. Auch besteht die Möglichkeit mehrere Proben aus einem Block zu entnehmen. Durch den geringen Durchmesser der Stanzen wird der Ursprungsblock (Donor) kaum beschädigt. Auch sehr kleine Mengen an Gewebe können hierdurch asserviert werden. Vorteilhaft ist, dass beim Färben für alle Gewebeproben die gleichen Bedingungen, wie Raumtemperatur und Inkubationszeit bestehen. Das sorgt für eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Stanzen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit die Tumorproben mittels in situ Hybridisierung der DNA oder RNA oder in situ PCR zu untersuchen (Kononen *et al.*, 1998).

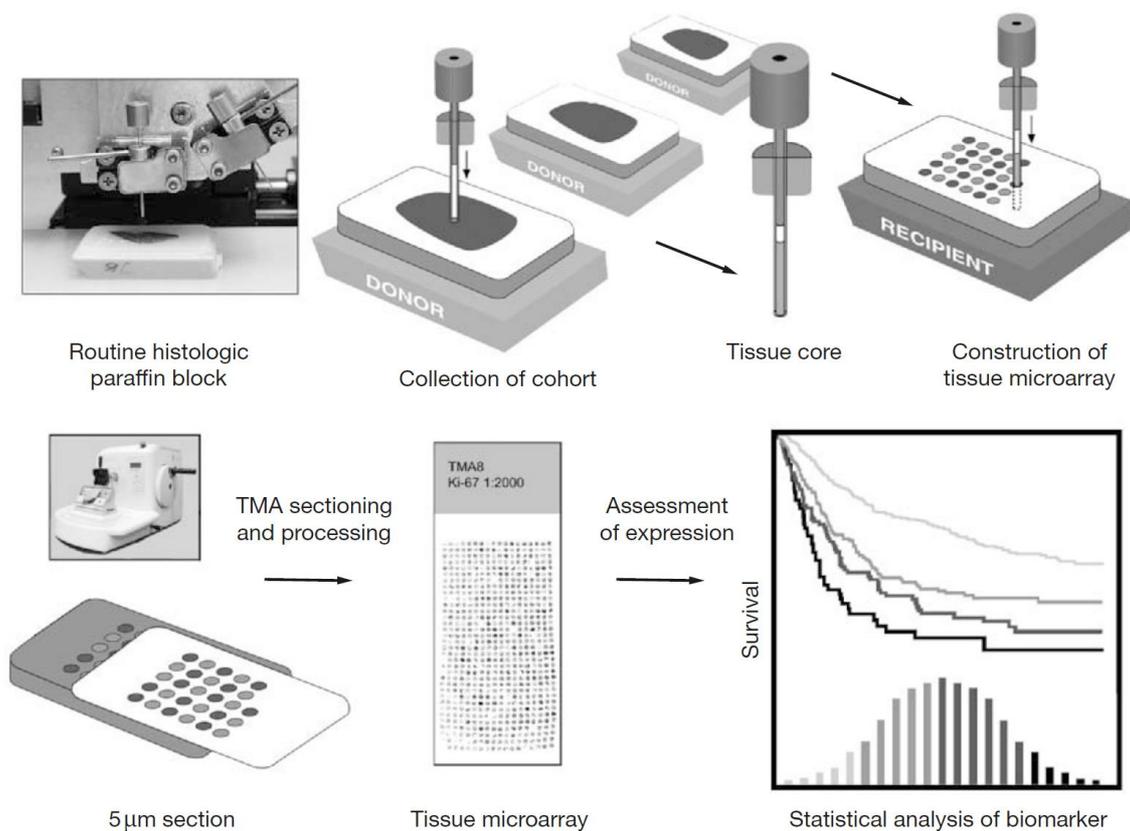


Abbildung 4: Funktionsprinzip des TMA (Giltmane and Rimm, 2004).

Diese Methodik erlaubt es, Gene bzw. Proteine zu identifizieren, welche ggf. Angriffspunkte der Tumorthherapie darstellen könnten. So beschreiben Stenzl und Gakis 2016 den diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Vorteil der molekularen Marker beim high-grade Harnblasenkarzinom (Gakis and Stenzl, 2016). Für die vorliegende Arbeit wurde ein TMA herangezogen, der aus 4 Paraffinblöcken bestand mit insgesamt aus 300 Gewebeprobe.

2.4 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, das von Coons *et al.* 1941 erstmalig beschrieben und in den kommenden Jahren weiterentwickelt wurde. (Coons, 1941, Coons, 1971, Coons and Kaplan, 1950) Sie dient dem Nachweis von Proteinen.

2.4.1 Funktionsprinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie beruht auf dem Prinzip, dass Antikörper spezifisch an bestimmte Antigene binden. Diese Antikörper lassen sich durch Anfärben sichtbar machen.

Hierbei gibt es unterschiedliche Methoden. Die zwei am häufigsten genutzten Möglichkeiten der Färbung werden im Folgenden kurz beschrieben. Bei der direkten Färbemethode werden Antikörper zur Detektion der Proteinstrukturen genutzt, welche zeitgleich eine enzymatische Wirkung haben. Im ersten Schritt werden die Antikörper dem Gewebe zugesetzt. Durch die Antigen-Antikörper-Reaktion bindet der Antikörper spezifisch an das Antigen. Nach der Zugabe eines Substrates spaltet der Enzymteil des Antikörpers, z.B. Flureszin, das Substrat in ein farbiges Produkt, wodurch es sichtbar wird.

Die indirekte Methode hat ein ähnliches Funktionsprinzip. Hierbei fehlt dem Primärantikörper die Enzymwirkung. Der Primärantikörper dient als Signalverstärker. Stattdessen wird ein Sekundärantikörper, welcher spezifisch am Fc-Teil des Primärantikörper bindet und die oben beschriebene Enzymwirkung aufweist, zur Färbung benutzt. Hierdurch kommt es zur Potenzierung der Färbeintensität, da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können.

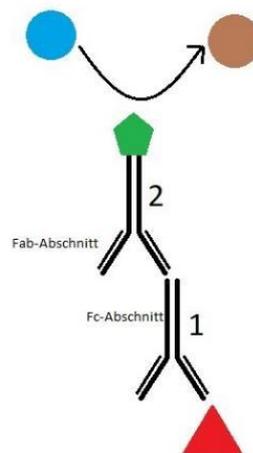


Abbildung 5: Indirekte Methode der Immunhistochemie (Eigene Darstellung) Rotes Dreieck = Antigen, 1 = Primärantikörper, 2 =

Sekundärantikörper, grünes Fünfeck = Enzym, blauer Punkt = Substrat, brauner Punkt = Farbstoff.

2.4.1.1 Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methodik (ABC-Methodik)

Der Nachweis zum Expressionsverhalten des nfP2X7-Rezeptors wurde mittels Vectastain Elite ABC Kit (PK 6200 universal) durchgeführt. Bei dieser Färbung handelt es sich um eine indirekte Nachweismethode, welche mit der ABC-Methode funktioniert. Mit Hilfe der ABC-Methodik lassen sich Antigene einfach und sensitiv in Formalin-fixiertem Gewebe nachweisen. (Hsu *et al.*, 1981b)

Bei Avidin handelt es sich um ein Glycoprotein, welches eine sehr ausgeprägte Affinität zum Vitamin Biotin aufweist. Diese Eigenschaft macht sich sowohl die direkte als auch die indirekte Methode der Immunhistochemischen Färbung zu Nutze. Am Beispiel der indirekten Methode lässt sich dies wie folgt darstellen. Der Primärantikörper bindet an das gesuchte Antigen. In einem folgenden Schritt wird der an Biotin kovalent gebundene Sekundärantikörper hinzugegeben. In einem nächsten Schritt folgt der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, welcher durch seine Affinität an das Biotin des Sekundärantikörper bindet. (Hsu *et al.*, 1981b, Hsu *et al.*, 1981a)

Die Peroxidase des ABC-Komplexes sorgt durch Zugabe von Wasserstoffperoxid in einer oxidativen Reaktion für eine Braunfärbung.

2.4.2 Durchführung der Immunhistochemie

Die Immunhistochemische Färbungen wurden im Kliniklabor der Klinik für Urologie der Universitätsklinik Tübingen von Frau Ursula Kühs durchgeführt, nachdem das Protokoll zur immunhistochemischen Färbung optimiert und etabliert wurde.

2.4.2.1 Protokoll der immunhistochemischen Färbung mittels BPM09 Antikörper

Vor Beginn der Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert. Die Schnitte wurden hierzu dreimal für 10 Minuten mit dem Lösungsmittel Xylol behandelt. Im Anschluss wurden sie in einer Verdünnungsreihe rehydriert. Die Schnitte wurden zweimal für 7 Minuten in 100%iges, zweimal für 7 Minuten in 96%iges und einmal

für 7 Minuten in 70%iges Ethanol getaucht. Im dritten Schritt wurde die endogene Peroxidase reduziert. Dies dient zur Reduktion der durch die endogene Peroxidase hervorgerufenen Hintergrundfärbung. Hierzu wurden die Präparate für 30 Minuten in dreiprozentiger Wasserstoffperoxidlösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in destilliertem Wasser inkubiert. Die Schnitte wurden im Anschluss einmal für 5 Minuten gespült. Hierzu wurde eine Lösung, bestehend aus 0,05M Tris (pH 7,6), 0,15M NaCl und 0,1% Tween 20 (TBST = TRIS buffered Saline with Tween 20) genutzt.

Zur Demaskierung und Intensivierung des Färbeergebnis wurden die Schnitte in 10 mM Citratpuffer (bestehend aus Zitronensäure Monohydrat und Natriumcitrat-Dihydrat) pH 6,0 dreimal für 5 Minuten in der Mikrowelle (Moulinex Mikro-Chef MO 500, Moulinex, Alençon, Frankreich) gekocht und jeweils anschließend zum Abkühlen bei Raumtemperatur für 30 Minuten im Puffer belassen. Die Präparate wurden im Anschluss für 15 Minuten in einer Avidin Lösung inkubiert und zweimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 15 Minuten in einer Biotinlösung inkubiert und wiederum zweimal für 5 Minuten in TBST gewaschen. Die Avidin und Biotin Lösungen stammen aus dem Vector Blocking-Kit Sp-2001 (Vector Laboratories, Burlingame, USA).

Zur Blockierung einer unspezifischen Färbung wurden die Präparate in der Blocklösung aus 1,5% NS horse in TBS für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Blocklösung abgekippt und der Primärantikörper BPM09 (Biosceptre, North Ryde, Australia) in einer Verdünnung von 1:200 hinzugefügt. Die Verdünnung wurde in der Blocklösung angesetzt. Der Primärantikörper wurde über Nacht für 19 Stunden bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal für je 5 Minuten mit TBST gewaschen.

Die Präparate wurden als nächstes mit dem Mouse IgG Antikörper aus dem Kit für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper wurde zuvor 1:200 in der oben genannten Blocklösung verdünnt.

Es erfolgten weitere 3 Spülvorgänge für je 5 Minuten mit TBST.

Die Schnitte wurden anschließend mit Avidin und Biotin inkubiert. Die Lösung (1000 µl TBS + 20 µl A + 20 µl B) wurde 30 Minuten vor dem Auftragen, aus dem Vectastain PK 6102 kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA), angesetzt. Im Anschluss erfolgten drei weitere Spülvorgänge mit TBST für je 5 Minuten.

Die Färbereaktion wurde im Folgenden mit einem Farbsubstrat aus 1000 µl Substratpuffer und 20 µl DAB (3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) aus dem Kit ImmPACT™DAB der Firma Vector (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingeleitet und für zwei Minuten inkubiert.

Vor der Gegenfärbung wurden die Schnitte zweimal für je fünf Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte 45 Sekunden mit Hämatoxylin nach Mayer (Lillie's Modifikation) der Firma Agilent DAKO (Agilent, Santa Clara, CA, USA) inkubiert. Zum Anheben des pH-Wertes wurden diese im Anschluss sieben Minuten mit Leitungswasser gespült, was zu einer verstärkten Blaufärbung führt.

Abschließend wurden die Schnitte zur Dehydrierung je zweimal für 3 Minuten mit 96% Ethanol, dann für zweimal 5 Minuten mit 100% Ethanol und zum Schluss dreimal für 5 Minuten mit Xylol behandelt.

Um die Färbung zu fixieren wurden die Schnitte noch mit Vecta-Mount (Vector Laboratories, Burlingame, USA) Eindeckmedium und einem Deckglas eingedeckt.

2.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die Auswertung selbst wurde anhand von digitalen Scans der Schnitte durchgeführt. Dazu wurden diese mithilfe des Zeiss Mirax Desk (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) digitalisiert. Zur Auswertung am Computer wurde die Software CaseViewer (3DHISTECH, Budapest, Ungarn) genutzt. Mit Hilfe dieser Software konnte das Gewebe bis zu einer Vergrößerung von 1000-fach dargestellt werden. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Auswertungen zu gewährleisten, wurde diese immer mit denselben Umweltbedingungen, am gleichen Laptop (Dell Inspiron 7559,

15,6 Zoll, 4K Auflösung, Dell, Round Rock, USA) unter maximaler Bildschirmhelligkeit durchgeführt.

2.5.1 Etablierung eines Scores zur Auswertung

Nach der ersten Sichtung der Schnitte zeigte sich, dass die Färbungen innerhalb der einzelnen Dots nicht homogen waren. Darüber hinaus kam erschwerend hinzu, dass es sich bei dem nfp2X7 Antigen um ein membranständiges Protein handelt. Daher wurden zwei getrennte Auswertungen der Arrays durchgeführt. Bei der ersten Auswertung wurden die Schnitte bezüglich des allgemeinen Färbeverhaltens untersucht. Es wurde also unabhängig von der Lokalisation der Färbung ein Score ermittelt. Im weiteren Verlauf wurde die allgemeine Färbung als zytoplasmatisch definiert, um die getrennte folgende Auswertung zu verdeutlichen. In der zweiten Auswertung wurde spezifisch die membranständige Färbung ausgewertet. Es zeigten sich unterschiedliche Intensitäten der Färbung innerhalb eines Dots, sodass ein semiquantitativer H-Score (Detre *et al.*, 1995, Kitawaki *et al.*, 1999, Maygarden *et al.*, 1994) entwickelt wurde. Nach der intensiven ersten Evaluation der Schnitte wurden fünf Abstufungen der Färbeintensitäten für die allgemeine Auswertung und vier Abstufungen für die membranspezifische Auswertung festgelegt.

Für die allgemeine Auswertung ergaben sich Stufe 0, keine Braunfärbung; Stufe 1, minimale Braunfärbung; Stufe 2, leichte Braunfärbung; Stufe 3 intensive Braunfärbung und Stufe 4 maximale Braunfärbung der Zellen (Abbildung 6).

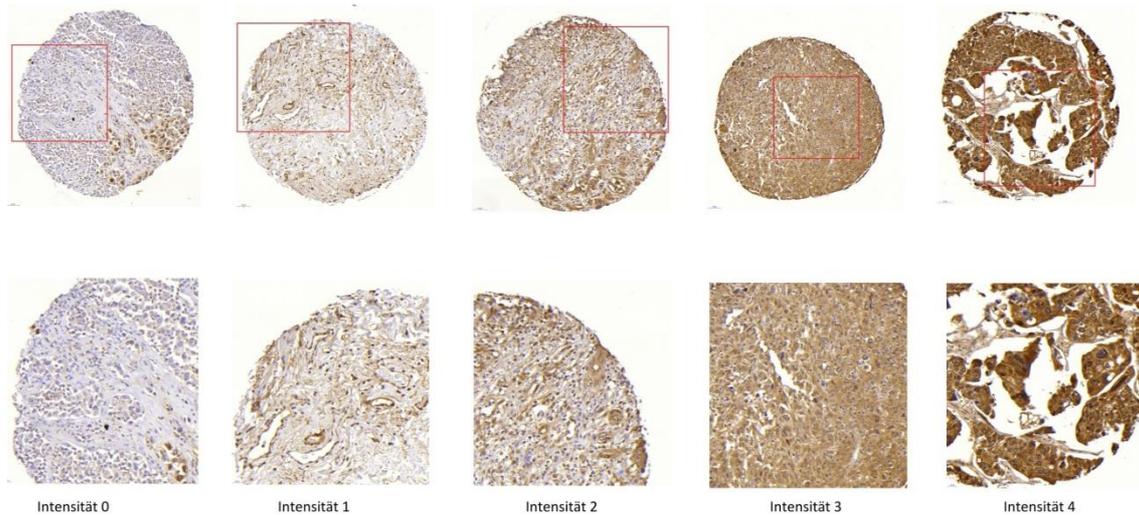


Abbildung 6: Beispiele der jeweiligen Färbeintensitäten *oben* in der Übersicht des Gewebedots (250-fache Vergrößerung), *unten* jeweils der oben rot markierte Ausschnitt in 750-facher Vergrößerung.

Für die rein membranständige Auswertung ergaben sich Stufe 0, keine membranständige Braunfärbung; Stufe 1, leichte membranständige Braunfärbung; Stufe 2, intensivere membranständige Braunfärbung; und Stufe 3 maximale Braunfärbung der Zellmembranen (Abbildung 7).

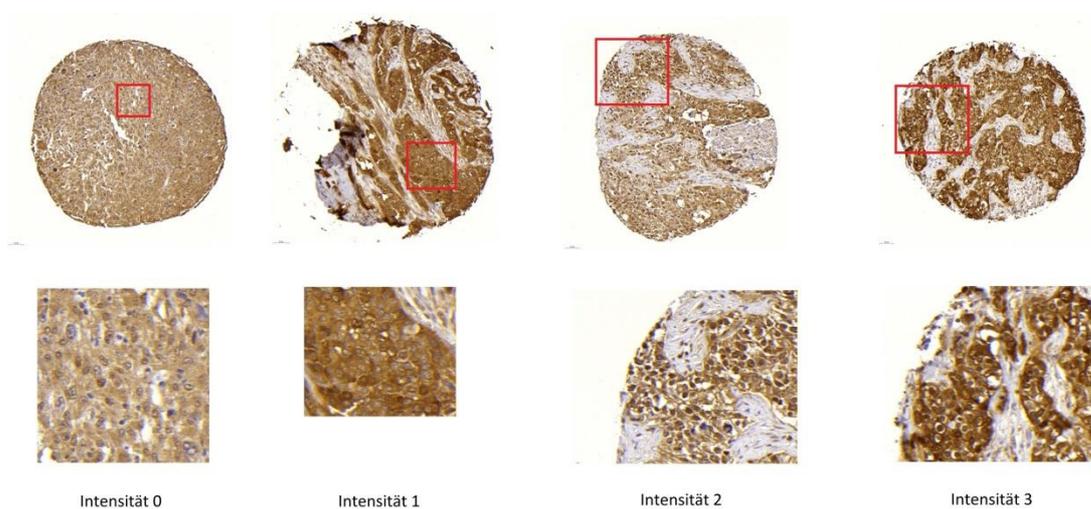


Abbildung 7: Beispiele der jeweiligen membranständigen Färbeintensitäten *oben* in der Übersicht des Gewebedots (250-fache Vergrößerung), *unten* jeweils der oben rot markierte Ausschnitt in 1000-facher Vergrößerung.

Zur Auswertung des H-Scores wurde nur das Urothel (benigne als auch maligne verändert) herangezogen. Die Gesamtheit der Urothelzellen in einem Dot entsprach 100% bezüglich der Auswertung der Färbeintensität. Um die Heterogenität widerzuspiegeln, wurden die Färbeintensitäten in 5% Schritten berücksichtigt.

Zur Berechnung des Score-Wertes eines Dots, wurden die jeweiligen Intensitäten mit ihrer jeweiligen Häufigkeit in Prozent multipliziert. Die Produkte wurden am Schluss addiert, sodass die Summe dieser Rechnung den Score-Wert ergab.

Beispiel: 50% eines Dots hat die Intensität 0, 10% hat die Intensität 1, 20% hat die Intensität 2 und 20% die Intensität 3.

$$(50\% * 0) + (10\% * 1) + (20\% * 2) + (20\% * 3) = 110 \text{ Scorewert}$$

Daraus ergibt sich ein minimaler Score-Wert von 0 (100% Färbeintensität 0) und ein maximaler Score-Wert von 400 (100% Färbeintensität 4) für die allgemeine Auswertung bzw. ein maximaler Score-Wert von 300 (100% Färbeintensität 3) für die membranständige Auswertung.

2.5.2 Durchführung der Auswertung

Für die Auswertung wurden zu Beginn die Array-Maps bezüglich der Dignität verblindet ausgedruckt, sodass nur noch die Pathologienummer vorhanden war. Auf diesen wurden die jeweiligen Färbeintensitäten dem prozentualen Vorkommen auf jedem Dot eingetragen. Auf einem weiteren Ausdruck wurde dann der H-Score als auch die an der häufigsten vorkommenden Intensität dokumentiert. Diese Ergebnisse wurden im weiteren Verlauf in die Datenbank übertragen.

Die Analyse aller Dots wurde zweimal an jeweils unterschiedlichen Tagen durchgeführt, um die Ergebnisse möglichst objektiv zu halten. Im Anschluss wurden die Ergebnisse miteinander verglichen. Zuvor wurde ein Grenzwert festgelegt, um bei einer zu großen Abweichung der beiden Erhebungen eine dritte Erhebung anzuschließen. Dieser wurde mit >50 definiert. Wenn dieser Fall eintrat, wurde der dritte Wert mit den beiden vorherigen verglichen. Lag er näher am höheren bzw. tieferen Wert, wurde jeweils mit diesem der Mittelwert gebildet.

Entsprach der neue Wert dem Mittelwert der beiden zuvor erhobenen Werte, wurde dieser auch als Mittelwert genutzt. Am Ende wurden die Mittelwerte der Ergebnisse in die Datenbank übertragen.

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm JMP (Version 14, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Zur Auswertung konnten die erhobenen Daten aus der Exceltabelle in das Statistikprogramm eingepflegt werden. Es wurden folgende Tests durchgeführt: Test auf Normalverteilung mittels Quantil-Quantil-Diagrammen (Q-Q-Diagrammen), Spearman Rho Korrelation, Kruskal-Wallis-Test, Wilcoxon-Test, Kaplan-Meier Diagramme, univariate und multivariate logistische Regressionsanalysen. Eine Signifikanz wurde angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit bei $p \leq 0,05$ lag.

Der Test der erhobenen Daten auf die Verteilung erfolgte mittels Quantil-Quantil-Diagrammen (Q-Q-Diagrammen). Es zeigte sich, dass keine Normalverteilung vorliegt. Daher wurde folgend nur mit nichtparametrischen Tests gearbeitet.

2.6.1 Evaluation des Patientenkollektives

Zu Beginn wurde das Studienkollektiv auf die Einflussgrößen Geschlecht, Alter bei Operation, Tumor-Stadium (T), Lymphknotenstatus (N), Metastasierungsstatus (M), Resektionsausmaß (R), Grading (G) und Gesamtüberleben untersucht, sowie die Häufigkeitsverteilungen und statistische Kenngrößen, wie Median, Mittelwert und Standardabweichung erhoben.

2.6.2 Korrelations-Test

Nachfolgend wurden die Häufigkeitsverteilungen der Zielgrößen, sprich der Färbeintensitäten (bzgl. benignes Gewebe, malignes Gewebe, zytoplasmatische Färbung, membranständige Färbung) untersucht. Diese wurden darüber hinaus mittels Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (Spearman, 1904) auf lineare Zusammenhänge, sowie mittels Wilcoxon/Kruskall-Wallis-Test (Kruskal, 1952) und dem Exakter-Chi-Quadrat-Test (Bosch, 1997) analysiert.

Anschließend wurden die epidemiologischen Daten (Alter und Geschlecht) und die klinischen Daten (T-Stadium, Grading, Metastasierung und Lymphknotenstatus) hinsichtlich der Zielgrößen betrachtet. Der Zusammenhang bzgl. des Alters wurde mittels Spearmans Korrelationsanalyse untersucht und das Geschlecht sowie die klinischen Daten wurden mittels Wilcoxon/Kruskall-Wallis-Test und Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Zur Auswertung der klinischen Daten wurden diese zuvor dichotomisiert: T=2, T>2; G2, G>2; N0, N>0.

2.6.3 Outcome Uni- und Multivariat

Abschließend wurde die Korrelation der Expression im malignen Gewebe mit den Daten der klinischen Endpunkte bestimmt. Die klinischen Endpunkte bestanden aus dem Wiederauftreten der Tumorerkrankung (Rezidiv), dem tumorspezifischem Überleben (CSS) sowie dem Gesamtüberleben (OAS). Zur Erstellung der Kaplan-Meier-Kurven wurde die jeweils ausgewertete Färbestärke mittels Medianwertes dichotomisiert und anschließend mit dem Wilcoxon Test auf Unterschiede untersucht. Die univariate und multivariate Auswertung erfolgte mittels logistischer Regressionsanalyse. Hierzu wurde der Effekt-Likelihood-Verhältnistest angewendet. In die multivariate Analyse wurde nur die Parameter einbezogen, welche zuvor in der univariaten Analyse signifikant waren. Für den Fall, dass zu viele univariate Parameter signifikant waren, wurde um eine ausreichend hohe Zahl an Ereignissen für die multivariate Analyse zu haben, diese auf mehrere Auswertungen aufgeteilt.

2.7 Verwendete Software-Programme

Datenbankerstellung: Microsoft Excel 2019[®] (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim)

Textverarbeitung: Microsoft Word 2019[®] (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim)

Literaturverwaltung: EndNote X8[®] (Thomson Reuters, New York City, Vereinigte Staaten)

Mikroskopierprogramm: CaseViewer 2.2[®] (3DHISTECH, Budapest, Ungarn)

Statistikprogramm: JMP 14.2.0® (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)

2.8 Ethikvotum

Die vorliegende Studie wurde im Rahmen von bereits durchgeführten Urothelkarzinom-TMA-Studien der Universitätsklinik Tübingen, als Teil eines Verbundprojekts mit vergleichbarem Studiendesign durchgeführt. Der Prüfplan liegt der Ethikkommission, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Luft, vor. Das Projekt wurde mit der Nummer 279/2013BO2 vom 24.05.2013, als *retrospektive immunhistochemische Untersuchung zur Expression onkologisch relevanter Proteinparameter beim muskelinvasiven Urothelkarzinom der Harnblase mittels der Tissue Micro Array Technik*, als positiv beschieden.

2.9 Datenschutz

Sowohl die bei dem erstellten als auch die für die Statistik genutzte Datenbank, wurden alle vertraulichen Patientendaten anonymisiert weiterverarbeitet. Die Computer, die zur Auswertung der Datenbanken, sowie zur Auswertung der Pathologieberichte genutzt wurden, waren lediglich für Mitarbeiter/innen der Urologie in Tübingen zugänglich und Passwortgeschützt. Die ärztliche Schweigepflicht wurde zu jeder Zeit gewahrt.

3 Ergebnisse

3.1 Eigenschaften des Kollektivs

3.1.1 Geschlechts und Altersverteilung

Das endgültige Patientenkollektiv enthielt zum Zeitpunkt der Auswertung 102 Probanden. Das Kollektiv der Frauen war mit 24 Probandinnen (23,3%) deutlich kleiner als das Kollektiv der Männer mit 78 Probanden (76,7%) (Abbildung 8a) Die Spannweite des Alters bei der Operation lag zwischen 32 und 84 Jahren, wobei das mediane Alter bei der Operation von 69 Jahren ermittelt wurde. Der Mittelwert lag bei 65,9 Jahren und die Standardabweichung bei 10,8 Jahren (Abbildung 8b).

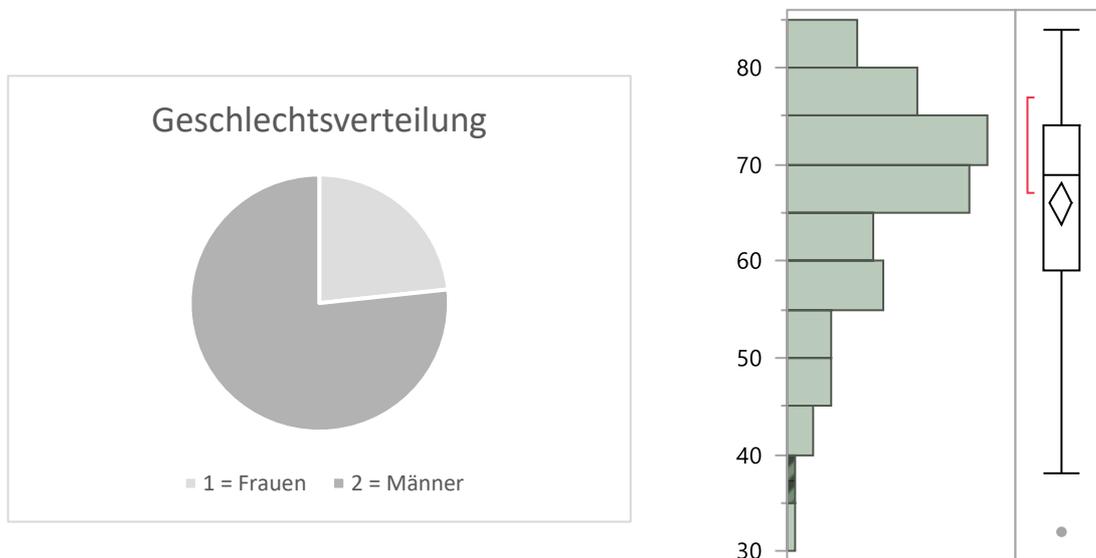


Abbildung 8: 8a (links) und 8b (rechts): Geschlechts und Altersverteilung im Patientenkollektiv.

3.1.2 Pathologische Daten: TNM-Klassifikation und Grading

Da bei allen 102 Patienten eine Zystektomie durchgeführt wurde, lagen zu jedem Patienten auch die erhobenen ordinal skalierten Werte der TNM-Klassifikation vor. Die Verteilung des T-Stadiums präsentierte sich wie folgt: Das T-Stadium T2a lag bei 16 Patienten (15,6%), T2b bei 14 Patienten (13,7%) der Patienten vor. In dem die Blasenwand überschreitenden Stadium T3 befanden sich

insgesamt ca. die Hälfte der Patienten. T3a enthielt 24 Patienten (23,6%) und T3b ebenfalls 24 Patienten (23,6%). Im Stadium T4a befanden sich 18 Patienten (17,6%) und im höchsten Stadium T4b sechs Patienten (5,9%). Der Lymphknotenstatus ergab folgende Ergebnisse: Bei vier der 102 Patienten wurde der Lymphknotenstatus nicht ermittelt. N0 57 Patienten (58,2%), N1 24 Patienten (24,5%), N2 15 Patienten (15,3%) und N3 zwei Patienten (2%). Entsprechend dem Lymphknotenstatus wurden beim Metastasierungsstatus bei vier Patienten keine Werte erhoben. Eine Metastasierung lag bei neun Patienten (9,9%) vor. Bei 89 Patienten (90,1%) wurde diese ausgeschlossen. Das Grading wurde wiederum bei allen 102 Patienten durchgeführt und verteilte sich wie folgt: Bei 24 Patienten (23,5%) wurde G2 und bei 78 Patienten (76,5%) G3. Der erhobenen Resektionsstatus ergaben folgendes: R0 83 Patienten (81,4%), R1 16 Patienten (15,7%) und R2 drei Patienten (2,9%).

Tabelle 3: Charakterisierung des Patientenkollektivs.

Allgemeine Informationen und klinische Daten des Patientenkollektivs	
Geschlechterverhältnis	24% (24): Frauen
	76 % (78): Männer
Alter bei Zystektomie (Jahre)	Median: 69 Jahre
	Mittelwert: 65,9 Jahre
	Jüngstes Alter bei OP: 32 Jahre
	Ältestes Alter bei OP: 84 Jahre
Tumorstadien	30 % (30): ≤ T2b
	70% (72): > T2b
N-Stadien	58 % (57): N0
	24 % (24): N1
	15 % (15): N2
	2 % (2): N3
M-Stadien	90 % (89): M0
	10 % (9): M1
Grading	24 % (24): G2
	76 % (78): G3
R-Status	82% (83): R0
	15% (16): R1s
	3% (3): R2

3.2 Deskription des Färbeverhaltens bzgl. Expression und subzellulärer Verteilung des nfP2X₇

3.2.1 Deskription der Färbung

Die Färbung des Epitops E200 des nfP2X₇-Rezeptors durch den BPM09 Antikörper präsentierte sich in unterschiedlichen Braunintensitäten. Die Auswertung wurde, wie in Kapitel 2.5. Auswertung der immunhistochemischen Färbung beschrieben, durchgeführt. Die Expression des Rezeptors konnte sowohl in malignem als auch benignem Gewebe nachgewiesen werden (Abbildung 9). Im Allgemeinen wurden Epithelzellen gefärbt, wobei eine besondere Affinität zum Urothel ersichtlich war. Die Färbung erstreckte sich gleichermaßen von der Basalzellschicht bis zu apikal gelegenen luminalen Zellschicht mit den Umbrella-Cells. Es fiel auf, dass es unterschiedliche Arten

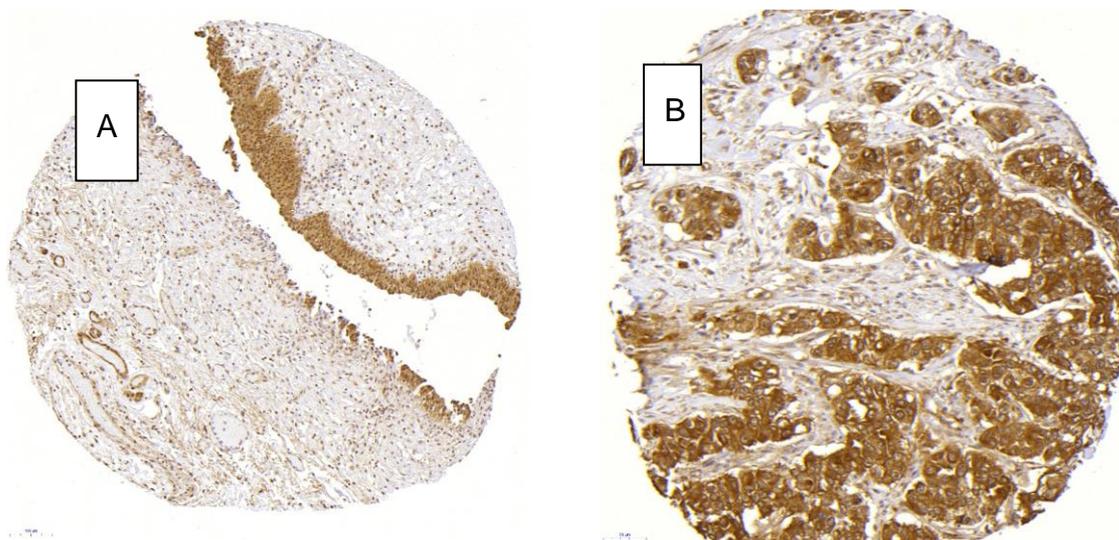


Abbildung 9: BPM09-Antikörperfärbung als Braufärbung dargestellt A: benignes Urothel eines gesamten Gewebedots; B: Urothelkarzinom eines gesamten Gewebedots (Vergrößerung 250-fach).

der Expression bzgl. der subzellulären Färbung gab. Einerseits gab es intensive intrazelluläre, zytoplasmatische Färbungen, andererseits zeigten sich intensive membranständige Rezeptorexpressionen mit deutlich reduzierter zytoplasmatischer Komponente (Abbildung 10). Allgemein lag innerhalb einzelner Proben ein sehr heterogenes, clusterhaftes Färbeverhalten, bezgl. der Intensität und teils auch der Verteilung der vor. Der Nachweis des Rezeptors

konnte sowohl in benignen als auch maligne veränderten Zellen nachgewiesen werden.

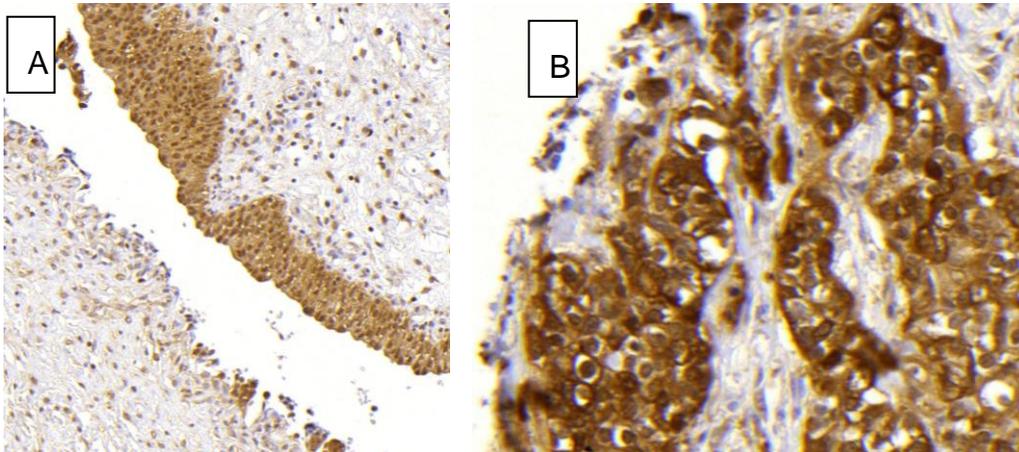


Abbildung 10: Beispielbilder (A) zyttoplasmatische Färbung am Beispiel einer benignen Gewebeprobe und (B) membranständige Färbung am Beispiel eines maligne veränderten Gewebedots. Jeweils Ausschnitt eines Gewebedots in 8-facher Vergrößerung.

3.2.2 Auswertung der Expression in Normalgewebe und Tumorgewebe sowohl membranständig als auch zytoplasmatisch

Im Folgenden wurde die Verteilung der Expression des nP2X_7 -Rezeptors anhand der immunhistochemischen Färbeintensität ausgewertet. Diese Auswertung bezog sich sowohl auf die membranständige als auch zytoplasmatische Expression im Tumor- und Normalgewebe.

3.2.2.1 Nachweis des Rezeptors im Tumor und Normalgewebe bezüglich der subzellulären Expression

Tabelle 4: Nachweis der subzellulären Rezeptorexpression im Tumor und Normalgewebe.

	nfP2X ₇ -Rezeptorexpression (Prozent) vorhanden
Zytoplasmatisch Tumor	102 (100%)
Zytoplasmatisch benigne	32 (100%)
Membranständig Tumor	80 (78,4%)
Membranständig benigne	5 (15,3%)

In Tabelle 4 ist der allgemeine Nachweis des nfP2X₇-Rezeptors bezüglich seiner subzellulären Expression dargestellt. Zytoplasmatisch ist der Rezeptor sowohl im Tumor als auch im Normalgewebe zu 100% nachweisbar. Membranständig ist der auf 78,4% der Tumore und auf 15,3 % des benignen Gewebes nachweisbar.

Die Normal Quantilen Plots ließen die Vermutung zu, dass bei der Rezeptornachweis in keiner der oben genannten Konstellationen normalverteilt ist. Dies bestätigte der Shapiro-Wilks W Test (Zytoplasmatisch Tumor: $W=0,934525$; $p < 0,0001^*$; Zytoplasmatisch benigne: $W=0,656531$; $p < 0,0001^*$; Membranständig Tumor: $0,859809$; $p < 0,0001^*$; Membranständig benigne: $0,294161$; $p < 0,0001^*$).

3.2.2.2 Verteilungen der membranständigen Färbeintensität des nfP2X7-Rezeptors in Tumor- und Normalgewebe

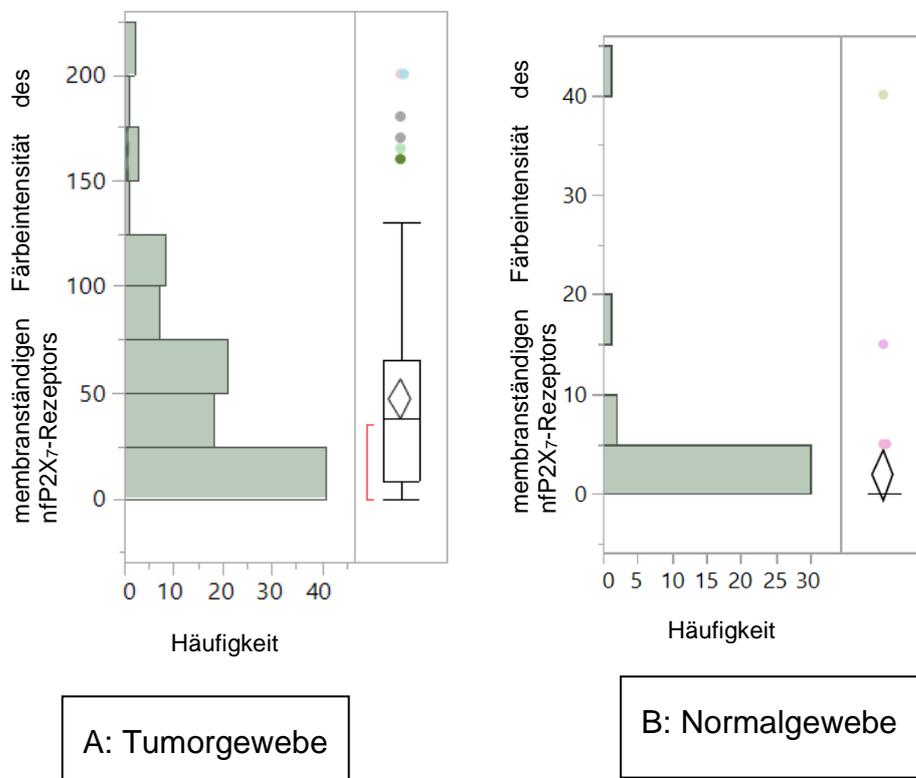


Abbildung 11: Verteilungen der membranständigen Färbeintensität des nfP2X7-Rezeptors in (A) Tumorgewebe und (B) Normalgewebe.

Tabelle 5 zeigt die statistischen Kenngrößen des Expressionsverhaltens der membranständigen Färbung des nfP2X7-Rezeptors sowohl in benignem als auch malignen Gewebes. Die Auswertung ergab für die membranständige Rezeptorexpression im Tumor einen Mittelwert von 46,76 mit einer Standardabweichung von 47,54 und für das Normalgewebe einen Mittelwert von 1,91 sowie eine Standardabweichung von 7,28.

Der Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilks W Test, konnte diese nicht bestätigen (Membranständig Tumor: 0,859809; $p < 0,0001^*$; Membranständig benigne: 0,294161; $p < 0,0001^*$)

Tabelle 5: membranständiges Expressionsverhalten des nfP2X₇-Rezeptors in Tumor- und Normalgewebe.

	nfP2X ₇ -Rezeptor membranständig im Tumor	nfP2X ₇ -Rezeptor membranständig im Normalgewebe
Mittelwert	46,76	1,91
Std.-Abw.	47,54	7,28
Std.-Fehler Mittelwert	4,71	1,25
95% KI oben Mittelwert	56,10	4,45
95% KI unten Mittelwert	37,43	-0,63
N	102	34

Tabelle 6 zeigt die statistischen Kenngrößen des Expressionsverhaltens der zytoplasmatischen Färbung des nfP2X₇-Rezeptors sowohl in benignem als auch malignen Gewebes. Im Tumorgewebe liegt ein Mittelwert von 300,1 mit einer Standardabweichung von 74,13 vor. Das Normalgewebe zeigt einen Mittelwert der Rezeptorexpression von 342,5 mit einer Standardabweichung von 49,12.

Auch bei der zytoplasmatischen Färbung konnte keine Normalverteilung gezeigt werden (Zytoplasmatisch Tumor: $W=0,934525$; $p < 0,0001^*$; Zytoplasmatisch benigne: $W=0,656531$; $p < 0,0001^*$)

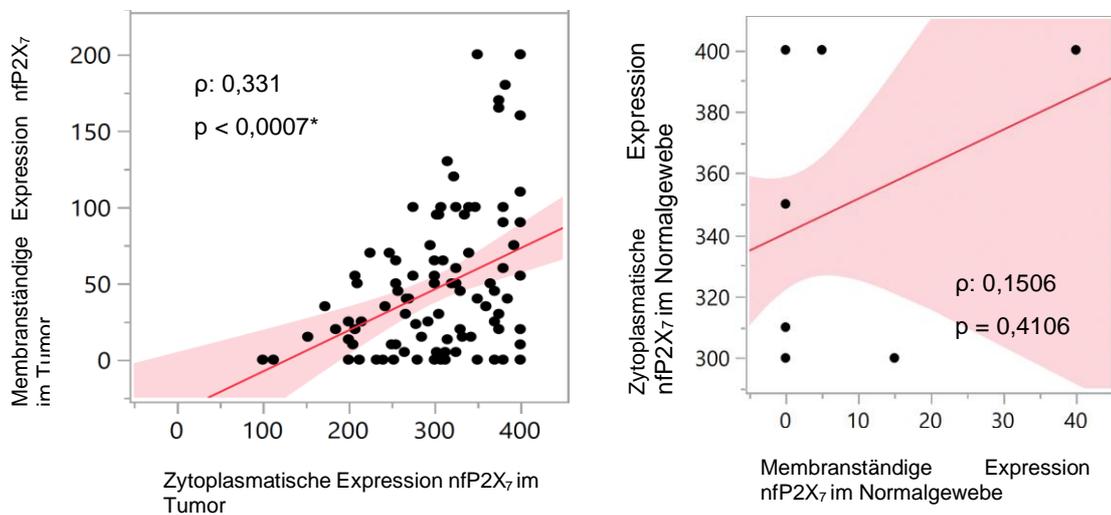
Tabelle 6: Zytoplasmatisches Expressionsverhalten des nfP2X₇-Rezeptor in Tumor- und Normalgewebe.

	nfP2X ₇ -Rezeptor zytoplasmatisch im Tumor	nfP2X ₇ -Rezeptor zytoplasmatisch im Normalgewebe
Mittelwert	300,1	342,5
Std.-Abw.	74,1	49,1
Std.-Fehler Mittelwert	7,3	8,7
95% KI oben Mittelwert	314,6	360,2
95% KI unten Mittelwert	285,6	324,8
N	102	32

3.2.2.3 Individueller Zusammenhang der subzellulären Expression des nfP2X₇-Rezeptors in benignem Gewebe und malignem Gewebe

Der multivariate Spearmans Rangkorrelationskoeffizient zeigte, dass keine Korrelation zwischen der membranständigen Expression des Rezeptors und der zytoplasmatischen Expression des Rezeptors in benignem Gewebe besteht (Abbildung 12: Spearman ρ : 0,1506; $p > 0,4106$).

Für Tumorgewebe konnte eine Korrelation hierfür nachgewiesen werden (Abbildung 12: Spearman ρ : 0,3317; $p < 0,0007^*$). Diese ist aus Abbildung 12 ersichtlich.



	Spearman ρ	p-Wert
Normalgewebe	0,1506	0,4106
Tumorgewebe	0,3317	< 0,0007*

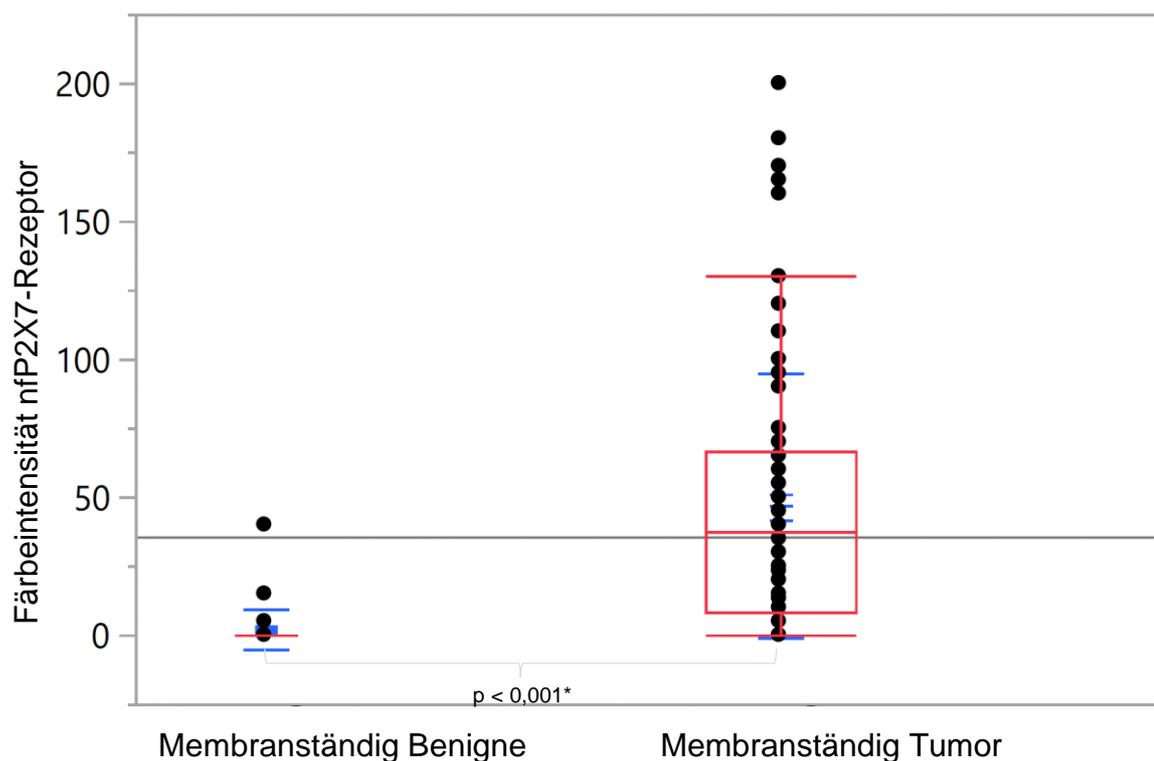
Abbildung 12: Linearer Zusammenhang zwischen der Membranständigen und Zytoplasmatischen Expression des nfP2X₇-Rezeptors. Die Abbildung zeigt dies links am Tumorgewebe und rechts am Normalgewebe. Signifikante p-Werte mit * markiert.

3.3 Expression des nfP2X₇-Rezeptors in Normalgeweben im Vergleich zu Tumorgewebe

Die Q-Q-Plots des membranständigen und zytoplasmatischen Expressionsverhaltens zeigten eine fehlende Normalverteilung sowohl bei benignem als auch malignem Gewebe. Daher wurde im Folgenden mit nichtparametrischen Tests (Spearman's Rho, Wilcoxon Test) gearbeitet.

3.3.1 Membranständige Expression des nfP2X₇ Rezeptor: Tumor versus Normalgewebe

Der Vergleich des membranständigen Expressionsverhaltens des nfP2X₇-Rezeptors ergab die Abbildung 13 aufgeführten Ergebnisse. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der membranständigen Expression des Rezeptors in Tumor und Normalgewebe nachgewiesen werden (Abbildung 13: $p < 0,001^*$). Die Expression war im Tumorgewebe stärker nachweisbar.

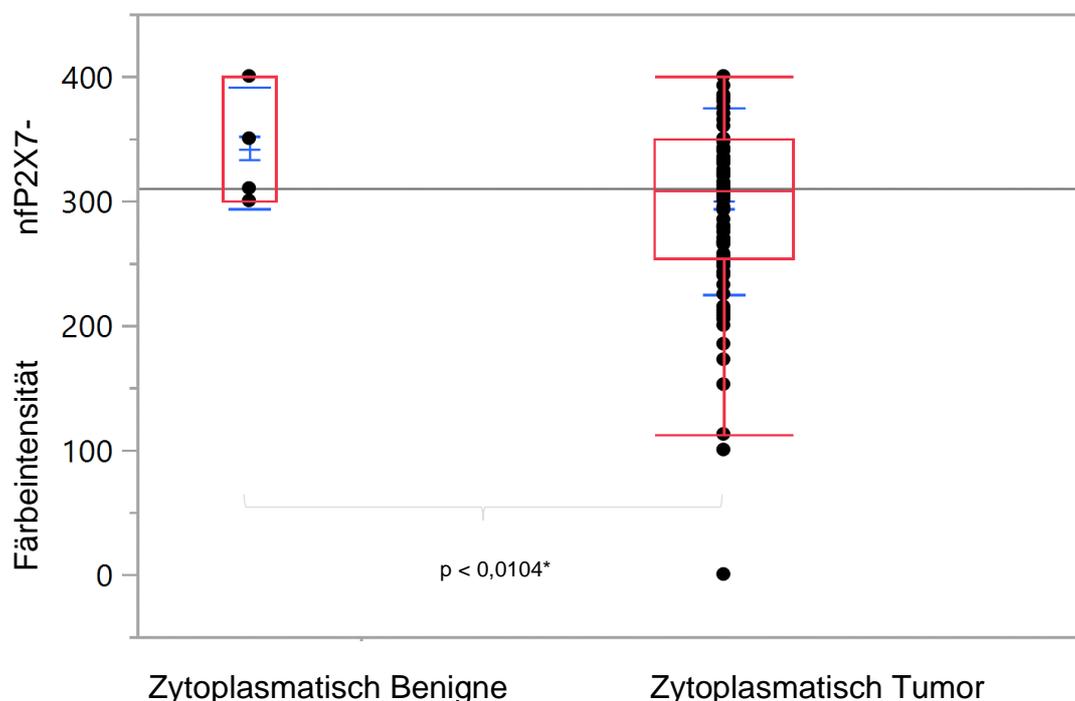


Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std-Abweichung	Std-Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Normalgewebe	34	1,91 (0)	7,28	1,24	-0,62	4,45
Tumorgewebe	102	46,76 (37,5)	47,53	4,70	37,42	56,10

Abbildung 13: Vergleich der membranständigen Expression des nfP2X₇-Rezeptors in Tumor und Normalgewebe. Signifikante p-Werte mit * markiert.

3.3.2 Zytoplasmatische Expression des nfP2X₇ Rezeptor: Tumor versus Normalgewebe

Die Auswertung des Expressionsverhaltens des nfP2X₇-Rezeptors in der immunhistochemischen zytoplasmatischen Färbung bei Tumor und Normalgewebe ergaben die in Abbildung 14 aufgeführten Werte. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Tumor und Normalgewebe, wobei eine stärkere zytoplasmatische Expression im Normalgewebe bestand (Abbildung 14: $p = 0.0104$)



Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std-Abweichung	Std-Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Normalgewebe	32	342,5 (300)	49,12	8,68	324,78	360,21
Tumorgewebe	102	300,06 (307)	74,12	7,30	285,5815	314,55

Abbildung 14: Vergleich der zytoplasmatische Expression des nfP2X₇-Rezeptors in Tumor und Normalgewebe. Signifikante p-Werte mit * markiert.

3.3.3 Expression des nfP2X₇ Rezeptors: Tumor *versus* Normalgewebe desselben Patienten

Zur Analyse der Korrelation zwischen der Expression des Rezeptors in benignem und malignem Gewebe wurde der Spearman Rangkorrelationskoeffizient bestimmt. Dies wurde getrennt für die membranständige und die zytoplasmatische Expression durchgeführt. Die Ergebnisse liegen zusammengefasst in Tabelle 7 vor.

3.3.3.1 Korrelation des membranständigen Rezeptors

Für die Expression des membranständigen Rezeptors konnte keine Korrelation zwischen malignem und benignem Gewebe festgestellt werden (Spearman ρ : 0,0592; $p = 0,7395$)

3.3.3.2 Korrelation des zytoplasmatischen Rezeptors

Der zytoplasmatische Rezeptor zeigte eine geringe Korrelation zwischen Tumor und Normalgewebe (Spearman ρ : 0,3511 $p = 0,0488^*$).

Tabelle 7: Linearer Zusammenhang Tumor *versus* Normalgewebe in der subzellulären membranständigen und zytoplasmatischen Expression des nfP2X₇-Rezeptors. Signifikante p-Werte mit * markiert.

	Spearman ρ	p-Wert
Membranständiger Rezeptor	0,0592	0,7395
Zytoplasmatischer Rezeptor	0,3511	0,0488*

3.4 Korrelation der Expression des nfP2X₇ Rezeptors mit epidemiologischen Daten

Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob die Expression des nfP2X₇-Rezeptors eine Korrelation zum Alter aufweist, und ob geschlechterspezifische Unterschiede in der Expression des Rezeptors vorliegen.

3.4.1 Korrelation des Alters bei der Operation mit der Expression des nfP2X₇ Rezeptor

Es wurde mittels multivariatem Rangsummenkorrelationskoeffizient (Spearman's ρ) überprüft, ob eine Korrelation zwischen dem Alter und der Expression des nfP2X₇-Rezeptors besteht. Die Ergebnisse werden in Tabelle 8 am zusammengefasst.

Bei der Untersuchung, ob eine Korrelation zwischen dem Alter und der membranständigen Rezeptorexpression im Tumorgewebe bestand, zeigte sich, dass diese nicht vorlag (Spearman ρ : -0,1298; p = 0,1935). Die Untersuchung für die zytoplasmatische Rezeptorexpression im Tumorgewebe zeigte ebenfalls keinen linearen Zusammenhang (Spearman ρ : 0,0647; p = 0,5164). Die Analyse des multivariaten Rangsummenkorrelationskoeffizienten zeigte weder bei der membranständigen Expression im Normalgewebe (Spearman ρ : 0,1192; p = 0,5020) noch bei der zytoplasmatischen Expression im Normalgewebe eine Signifikanz (Spearman ρ : 0,1415; p = 0,4397).

Tabelle 8: Linearer Zusammenhang zwischen subzellulärer Rezeptorexpression (membranständig und zytoplasmatisch) der beiden Dignitäten zum Alter der Probanden.

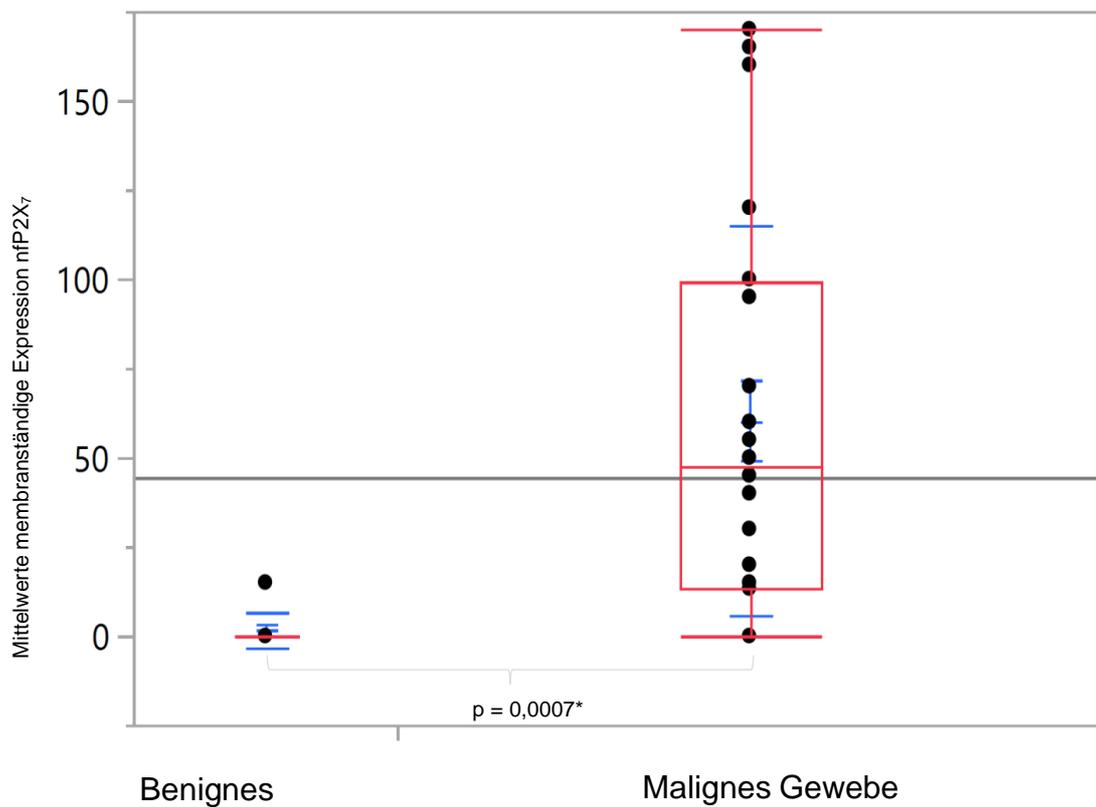
	Spearman ρ	p-Wert
Membranständiger Rezeptor im Tumor	-0,1298	0,1935
Membranständiger Rezeptor im Normalgewebe	0,1192	0,5020
Zytoplasmatischer Rezeptor im Tumor	0,0647	0,5164
Zytoplasmatischer Rezeptor im Normalgewebe	0,1415	0,4397

3.4.2 Korrelation des Geschlechts mit der Expression des nfP2X₇ Rezeptor

Mittels Wilcoxon/Kruskall-Wallis-Test und Chi-Quadrat-Test wurde untersucht, ob geschlechterspezifische Unterschiede sowie Unterschiede zwischen den Geschlechtern bei der Expression des non-functional ATP-Rezeptors vorliegen. Hierzu wurden wiederum die Daten der subzellulären Expression sowie die Dignität des Gewebes verwendet und jeweils geschlechterspezifisch analysiert.

3.4.2.1 Membranständige Expression in der Subgruppe der weiblichen Patienten

Der Vergleich zwischen den Dignitäten benigne und maligne bei der membranständigen Expression des nfP2X₇-Rezeptors, zeigte einen signifikanten Unterschied beim weiblichen Geschlecht (Abbildung 15; $p = 0,0007^*$). Die Ergebnisse der statistischen Auswertung befinden sich in Abbildung 15.

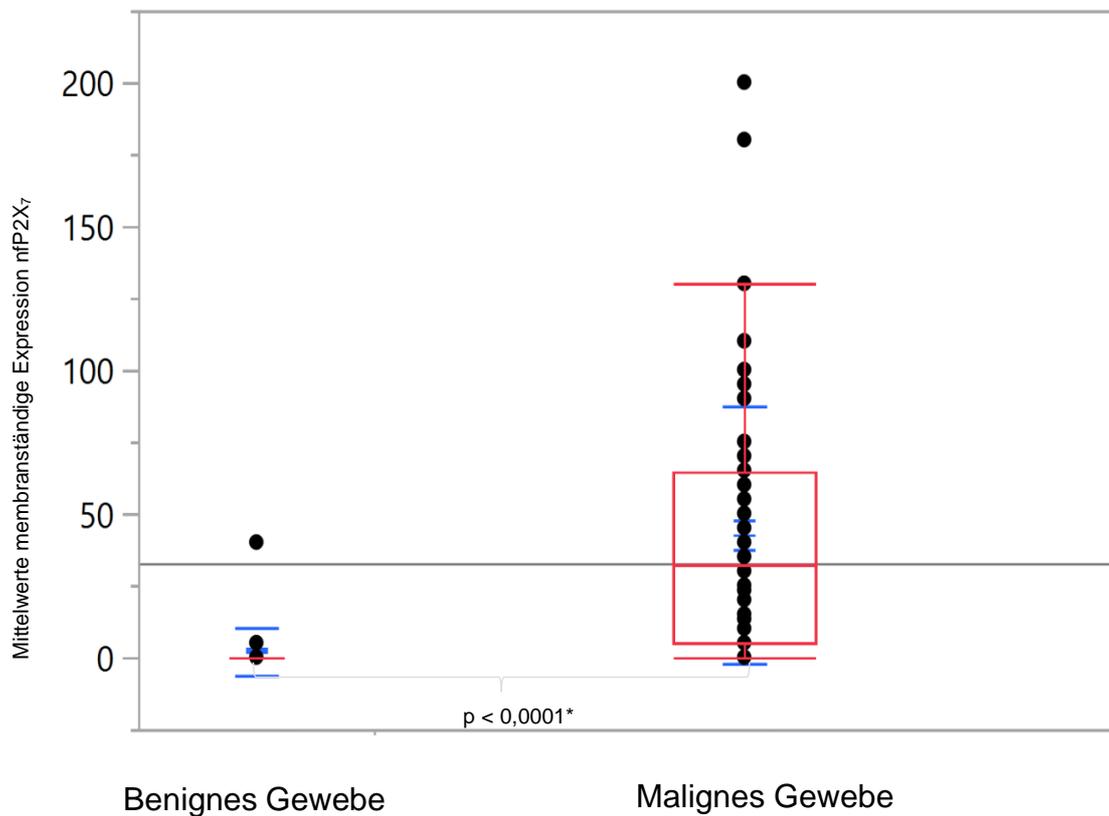


Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std-Abweichung	Std-Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Membranständig Expression im Normalgewebe (weiblich)	9	1,66 (0)	5,00	1,66	-2,17	5,51
Membranständig Expression im Tumorgewebe (weiblich)	24	60,34 (47,5)	54,43	11,11	37,36	83,33

Abbildung 15: Vergleich der membranständigen Expression des nfP2X7-Rezeptors in Tumor und Normalgewebe beim weiblichen Geschlecht. Signifikante p-Werte mit * markiert.

3.4.2.2 Membranständige Expression in der Subgruppe der männlichen Patienten

Die Untersuchung auf Unterschiede zwischen benignem und malignem Gewebe auf die Expression des membranständigen Rezeptors zeigte einen signifikanten Unterschied (Abbildung 16; $p < 0,0001^*$). In Abbildung 16 sind die statistischen Werte aufgezeigt.

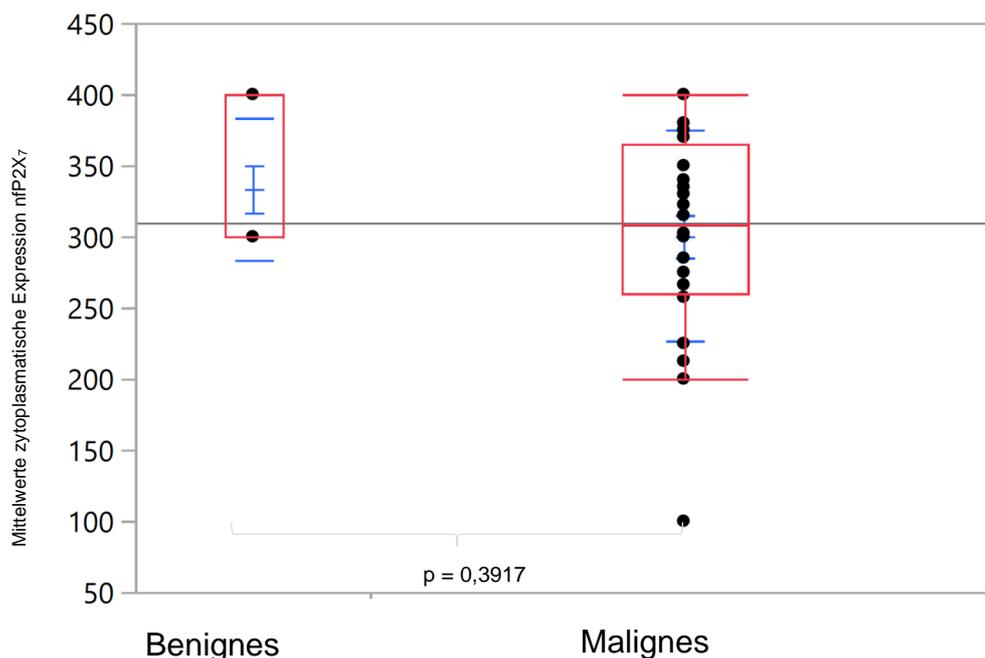


Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std-Abweichung	Std-Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Membranständig Expression im Normalgewebe (männlich)	25	2 (0)	8,03	1,60	-1,31	5,31
Membranständig Expression im Tumorgewebe (männlich)	78	42,58 (32,5)	44,76	5,06	32,49	52,67

Abbildung 16: Vergleich der membranständigen Expression des nfP2X7-Rezeptors in Tumor und Normalgewebe beim männlichen Geschlecht. Signifikante p-Werte mit * markiert.

3.4.2.3 Zytoplasmatische Expression in der Subgruppe der weiblichen Patienten

Die Ergebnisse der Auswertung des Vergleichs zwischen benignem und malignem Gewebe in der zytoplasmatischen Färbung ergab keinen signifikanten Unterschied beim weiblichen Geschlecht (Abbildung 17; $p = 0,3917$). In Abbildung 17 sind die statistischen Werte dargestellt.

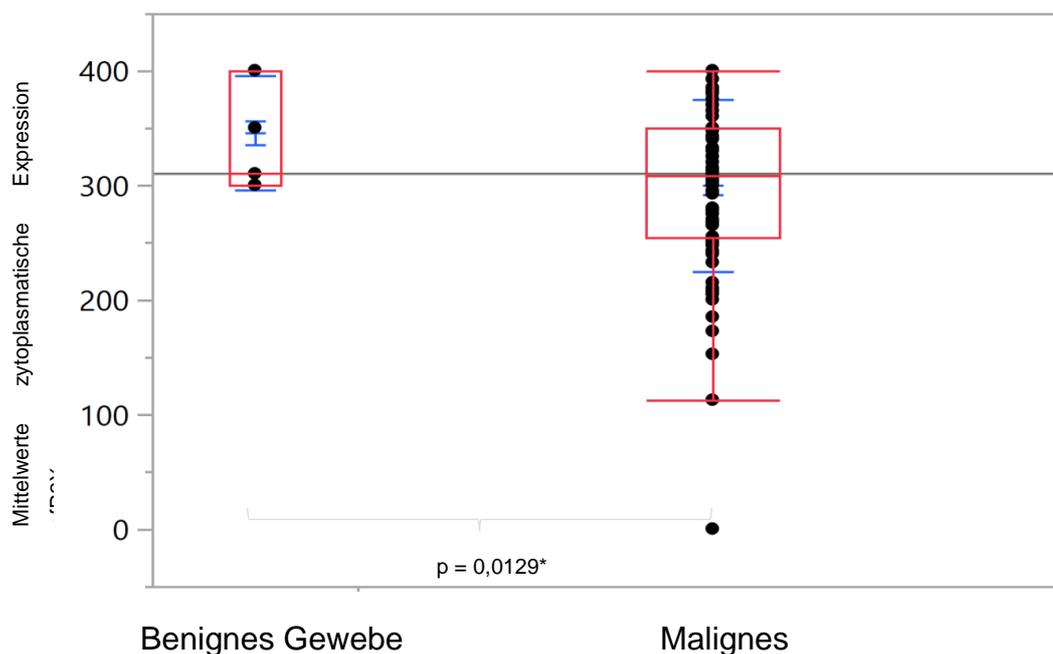


Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std-Abweichung	Std-Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Zytoplasmatische Expression im Normalgewebe (weiblich)	9	333,33 (300)	50	16,66	294,89	371,76
Zytoplasmatische Expression im Tumorgewebe (weiblich)	24	300,67 (308,75)	74,18	15,14	269,35	332,01

Abbildung 17: Vergleich der zytoplasmatische Expression des nfP2X7-Rezeptors in Tumor und Normalgewebe beim weiblichen Geschlecht. Signifikante p-Werte mit * markiert.

3.4.2.4 Zytoplasmatische Expression in der Subgruppe der männlichen Patienten

Der Vergleich zwischen den Dignitäten benigne und maligne bei der zytoplasmatischen Expression des nfP2X7-Rezeptors, zeigte einen signifikanten Unterschied beim männlichen Geschlecht (Abbildung 18; $p = 0,0129^*$). Die zugehörigen statistischen Ergebnisse befinden sich in Abbildung 18.

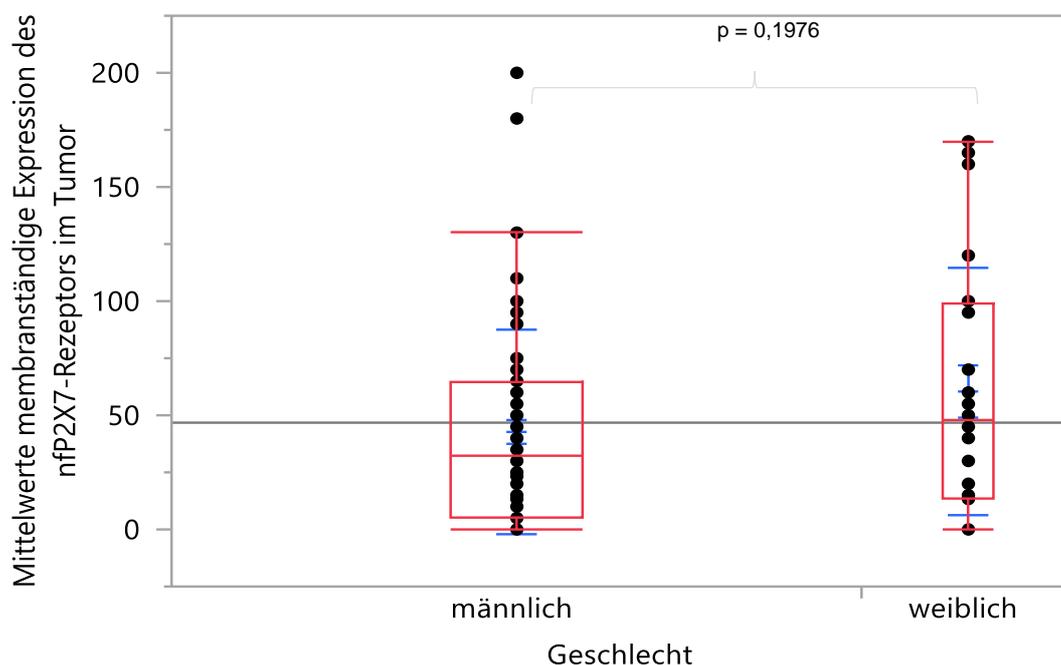


Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std-Abweichung	Std-Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Zytoplasmatische Expression im Normalgewebe (männlich)	23	346,08 (310)	49,42	10,30	324,71	367,46
Zytoplasmatische Expression im Tumorgewebe (männlich)	79	299,88 (307,5)	74,58	8,391	283,17	316,58

Abbildung 18: Vergleich der zytoplasmatische Expression des nfP2X7-Rezeptors in Tumor und Normalgewebe beim männlichen Geschlecht. Signifikante p-Werte mit * markiert

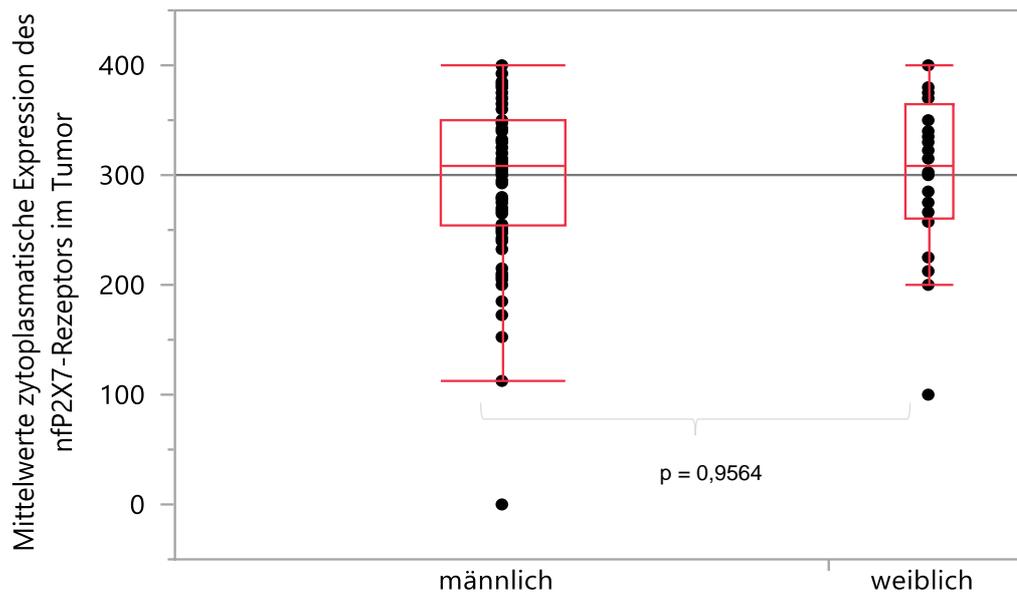
3.4.2.5 Unterschiede zwischen den Geschlechtern bei der Expression des nfP2X₇ Rezeptors

Die Auswertung zeigte sowohl bei der membranständigen Rezeptorexpression ($p = 0,1976$) als auch bei dem zytoplasmatischen Rezeptornachweis keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,9564$). Die statistischen Standardwerte der membranständigen Expression sind in Abbildung 20 und der zytoplasmatischen Expression analog in Abbildung 21 dargestellt.



Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std-Abweichung	Std-Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Männliches Geschlecht	78	42,58 (32,5)	44,76	5,06	32,49	52,67
Weibliches Geschlecht	24	60,34 (47,5)	54,43	11,11	37,36	83,33

Abbildung 19: Vergleich der membranständigen Expression des nfP2X₇-Rezeptors zwischen Männern und Frauen. Signifikante p-Werte mit * markiert.



Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std-Abweichung	Std-Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Männliches Geschlecht	78	299,88 (307,5)	74,58	8,39	283,17	316,58
Weibliches Geschlecht	24	300,67 (308,5)	74,18	15,14	269,35	332,00

Abbildung 20: Vergleich der zyttoplasmatische Expression des nfP2X7-Rezeptors zwischen Männern und Frauen. Signifikante p-Werte mit * markiert.

3.5 Korrelation der Expression des nfP2X₇ Rezeptors mit klinischen, tumorspezifischen Daten

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den klinischen, tumorspezifischen Daten erfolgte mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test und Chi-Quadrat-Test. Zu diesem Zweck wurden die tumorspezifischen Daten am Medianwert dichotomisiert ($T = 2$, $T \geq 3$; N_0 , N_1 ; M_0 , M_1 ; $G \leq 2$, $G > 2$). Im Anschluss wurden diese mittels einfaktorieller Analyse auf signifikante Unterschiede bezüglich der Färbeintensität des nfP2X₇-Rezeptors sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der membranständigen Expression untersucht.

3.5.1 T-Stadium

Bezüglich des T-Stadiums ($T = 2$, $T \geq 3$) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen hohem und niedrigem T. Dieses Ergebnis konnte sowohl für die zytoplasmatische ($p = 0,9484$) als auch für die membranständige Färbung ($p = 0,5475$) gezeigt werden. Die statistischen Standardwerte sind in Tabellen 9 und 10 dargestellt.

Tabelle 9: Statistische Werte der zytoplasmatischen Expression des nfP2X₇-Rezeptors im Vergleich $T = 2$, $T \geq 3$.

Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std-Abweichung	Std-Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Zytoplasmatische Expression $T = 2$	30	292,41 (325)	95,26	17,11	257,47	327,36
Zytoplasmatische Expression $T \geq 3$	72	303,362 (305)	63,42	7,47	288,45	318,26

Tabelle 10: Statistische Werte der membranständigen Expression des nfP2X7-Rezeptors im Vergleich T = 2, T ≥ 3.

Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std- Abweichung	Std- Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Membranständige Expression T = 2	30	55,66 (42,5)	59,11	10,79	33,59	77,7
Membranständige Expression T ≥ 3	72	43,05 (37,5)	41,71	4,91	33,25	52,85

3.5.2 N-Stadium

Es waren keine signifikanten Unterschiede bezogen auf den Lymphknotenstatus und die Expression des Rezeptors nachweisbar. Diese ließen sich weder für die zytoplasmatische ($p = 0,9887$), noch für die membranständige Färbung nachweisen ($p = 0,2027$). Die statistischen Werte der jeweiligen Auswertung sind in den Tabellen 11 und 12 dargestellt.

Tabelle 11: Statistische Werte der zytoplasmatischen Expression des nfP2X7-Rezeptors im Vergleich N0 und N > 0.

Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std- Abweichung	Std- Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Zytoplasmatische Expression N0	58	298,13 (307,5)	81,68	10,72	276,66	319,61
Zytoplasmatische Expression N > 0	41	303,96 (305)	63,89	9,97	283,79	324,13

Tabelle 12: Statistische Werte der membranständigen Expression des nfP2X7-Rezeptors im Vergleich N0 und N > 0.

Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std- Abweichung	Std- Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Membranständige Expression N0	57	46,72 (25)	54,08	7,16	32,37	61,07
Membranständige Expression N > 0	41	50,32 (45)	38,25	5,97	38,25	62,40

3.5.3 M-Stadium

Es zeigte sich mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test und Chi-Quadrat-Test kein signifikanter Unterschied zwischen fehlendem Metastasen-Nachweis und bestehenden Metastasen in der zytoplasmatischen Färbung ($p = 0,5225$) und der membranständigen Färbung ($p = 0,1318$). Die statistischen Werte sind in den Tabellen 13 und 14 dargestellt.

Tabelle 13: Statistische Werte der zytoplasmatischen Expression des nfP2X7-Rezeptors im Vergleich M0 und M1.

Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std- Abweichung	Std- Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Zytoplasmatische Expression M0	90	300,05 (308,75)	74,39	7,84	284,46	315,63
Zytoplasmatische Expression M1	9	286,38 (292,5)	85,16	28,38	220,92	351,85

Tabelle 14: Statistische Werte der membranständigen Expression des nfP2X7-Rezeptors im Vergleich M0 und M1.

Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std- Abweichung	Std- Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Zytoplasmatische Expression M0	89	50,05 (40)	48,94	5,188	39,74	60,36
Zytoplasmatische Expression M1	9	26,11 (20)	31,50	10,50	1,89	50,32

3.5.4 Grading

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen G2 und G3 bezüglich der Färbeintensität des zytoplasmatischen Rezeptors ($p = 0,8024$) und des membranständigen Rezeptors ($p = 0,4633$) nachgewiesen werden. Die statistischen Werte sind in den Tabellen 15 und 16 dargestellt.

Tabelle 15: Statistische Werte der zytoplasmatischen Expression des nfP2X7-Rezeptors im Vergleich G2 und G3.

Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std- Abweichung	Std- Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Zytoplasmatische Expression G2	25	294,83 (322,5)	97,02	19,40	254,78	334,88
Zytoplasmatische Expression G3	78	301,74 (306,25)	65,82	7,45	286,90	316,58

Tabelle 16: Statistische Werte der membranständigen Expression des nfP2X7-Rezeptors im Vergleich G2 und G3.

Gruppe	N	Mittelwert (Median)	Std- Abweichung	Std- Fehler MW	Untere 95%	Obere 95%
Membranständige Expression G2	24	58,47 (35)	62,41	12,73	32,11	84,82
Membranständige Expression G3	78	43,16 (37,5)	41,76	4,72	33,74	52,57

3.6 Korrelation mit dem Krankheitsverlauf

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse beschrieben, die eine Korrelation zwischen dem Krankheitsverlauf des Patienten und der subzellulären Färbung untersuchen. Hierzu wurden die die Verlaufsdaten des rezidivfreien Überleben, des krankheitsspezifischen Überleben und das Gesamtüberleben genutzt. Es wurde Kaplan-Meier-Kurven erstellt und univariate bzw. multivariate logistische Regressionsanalysen durchgeführt. Die multivariaten Analysen bezogen als zusätzliche Parameter den T-Wert ($T \leq 2$, $T \geq 3$), N (N0 vs. N1), M (M0 vs. M1), G, das Alter bei der Operation sowie die mittlere membranständige bzw. zytoplasmatische Färbeintensität des nfP2X₇-Rezeptors ein.

3.6.1 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit der membranständigen Expression des nfP2X₇-Rezeptors

Die Kaplan-Meier Analyse des Einflusses der membranständigen Expression des nfP2X₇-Rezeptors auf das rezidivfreie Überleben ist in Abbildung 19 dargestellt. Der Wilcoxon-Test erbrachte keinen signifikanten Unterschied bezüglich des rezidivfreien Überlebens ($p = 0,2743$).

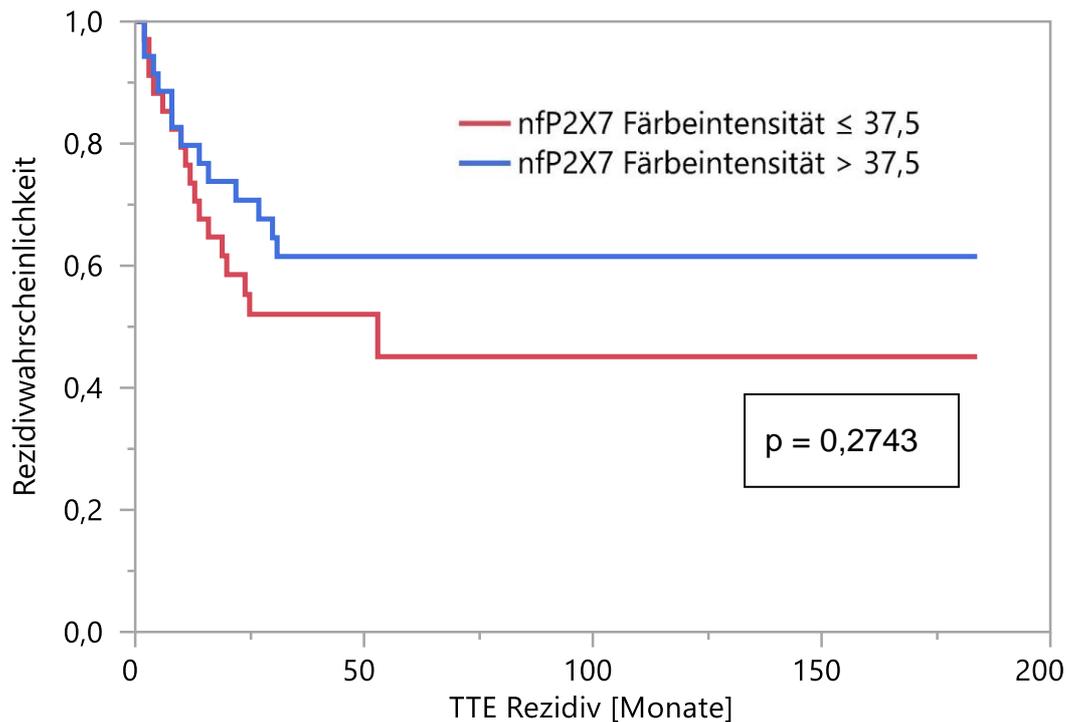


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve Rezidivwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbintensität des membranständigen nfP2X₇-Rezeptors dichotomisiert am Medianwert.

Auch die univariate logistische Regressionsanalyse mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistest zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,6446$). Die Auswertung bezog sich auf die mittleren Färbintensitäten der membranständigen nfP2X₇-Rezeptorexpression. Ausschließlich die univariate logistische Regressionsanalyse bzgl. des T-Stadiums brachte signifikante Unterschiede ($p = 0,0043^*$). Die Ergebnisse der Analyse wurden in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Univariate logistische Regressionsanalysen verschiedener Parameter bezogen auf das rezidivfreie Überleben (signifikante Werte mit * markiert).

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
Färbeintensität nfP2X7 Membranständig	1	1	0,212	0,6446
T	1	1	8,156	0,0043*
N	1	1	2,791	0,0948
M	1	1	1,156	0,2823
G	1	1	0,464	0,4957
Alter bei Operation	1	1	1,382	0,2397

Die multivariaten logistische Regressionsanalysen mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistest zeigten signifikante Unterschiede beim rezidivfreien Überleben bzgl. des T-Stadium ($p = 0,0353^*$). Die Ergebnisse des Tests sind in Tabelle 18 aufgezeigt. Die membranständige Expression des nfP2X7-Rezeptors zeigte jeweils keinen signifikanten Unterschied bzgl. des rezidivfreien Überlebens ($p = 0,8310$ und $p = 0,6884$).

Tabelle 18: Multivariate logistische Regressions-Analysen mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistests: Rezidivfreies Überleben bei membranständiger Expression des nfP2X7-Rezeptors (signifikante Werte mit * markiert).

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
Färbeintensität Membranständig (0-300)	nfP2X7 1	1	0,0455	0,8310
T	1	1	4,431	0,0353*
N	1	1	1,814	0,1780
M	1	1	0,4743	0,4910

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²	
Färbeintensität Membranständig (0-300)	nfP2X7	1	1	0,161	0,6884
Alter bei Operation		1	1	1,347	0,2457
G		1	1	0,216	0,6419

3.6.2 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit der zytoplasmatischen Expression des nfP2X7-Rezeptors

Die Kaplan-Meier Analyse des rezidivfreien Überlebens und der zytoplasmatischen Expression des Rezeptors ist in Abbildung 20 dargestellt. Der Wilcoxon-Test erbrachte keinen signifikanten Unterschied diesbezüglich ($p = 0,1914$). Sowohl die Univariate Analyse (Tabelle 19: $p = 0,5507$) als auch die multivariaten Analysen ($p = 0,2502$ und $p = 0,4888$) zeigten keinen signifikanten Unterschied bzgl. der Expression des zytoplasmatischen nfP2X7-Rezeptors. Signifikante Unterschiede zeigten sich in der multivariaten Untersuchung bei des T-Stadiums ($p = 0,0158^*$) (Tabelle 20).

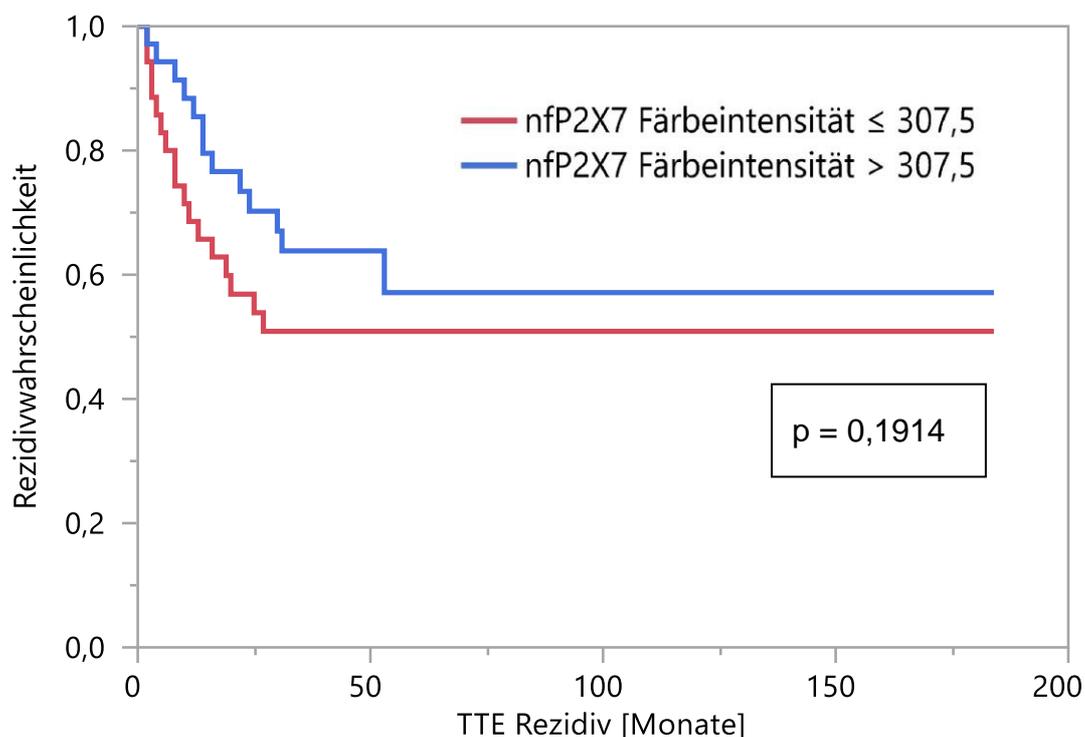


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve Rezidivwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbeintensität des zytoplasmatischen nfP2X7-Rezeptors dichotomisiert am Medianwert.

Tabelle 19: Univariate logistische Regressionsanalyse der mittleren zytoplasmatischen Färbeintensität des nfP2X7-Rezeptors bezogen auf das rezidivfreie Überleben.

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
Färbeintensität nfP2X7 Zytoplasmatisch	1	1	0,3559	0,5507

Tabelle 20: Multivariate logistische Regressions-Analysen mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistests: Rezidivfreies Überleben nach zytoplasmatischer Expression des nfP2X7-Rezeptors (signifikante Werte mit * markiert).

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²	
Färbeintensität Zytoplasmatisch (0-400)	nfP2X7	1	1	1,322	0,2502
T		1	1	5,821	0,0158*
N		1	1	2,061	0,1511
M		1	1	0,336	0,5619

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²	
Alter bei Operation		1	1	1,281	0,2578
G		1	1	0,537	0,4634
Färbeintensität Zytoplasmatisch (0-400)	nfP2X7	1	1	0,479	0,4888

3.6.3 Krankheitsspezifisches Überleben in Abhängigkeit der Expression des membranständigen nfP2X₇-Rezeptors

Das krankheitsspezifische Überleben zeigte in der Kaplan-Meier-Untersuchung einen signifikanten Unterschied im Wilcoxon-Test ($p = 0,0431^*$). Bei Patienten, die eine überdurchschnittliche Expression des nfP2X₇-Rezeptors aufweisen, ließ sich ein längeres krankheitsspezifisches Überleben nachweisen. Die univariate Regressionsanalyse zeigte keinen signifikanten Unterschied im krankheitsspezifischen Überleben bezogen auf die Expression des Rezeptors (Tabelle 21: $p = 0,3157$). Dem gegenüber waren die univariaten Analysen bezogen auf das T-Stadium ($p = 0,0062^*$), den Lymphknotenstatus ($p = 0,0324^*$), den Metastasierungsgrad ($p = 0,0052^*$), das Grading ($P = 0,0016^*$) als auch auf das Alter bei der Operation ($p = 0,0047^*$) signifikant. Die multivariate Regressionsanalyse zeigten signifikanten Zusammenhänge bzgl. der M-Stadium ($p = 0,0159^*$), des Grading ($p = 0,0114^*$) und des Alters bei der Operation ($p = 0,021^*$), jedoch nicht bzgl. der Expression des nfP2X₇-Rezeptors ($p = 0,6609$ und $p = 0,3891$) (Tabelle 22).

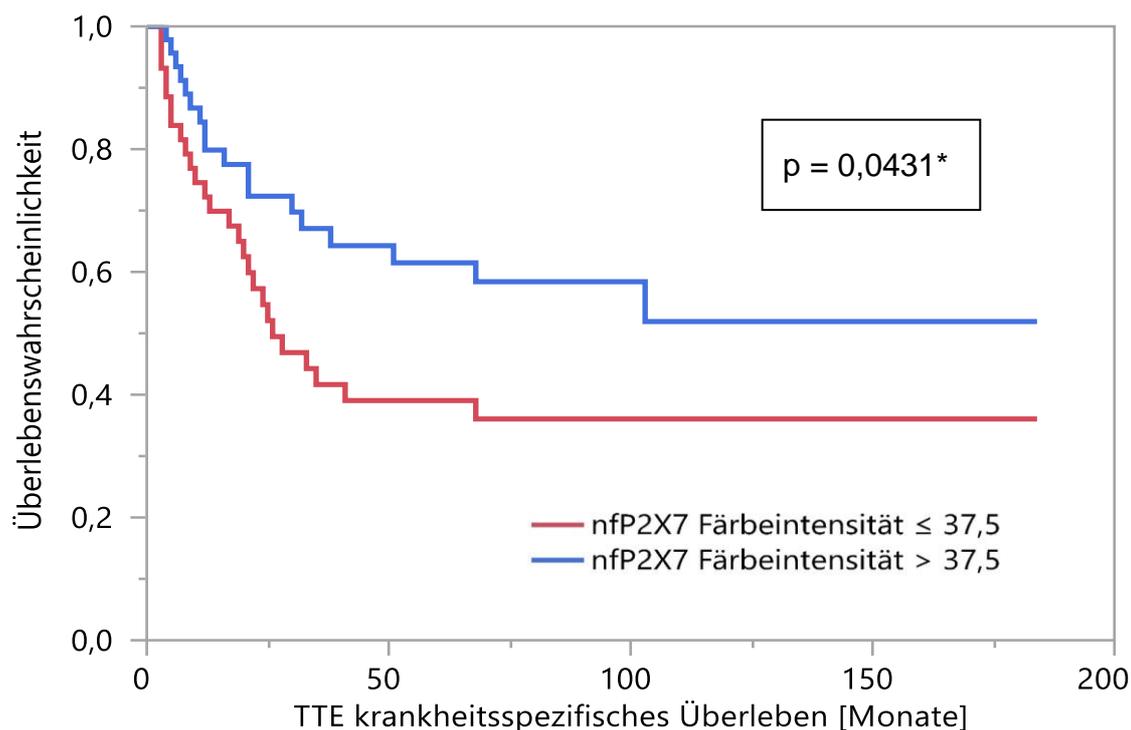


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve der krankheitsabhängigen Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbeintensität des membranständigen nfP2X7-Rezeptors dichotomisiert am Medianwert.

Tabelle 21: Univariate logistische Regressionsanalysen verschiedener Parameter bezogen auf das krankheitsspezifische Überleben (signifikante Werte mit * markiert).

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
Färbeintensität nfP2X7 Membranständig	1	1	1,0066	0,3157
T	1	1	7,5034	0,0062*
N	1	1	4,5897	0,0324*
M	1	1	7,7932	0,0052*
G	1	1	9,9723	0,0016*
Alter bei der Operation	1	1	7,9975	0,0047*

Tabelle 22: Multivariate logistische Regressions-Analysen mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistests: krankheitsspezifisches Überleben bei membranständiger Expression des nfP2X7-Rezeptors (signifikante Werte mit * markiert).

Quelle	Parameter	Anzahl Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²	
Färbeintensität Membranständig (0-300)	nfP2X7	1	1	0,192	0,6609
T		1	1	3,631	0,0567
N		1	1	1,245	0,2643
M		1	1	5,810	0,0159*

Quelle	Parameter	Anzahl Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²	
Alter bei Operation		1	1	5,3296	0,0210*
G		1	1	6,402	0,0114*
Färbeintensität Membranständig (0-300)	nfP2X7	1	1	0,742	0,3891

3.6.4 Krankheitsspezifisches Überleben in Abhängigkeit der zytoplasmatischen Expression des nfP2X₇-Rezeptors

In der Auswertung bzgl. des krankheitsspezifischen Überlebens in Korrelation mit der cytoplasmatischen Expression des nfP2X₇-Rezeptors konnte bei der nur bei den multivariaten Analysen signifikante Korrelationen nachgewiesen werden. Diese Bezogen sich auf das T-Stadium ($p = 0,0306^*$), das M-Stadium ($p = 0,0224^*$), das Grading ($p = 0,0032^*$) und das Alter bei der Operation ($p = 0,0225^*$). Die genauen Ergebnisse sind in den Tabellen 23 und 24 aufgeführt (Wilcoxon $p = 0,0876$; Univariate Regressionsanalyse $p = 0,2478$; multivariate logistische Regressionsanalyse bzgl. der Rezeptorexpression $p = 0,2450$ und $p = 0,0948$).

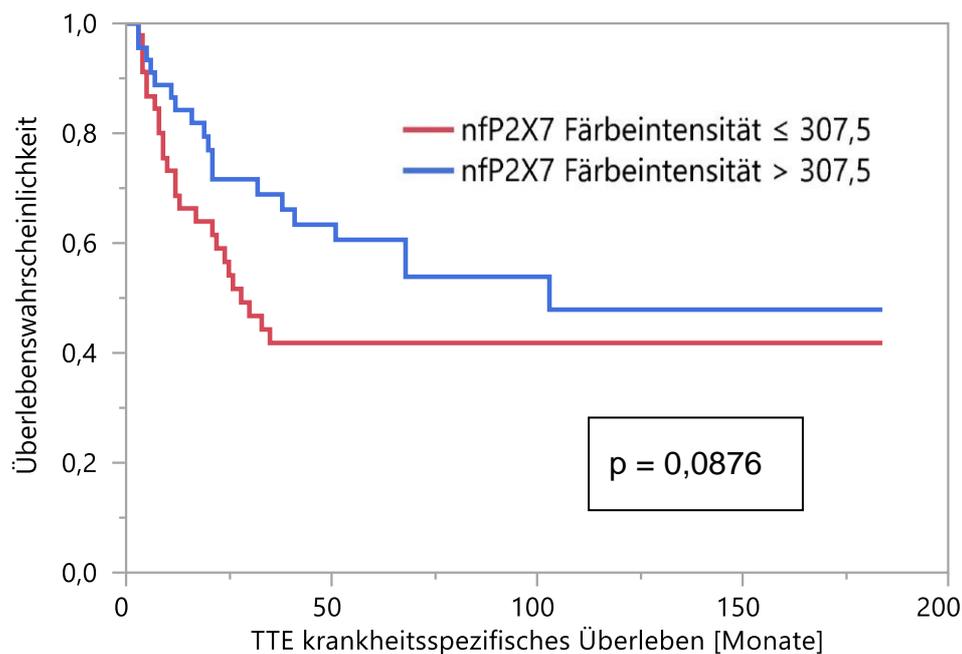


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve der krankheitsabhängigen Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbeintensität des zytoplasmatischen nfP2X7-Rezeptors dichotomisiert am Medianwert.

Tabelle 23: Univariate logistische Regressionsanalyse der mittleren zytoplasmatischen Färbeintensität des nfP2X7-Rezeptors bezogen auf das krankheitsspezifische Überleben.

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
Färbeintensität nfP2X7 Zytoplasmatisch	1	1	1,3354	0,2478

Tabelle 24: Multivariate logistische Regressions-Analysen mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistests: krankheitsspezifisches Überleben bei zytoplasmatischer Expression des nfP2X7-Rezeptors (signifikante Werte mit * markiert).

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
Färbeintensität nfP2X7 Zytoplasmatisch (0-400)	1	1	1,351	0,2450

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
T	1	1	4,676	0,0306*
N	1	1	1,314	0,2516
M	1	1	5,213	0,0224*

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
Färbeintensität Zytoplasmatisch (0-400)	1	1	2,791	0,0948
Alter bei Operation	1	1	5,207	0,0225*
G	1	1	8,699	0,0032*

3.6.5 Gesamtüberleben in Abhängigkeit der membranständigen Expression des nfP2X₇-Rezeptors

Die Kaplan-Meier-Analyse zeigte für die allgemeine Überlebenswahrscheinlichkeit in Korrelation membranständigen Rezeptorexpression einen signifikanten Zusammenhang ($p = 0,0434^*$). Eine vermehrte Rezeptorexpression ging mit einem verlängerten allgemeinen Gesamtüberleben einher. Die univariate Regressionsanalyse zeigte keinen statistischen Zusammenhang zwischen der Färbeintensität und dem Gesamtüberleben (Tabelle 25: $p = 0,2562$). Wie schon beim krankheitsspezifischen Überleben waren die anderen Parameter wiederum signifikant bezüglich des Gesamtüberlebens (T-Stadium: $p = 0,0009^*$; Lymphknotenstatus: $p = 0,0274^*$; Metastasierungsgrad: $p = 0,0102^*$; Grading: $p = 0,0099^*$; Alter bei der Operation: $p = 0,0012^*$)

Die multivariaten logistischen Regressionsanalyse konnte einen Zusammenhang zwischen Gesamtüberleben und T-Stadium ($p = 0,0116^*$), dem M-Stadium ($p = 0,0157^*$) sowie dem Alter bei der Operation ($p = 0,0064^*$) nachweisen. Die Ergebnisse der multivariaten Analyse sind in Tabelle 26 dargestellt.

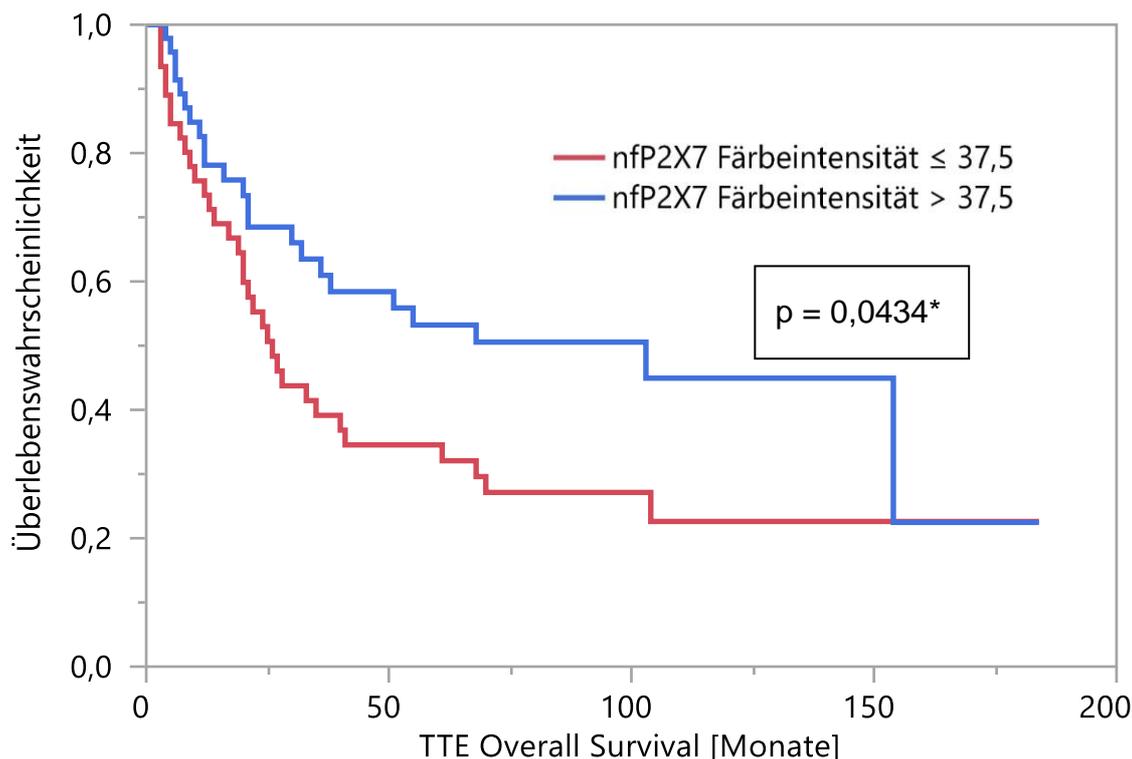


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve der allgemeinen Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbeintensität des membranständigen nfP2X7-Rezeptors. Signifikanter Wert mit * gekennzeichnet dichotomisiert am Medianwert.

Tabelle 25: Univariate logistische Regressionsanalysen verschiedener Parameter bezogen auf das Gesamtüberleben (signifikante Werte mit * markiert).

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
Färbeintensität nfP2X7 Membranständig	1	1	1,3632	0,2562
T	1	1	24,5287	0,0009*
N	1	1	4,8654	0,0274*
M	1	1	6,6052	0,0102*
G	1	1	6,6574	0,0099*

Ergebnisse

Alter bei der Operation	1	1	10,4497	0,0012*
-------------------------	---	---	---------	---------

Tabelle 26: Multivariate logistische Regressions-Analysen mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistests: Gesamtüberleben bei membranständiger Expression des nfP2X7-Rezeptors (signifikante Werte mit * markiert).

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
Färbeintensität nfP2X7 Membranständig (0-300)	1	1	0,622	0,4301
T	1	1	6,372	0,0116*
N	1	1	1,518	0,2178
M	1	1	4,860	0,0275*

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
Färbeintensität nfP2X7 Membranständig (0-300)	1	1	0,976	0,3230
Alter bei Operation	1	1	8,855	0,0029*
G	1	1	3,603	0,0577

3.6.6 Gesamtüberleben in Abhängigkeit der zytoplasmatischen Expression des nfP2X7-Rezeptors

Das Ergebnis der Analyse der Kaplan-Meier-Kurve zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Ausprägung der zytoplasmatischen Rezeptorexpression und dem Gesamtüberleben ($p = 0,0703$). Auch die Univariate logistische Regressionsanalyse zeigte keinen signifikanten Unterschied (Tabelle 27: $p = 0,2823$). In den multivariaten logistischen Regressionsanalysen konnte kein signifikanter Zusammenhang bezüglich der zytoplasmatischen Färbeintensität und dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden ($p = 0,1993$ und $p = 0,1506$). Eine Signifikanz ließ sich bezogen auf die Tumorausdehnung ($p = 0,0049^*$), das M-Stadium ($p = 0,0362^*$), das Grading ($p = 0,0159^*$) und das Alter bei der Operation ($p = 0,0045^*$) nachweisen (Tabelle 28).

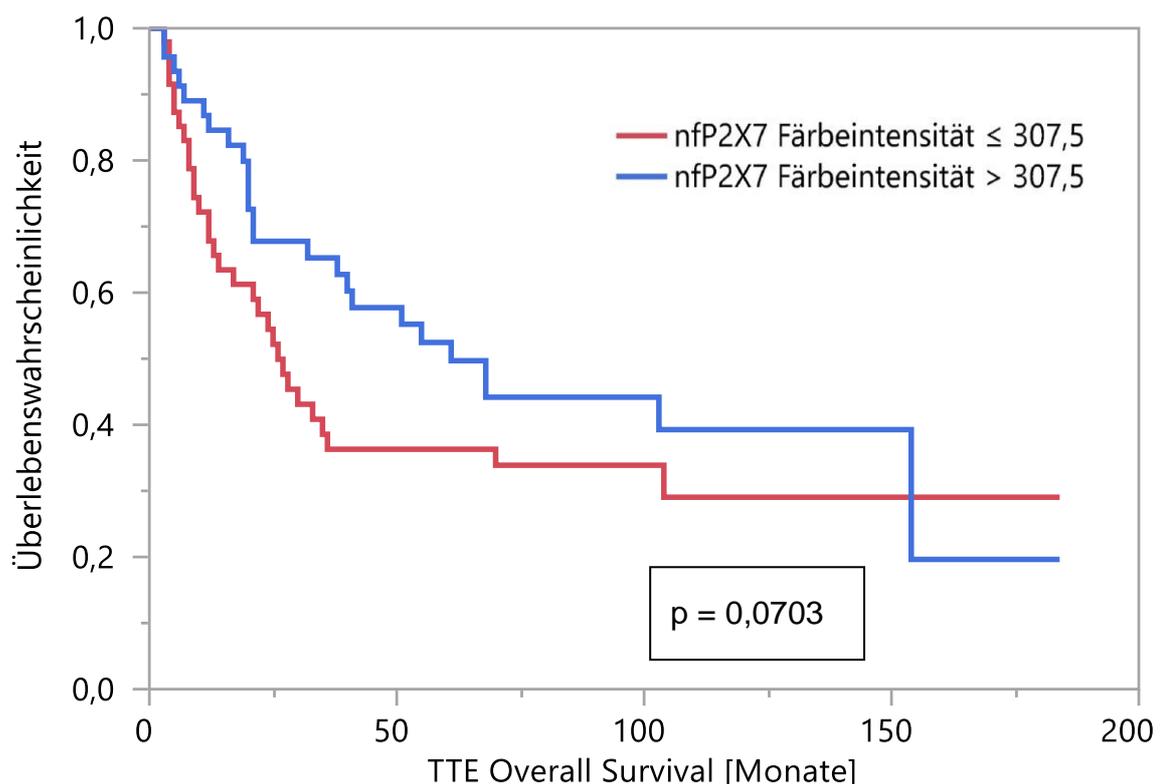


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve der allgemeinen Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbeintensität des zytoplasmatischen nfP2X7-Rezeptors dichotomisiert am Medianwert.

Tabelle 27: Univariate logistische Regressionsanalyse der mittleren zytoplasmatischen Färbeintensität des nfP2X7-Rezeptors bezogen auf das Gesamtüberleben.

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
H-Score Mittelwert (0 - 400) TU nfP2X7	1	1	1,1558	0,2823

Tabelle 28: Multivariate logistische Regressions-Analyse mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistests: Gesamtüberleben bei zytoplasmatischen Expression des nfP2X7-Rezeptors (signifikante Werte mit * markiert).

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
Färbeintensität zytoplasmatisch (0-400) nfP2X7	1	1	1,692	0,1933
T	1	1	7,933	0,0049*
N	1	1	1,778	0,1824
M	1	1	4,389	0,0362*
Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi ²
Alter bei Operation	1	1	8,081	0,0045*
G	1	1	5,816	0,0159*
Färbeintensität zytoplasmatisch (0-400) nfP2X7	1	1	2,066	0,1506

4 Diskussion

4.1 Wesen und Intention der Arbeit

Die initiale Analyse der erhobenen Daten dieser Arbeit zeigt, dass der membranständige non-functionale ATP-Rezeptor auf den meisten untersuchten Tumorgeweben nachweisbar war. Dem gegenüber war der Rezeptor nur in einem sehr geringen Ausmaß auf der Membran von benignem Gewebe exprimiert. Diese Ergebnisse weisen, wie bereits in anderen Studien dargelegt auf eine hohe Tumorspezifität der membranständigen Rezeptorexpression hin (Gilbert *et al.*, 2019).

Der non-functional P2X₇-Rezeptor ist im Vergleich zu seiner Rezeptorfamilie ein relativ unsensibler Rezeptor für ATP. Durch den hohen Zellumsatz und nekrotisches Gewebe im Tumor Microenvironment entstehen jedoch sehr gute Bedingungen, um den Rezeptor zu aktivieren (Gilbert *et al.*, 2017, Gilbert *et al.*, 2019). Durch diesen Einfluss erhalten die Zellen, die den Rezeptor exprimieren einen Proliferationsreiz, der im Gegensatz zum regulären P2X₇-Rezeptor nicht über die Caspase-Signalwege in der Apoptose mündet (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005, Adinolfi *et al.*, 2009, Barden *et al.*, 2003). Die membranständige Expression dieses veränderten Rezeptors konnte zuvor bereits in unterschiedlichsten Geweben nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine sehr hohe Spezifität für maligne verändertes Gewebe (Slater *et al.*, 2004, Gilbert *et al.*, 2017).

Es war daher ein Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob sich der nfP2X₇-Rezeptor in Gewebe von High-Grade Urothelkarzinom nachweisen lässt und wie sich das Expressionsverhalten im Vergleich zu benignem Gewebe verhält. Dies geschah vor dem Hintergrund, ob sich der Rezeptor im Verlauf weiterer klinischer Forschung als diagnostischer bzw. prognostischer Marker, oder sogar als Target für eine zielgerichtete Therapie eignet.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob unterschiedliche Einflussfaktoren wie das T-Stadium, der Lymphknotenstatus, der Metastasierungsstatus, das Alter und Geschlecht die Expression des nfP2X₇-Rezeptors begünstigen oder hiermit korrelieren. Abschließend wurde der Einfluss

der Expression auf den klinischen Krankheitsverlauf analysiert. Dies geschah mit dem Ziel zu untersuchen, ob der Rezeptor in Zukunft als prognostischer Marker für das High-Grade Urothelkarzinom im klinischen Alltag Einzug finden könnte.

4.2 Expressionsverhalten vor dem Hintergrund der Gewebearten: benignes Urothel versus Urothelkarzinom

Vor dem Hintergrund der onkologischen Relevanz der Expression des nP2X₇-Rezeptors für das Urothelkarzinom konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der membranständigen Rezeptor-Expression auf Tumorzellen und auf benignen Zellen nachgewiesen werden ($p < 0,001$).

Die membranständige Expression war fast ausschließlich auf Tumorzellen nachweisbar. Auch Gilbert *et al.* beschrieben dies 2019 u.a. für das Urothelkarzinom (Gilbert *et al.*, 2019). Durch die Expression auf der Zellmembran scheint der Tumor dem ATP-Konzentration bedingten Apoptosesignal entgegen zu wirken.

Anders verhielt es sich mit dem zytoplasmatischen Rezeptornachweis. Eine Expression konnte in beiden Dignitäten nachgewiesen werden. Diese war sogar im benignen Gewebe signifikant höher als im Tumor ($p = 0,0104$). Die zytoplasmatische Expression in benignem Urothel wurde bislang in der Literatur nicht untersucht bzw. beschrieben.

In Tumorzellen hingegen beschrieben Barden *et al.* 2014 einen Zusammenhang zwischen Grading und Expression. In Low-Grade Tumoren würde mehr nP2X₇-Rezeptoren intrazellulär verweilen, während in high-Grade Tumoren diese nahezu komplett auf die Membran verlagert zu sein scheinen. Die Untersuchungen wurden an verschiedenen Tumoren, u.a. Prostatakarzinom, Mammakarzinom, kleinzelligem Lungenkarzinom und Melanom durchgeführt. (Barden *et al.*, 2014). Auch Slater *et al.* beschrieben 2004 einen signifikanten Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen Expression des non-functional ATP-Rezeptors und der Wahrscheinlichkeit ein Prostatakarzinom zu entwickeln,

beziehungsweise dem Nachweis membranständigen Nachweis des Rezeptors und dem Vorhandensein eines Prostatakarzinoms (Slater *et al.*, 2004).

Dieser Zusammenhang könnte hinweisgebend auf die benigne Dignität der Zelle sein. Einerseits findet eine Synthese dieser Rezeptoren statt, jedoch werden sie nicht auf der Oberfläche exprimiert und sind somit nach heutigem Kenntnisstand funktionslos. Dies würde den benignen Charakter dieser Zellen unterstreichen. Diesbezüglich konnte im Rahmen dieser Arbeit ein signifikanter linearer Zusammenhang (Tabelle 7) zwischen zytoplasmatischen Rezeptorexpression in benignen und malignen Zellen desselben Patienten gezeigt werden ($p = 0,0488$). In den benignen Zellen ließen sich intrazellulär mehr nfP2X₇-Rezeptoren nachweisen als in den malignen Zellen. Gilbert *et al.* zeigten 2019, dass Zellen des Plasmozytom und Zellen des malignen Melanom den nfP2X₇ Rezeptor intrazellulär speichern. Sie zogen die Schlussfolgerung, dass die ATP getriggerte Stimulation des normalen P2X₇ Rezeptors die Expression der non-functional Variante auf die Zellmembran initiiert (Gilbert *et al.*, 2019).

4.3 Expressionsverhalten vor dem Hintergrund der individuellen Patienteneigenschaften

Da bei der allgemeinen Datenauswertung ein signifikanter Unterschied zwischen der zytoplasmatischen und membranständigen Expression des Rezeptors gezeigt werden konnte, wurde im Verlauf untersucht, ob sich dieser Unterschied auf Subgruppen des Kollektivs übertragen ließ.

Sowohl in der weiblichen ($p = 0,0007$) als auch in der männlichen Kohorte ($p < 0,0001$) des Kollektivs ließen sich bezüglich der membranständigen nfP2X₇-Rezeptorexpression ein signifikanter Unterschied zwischen Tumor und Normalgewebe belegen. Es wurde jeweils das allgemeine Ergebnis bestätigt, dass die membranständige Rezeptorexpression im Tumorgewebe höher ist als im Normalgewebe.

Einen Unterschied gab es aber bei dem zytoplasmatischen Rezeptornachweis. In der Subkohorte des weiblichen Geschlechtes bestand hier kein Unterschied

zwischen Tumor und Normalgewebe ($p = 0,3917$). Dem gegenüber wurde beim männlichen Geschlecht die zytoplasmatische Rezeptorexpression im Normalgewebe wiederum signifikant höher nachgewiesen als im Tumorgewebe ($p = 0,0129$). Ob dieser Unterschied geschlechtsspezifisch ist oder auf die kleine Kohorte der Proben von weiblichen Patienten zurückzuführen ist, müsste in einer Folgestudie mit einer größeren Fallzahl, sowie ausgeglichenem Geschlechterverhältnis überprüft werden. Möglicherweise könnten Aspekte des verschiedenen Metabolismus und der ATP-Bereitstellung beim männlichen Geschlecht im Vergleich zum weiblichen Geschlecht eine Rolle spielen.

Bei dem direkten Vergleich zwischen den Geschlechtern bezüglich des zytoplasmatischen Rezeptornachweis im Tumorgewebe, konnte kein Unterschied bei der Expression gezeigt werden ($p = 0,9564$). Auch die Auswertung zu einem direkten Geschlechterunterschied bei der membranständigen Färbung brachte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,1976$). Dies legt nahe, dass die Expression des nfP2X₇ Rezeptors keinen signifikanten Geschlechtsunterschied zulässt. Es wurde bislang auch in der Literatur kein Unterschied der Expression des nfP2X₇-Rezeptors zwischen den Geschlechtern untersucht beziehungsweise beschrieben.

Die Untersuchung der Rezeptorexpression bezogen auf das Alter zeigte im Rahmen dieser Arbeit keine linearen Zusammenhänge.

Aus diesen Ergebnissen ließe sich schlussfolgern, dass die membranständige Rezeptorexpression geschlechts- und altersunabhängig als diagnostischer Marker dienen könnte. Im Rahmen weiterer Studien könnte ebenfalls untersucht werden, ob der nfP2X₇-Rezeptors als therapeutisches Target einer zielgerichteten Therapie geeignet sein könnte, wie es beim Basalzellkarzinom aktuell gezeigt werden konnte (Gilbert *et al.*, 2017). Darüber hinaus wäre es interessant zu untersuchen, ob die Expression des nfP2X₇-Rezeptors ebenfalls auf der Membran des nicht muskelinvasiven Urothelkarzinom exprimiert ist. Dann könnte der Rezeptor auch als Target einer lokalen *intravesikalen* Therapie dienen.

4.4 Expressionsverhalten vor dem Hintergrund der klinisch pathologischen Tumordaten

Im Rahmen der Auswertung konnte kein Zusammenhang zwischen dem T-Stadium oder dem Grading und der Expression des nfP2X_7 Kanals nachgewiesen werden.

Dieser Sachverhalt wurde auch bislang in der Literatur nicht beschrieben. Dies scheint sich jedoch nicht mit der von Adinolfi *et al.* beschriebenen Funktion des Rezeptors zu decken. Sie berichteten 2009 von einer Aktivierung des NFATc1 Wachstumsregulators durch den nfP2X_7 -Rezeptor, welcher einen antiapoptotischen Effekt habe und zusätzlich wachstumsfördernd wirkt (Adinolfi *et al.*, 2009).

Kawahara *et al.* beschrieben 2015 erstmals die Expression des NFATc1 im Urothelkarzinom. Sie konnten jedoch hier kein Zusammenhang zwischen T-Stadium und der Expression des Wachstumsregulators nachweisen. Andererseits konnten sie zeigen, dass NFATc1 in signifikantem Zusammenhang zum Grading des Tumors ist. (Kawahara *et al.*, 2015).

Dies lässt den Schluss zu, dass auch wenn der nfP2X_7 -Rezeptor den NFATc1-Wachstumsregulator stimuliert, dieser anscheinend keine Auswirkung auf das T-Stadium im Urothelkarzinom hat, jedoch mit einem höherem Grading assoziiert ist, was einen negativen prognostischen Effekt auf die Prognose haben sollte. Dies wurden in dieser Arbeit jedoch widerlegt.

Bezüglich der Lymphknotenstatus konnte ebenfalls kein Zusammenhang nachgewiesen werden. Die Fernmetastasierung zeigte jedoch eine nicht signifikante Tendenz ($p = 0,1318$) in Zusammenhang mit der membranständigen Expression des nfP2X_7 -Rezeptors.

Jelassi *et al.* untersuchten den Zusammenhang zwischen Fernmetastasierung und dem nfP2X_7 -Rezeptor im Jahr 2011. Sie beschrieben einen signifikanten Zusammenhang zwischen der P2X_7 vermittelten Cystein Cathepsin-abhängigen Zellinvasion, durch Spaltung von Proteinen der extrazellulären Matrix (Jelassi *et al.*, 2011).

Auch Barden *et al.* beschrieben 2014 den prometastatischen Effekt, welcher in Korrelation zur Ausprägung der nfP2X₇ Expression steht. Er begründete dies mit der ATP-vermittelten Kanalöffnung, welche den unkontrollierten Calcium- und Ioneneinstrom in die Zelle auslöst. Dies führt durch Membranblebbing und Zellabrundung zu einem Ablösen von beispielsweise Cathepsinen und Metalloproteasen, welche die Zelle im Ursprungsgewebe halten (Barden *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit konnte dies nicht signifikant bestätigt werden, jedoch war die Fallzahl von 9 Patienten im metastasierten Stadium auch sehr gering.

4.5 Expressionsverhalten vor dem Hintergrund der prognostischen Wertigkeit

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Werte bezüglich der prognostischen Wertigkeit des Rezeptors ermittelt. Bezüglich des rezidivfreien Überlebens konnte sowohl bei der membranständigen als auch bei der zytoplasmatischen Expression kein statistischer Zusammenhang gezeigt werden. Bei der Betrachtung der Kaplan-Meier-Kurven zeigte sich aber eine Tendenz, dass bei einer überdurchschnittlich erhöhten Expression des non-functional ATP-Rezeptors das rezidivfreie Überleben erhöht zu sein scheint (Abbildung 19 und 20).

Im Fall des krankheitsspezifischen Überlebens zeigte sich dann ein signifikanter Zusammenhang mit der erhöhten membranständigen Rezeptorexpression ($p = 0,0431$). Es konnte also entgegen der Erwartung gezeigt werden, dass der auf der Membran exprimierte nfP2X₇-Rezeptor einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf hat. Dieser Zusammenhang war bei der zytoplasmatischen Expression nicht gegeben.

Weiterhin war auch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben und der membranständigen Expression des nfP2X₇ Rezeptors gegeben ($p = 0,0434$). Erstaunlich war auch hier wiederum, dass bei einer überdurchschnittlich hohen Expression das Gesamtüberleben länger war als mit geringerer Expression.

Die Ergebnisse in der Literatur hierzu sind teils widersprüchlich. Gómez-Villafuertes *et al.* wiesen einen Zusammenhang zwischen schlechteren Überlebenschancen und einer Expression des P2X₇-Rezeptors beim Neuroblastom nach (Gómez-Villafuertes *et al.*, 2015). Bezüglich der lymphatischen Leukämie fanden Zhang *et al.* keinen Einfluss des veränderten P2X₇ Rezeptors auf das Überleben der betroffenen Patienten (Zhang *et al.*, 2003). Thunberg *et al.* fanden hingegen ein erhöhtes allgemeines Gesamtüberleben bei Patienten mit lymphatischer Leukämie (Thunberg *et al.*, 2002). Daraus lässt sich schließen, dass keine allgemeingültige Aussage getroffen werden kann, ob das Expressionsverhalten des nfP2X₇-Rezeptors und die prognostische Vorhersagekraft tumorübergreifend einheitlich ist.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich aber ableiten, dass die Expression beim Urothelkarzinom mit einem verlängerten krankheitsspezifischen und sogar Gesamtüberleben einherzugehen scheint. Auf welchen Signalwegen dies beruht lässt sich aktuell nicht abschließen klären, da diese beim P2X₇-Rezeptor nicht zu genüge verstanden sind. Hier ist im Verlauf noch weitere Forschung nötig.

4.6 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Da es sich bei dieser Studie um einen retrospektiven Forschungsansatz handelt, konnte dies zu unterschiedlichen Fehlerquellen führen.

4.6.1 Patientenkollektiv

Um eine allgemein gültige Aussage zum prognostischen Verlauf des Urothelkarzinoms bezüglich des nP2X₇ Rezeptors zu machen, ist der gegebene Datenumfang zu gering. Hierbei handelt es sich um einen systematischen Fehler, der zu einer Stichprobenverzerrung führt. Gerade in Bezug auf den Geschlechtsunterschied ist der Anteil der weiblichen Probanden zu gering. Darüber hinaus enthielt die Studie nur muskelinvasive high grade Tumore, sodass keine Aussage zu Karzinomen mit niedrigerem Grading getroffen werden konnte. Auch um eine allgemeine Aussage bezüglich des prometastatischen Effekts des Rezeptors geben zu können war die Subgruppe an Patienten im metastasierten Stadium zum Operationszeitpunkt zu gering.

4.6.2 TMA-Technik und Proben

Durch den Gebrauch der TMA-Technik ist eine schnelle und effiziente Möglichkeit der immunhistochemischen Analyse von Geweben gegeben. Durch den Gebrauch dieser sehr kleinen Gewebeproben kann es jedoch im Verlauf des Verarbeitungsprozesses zum Datenverlust kommen. Dieser ist z.B. dadurch gegeben, dass einzelne Dots beim Schneiden mit dem Mikrotom verloren gehen können, oder auch durch zahlreiche zuvor angefertigte Schnitte bereits aufgebraucht sind. So war es im Rahmen dieser Arbeit auch der Fall, dass einige Dots nicht mehr zu Auswertung zur Verfügung gestanden haben, und somit die Möglichkeit der Datenverzerrung besteht.

Darüber hinaus ist im Rahmen der Auswertung ein methodischer Fehler aufgefallen. Es ist keine Negativkontrolle von Gewebe aus einer eindeutig gesunden Blase ohne Karzinomnachweis gegengefärbt worden. Die benignen Gewebeproben stammten jeweils aus der zystektomierten Blase mit vorliegendem Urothelkarzinom. Das Gewebe wurde allerdings in der

Begutachtung der Pathologen, als benigne beschrieben, sodass davon auszugehen ist, dass dies nicht zu einer Verzerrung der Daten geführt hat.

4.6.3 Inter- und Intraobservervariabilität

Da im Rahmen dieser Arbeit die immunhistochemischen Färbungen von Hand ausgewertet wurden, und keine technischen Hilfsmittel zur Analyse der Färbeintensität genutzt wurde, besteht die Möglichkeit der Verzerrung der Analyseergebnisse. Dem wurde durch folgende Kontrollmechanismen versucht entgegen zu wirken, um ein reproduzierbares Ergebnis zu erzeugen:

1. Die Auswertung wurde mehrfach durchgeführt
2. Die Auswertung wurde an verschiedenen Tagen durchgeführt
3. Die Auswertung wurde stets unter denselben Bedingungen durchgeführt
4. Im Fall von zu starken Abweichungen wurde eine Reevaluation der entsprechenden Probe durchgeführt.

4.7 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der non-functional nfP2X₇-Rezeptor sowohl im benignen Urothel als auch im Urothelkarzinom exprimiert wird. Die Tatsache, dass der Rezeptor aber fast ausschließlich auf der Zellmembran von Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte, bestätigt die in vorherigen Studien bei anderen Tumoren nachgewiesene hohe Tumorspezifität nun auch für das Urothelkarzinom.

Die Analyse der Daten zeigt, dass im Gegensatz zu den erwarteten Eigenschaften des Rezeptors, kein Zusammenhang zwischen dem T-Stadium und der membranständigen Expression nachgewiesen werden konnte. Dies lässt vermuten, dass die Rezeptorexpression im Urothel keine wachstumsstimulierende Wirkung bzgl. der Invasivität hat. Es konnte auch kein Zusammenhang zur Metastasierungswahrscheinlichkeit dargelegt werden. Von den bislang bekannten Eigenschaften des Rezeptors bleibt für das high grade Urothelkarzinom zu schlussfolgern, dass dieser nur einen antiapoptotischen Effekt hat und die Zellen im Tumor Microenvironment vor dem absterben schützt.

Die gezeigte Tatsache, dass sich im Zytoplasma der benignen Zellen mehr Rezeptoren nachweisen lassen als in malignen, lässt den Schluss zu, dass die malignen Zellen eine Verlagerung der zytoplasmatischen Rezeptoren auf die Zellmembran initiieren. Wieso der Rezeptor in benignen Zellen überhaupt gebildet wird, muss noch untersucht werden.

Dadurch, dass gezeigt werden konnte, dass der Rezeptor fast ausschließlich auf der Zellmembran maligner Urothelzellen sowohl alters- als auch geschlechtsunabhängig vorkommt, könnte er zukünftig als diagnostischer Marker für das Urothelkarzinom herangezogen werden. Hierbei wäre er auch als diagnostischer Urinmarker in Betracht zu ziehen.

Auf Grund der Tumorspezifität besteht wie beispielsweise beim Basalzellkarzinom auch beim Urothelkarzinom die Möglichkeit der zielgerichteten Antikörpertherapie. Hierzu müssten jedoch noch weitere Studien folgen, welche

unter anderem low grade Tumore mit einschließen, um beispielsweise die Möglichkeit einer *intravesikalen* Lokaltherapie zu prüfen.

Der Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression des Rezeptors und dem verbesserten krankheitsspezifischen Überleben, sowie dem Gesamtüberleben zeigt, dass der Nachweis des Rezeptors auch von prognostischer Relevanz sein kann.

5 Zusammenfassung

Der non-functional ATP Rezeptor nfP2X₇ ist ein spezifisch auf der Zellmembran von Tumorzellen exprimierter Ionenkanal. Er sichert das Überleben der maligne entarteten Zellen im ATP-reichen Milieu des Tumor Microenvironment. Darüber hinaus hat er das Potenzial prometastatisch und wachstumsfördernd zu wirken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob der nfP2X₇ Rezeptor im muskelinvasiven high grade Urothelkarzinom exprimiert wird und diese Expression auf subzellulärer Ebene mit der Expression im benignen Gewebe korreliert. Dies hatte den Zweck zu untersuchen, ob der Rezeptor einerseits als diagnostischer Marker zum Nachweis eines Karzinoms, als auch als therapeutisches Target in der zukünftigen Therapie des Urothelkarzinoms eine Rolle spielen kann. Darüber hinaus wurde die Expression des Rezeptors mit dem pathologischen Status, sowie klinischen Verlaufsdaten korreliert, um den Einfluss auf den prognostischen Verlauf zu überprüfen.

Die Untersuchung fand anhand eines Kollektives von n=102 Patienten statt. Hierzu wurden die Parameter der Färbeintensität des nfP2X₇-Rezeptors anhand eines Tissue Microarray mittels immunhistochemischer Färbemethode untersucht. Es wurde zur Färbung der BPM09 Antikörper verwendet. Der TMA enthielt Gewebe aus muskelinvasiven high grade Urothelkarzinomen und benignem Urothel. Die hieraus gewonnenen Daten wurden im Anschluss mit den klinischen Daten des Kollektivs und Verlaufsdaten korreliert.

Die Auswertung der membranständigen Expression zeigte eine spezifische Expression fast ausschließlich auf Tumorzellen. Bei der zytoplasmatischen Färbung verhielt es sich anders. Es konnten höhere Expressionslevel im benignen als im maligne veränderten Gewebe nachgewiesen werden. Bezüglich Alter und Geschlecht ergaben sich keine Unterschiede. Auch hatte die Rezeptorexpression keinen Einfluss auf das T-Stadium und das Metastasierungsverhalten der Tumore. Die Auswertung des individuellen Krankheitsverlaufs ergab, dass sich mit einem erhöhten membranständigen Expressionslevel, das krankheitsspezifische sowie das Gesamtüberleben signifikant erhöhen.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der membranständige nfP2X₇ Rezeptor ein Marker zum Nachweis des high grade muskelinvasiven Urothelkarzinom darstellen kann. Es konnte jedoch, entgegen der Erwartung, kein Zusammenhang zwischen dem T-Stadium oder dem Auftreten von Metastasen gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der nfP2X₇-Rezeptor in Zukunft einen Stellenwert in der Diagnostik, und Prognosebestimmung des high grade Urothelkarzinoms haben könnte. Es besteht auch die potenzielle Möglichkeit, ihn als Target für eine personalisierte, zielgerichtete Therapie einzusetzen. Ob sich die gewonnenen Erkenntnisse ebenfalls auf das low grade Urothelkarzinom übertragen lassen, sollte in weiteren Studien überprüft werden.

6 Anhang

6.1 Tabellen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation Harnblasenkarzinom (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016).....	4
Tabelle 2: Stadien-Einteilung Harnblasenkarzinom (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016).....	5
Tabelle 3: Charakterisierung des Patientenkollektivs.	36
Tabelle 4: Nachweis der subzellulären Rezeptorexpression im Tumor und Normalgewebe.	39
Tabelle 5: membranständiges Expressionsverhalten des nfP2X ₇ -Rezeptors in Tumor- und Normalgewebe.....	41
Tabelle 6: Zytoplasmatisches Expressionsverhalten des nfP2X ₇ -Rezeptor in Tumor- und Normalgewebe.....	41
Tabelle 7: Linearer Zusammenhang Tumor <i>versus</i> Normalgewebe in der subzellulären membranständigen und zytoplasmatischen Expression des nfP2X ₇ -Rezeptors. Signifikante p-Werte mit * markiert.....	46
Tabelle 8: Linearer Zusammenhang zwischen subzellulärer Rezeptorexpression (membranständig und zytoplasmatisch) der beiden Dignitäten zum Alter der Probanden.....	47
Tabelle 9: Statistische Werte der zytoplasmatischen Expression des nfP2X ₇ -Rezeptors im Vergleich T = 2, T ≥ 3.....	56
Tabelle 10: Statistische Werte der membranständigen Expression des nfP2X ₇ -Rezeptors im Vergleich T = 2, T ≥ 3.....	57
Tabelle 11: Statistische Werte der zytoplasmatischen Expression des nfP2X ₇ -Rezeptors im Vergleich N0 und N > 0.	58
Tabelle 12: Statistische Werte der membranständigen Expression des nfP2X ₇ -Rezeptors im Vergleich N0 und N > 0.	58

Tabelle 13: Statistische Werte der zytoplasmatischen Expression des nfP2X7-Rezeptors im Vergleich M0 und M1.	59
Tabelle 14: Statistische Werte der membranständigen Expression des nfP2X7-Rezeptors im Vergleich M0 und M1.	59
Tabelle 15: Statistische Werte der zytoplasmatischen Expression des nfP2X7-Rezeptors im Vergleich G2 und G3.	60
Tabelle 16: Statistische Werte der membranständigen Expression des nfP2X7-Rezeptors im Vergleich G2 und G3.	60
Tabelle 17: Univariate logistische Regressionsanalysen verschiedener Parameter bezogen auf das rezidivfreie Überleben (signifikante Werte mit * markiert).	63
Tabelle 18: Multivariate logistische Regressions-Analysen mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistests: Rezidivfreies Überleben bei membranständiger Expression des nfP2X7-Rezeptors (signifikante Werte mit * markiert).	64
Tabelle 19: Univariate logistische Regressionsanalyse der mittleren zytoplasmatischen Färbeintensität des nfP2X7-Rezeptors bezogen auf das rezidivfreie Überleben.	66
Tabelle 20: Multivariate logistische Regressions-Analysen mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistests: Rezidivfreies Überleben nach zytoplasmatischer Expression des nfP2X7-Rezeptors (signifikante Werte mit * markiert).	66
Tabelle 21: Univariate logistische Regressionsanalysen verschiedener Parameter bezogen auf das krankheitsspezifische Überleben (signifikante Werte mit * markiert).	68
Tabelle 22: Multivariate logistische Regressions-Analysen mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistests: krankheitsspezifisches Überleben bei membranständiger Expression des nfP2X7-Rezeptors (signifikante Werte mit * markiert).	69

Tabelle 24: Univariate logistische Regressionsanalyse der mittleren zytoplasmatischen Färbeintensität des nfP2X7-Rezeptors bezogen auf das krankheitsspezifische Überleben..... 70

Tabelle 25: Multivariate logistische Regressions-Analysen mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistests: krankheitsspezifisches Überleben bei zytoplasmatischer Expression des nfP2X7-Rezeptors (signifikante Werte mit * markiert)..... 70

Tabelle 26: Univariate logistische Regressionsanalysen verschiedener Parameter bezogen auf das Gesamtüberleben (signifikante Werte mit * markiert). 72

Tabelle 27: Multivariate logistische Regressions-Analysen mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistests: Gesamtüberleben bei membranständiger Expression des nfP2X7-Rezeptors (signifikante Werte mit * markiert). 73

Tabelle 27: Univariate logistische Regressionsanalyse der mittleren zytoplasmatischen Färbeintensität des nfP2X7-Rezeptors bezogen auf das Gesamtüberleben..... 75

Tabelle 28: Multivariate logistische Regressions-Analyse mittels Effekt-Likelihood-Verhältnistests: Gesamtüberleben bei zytoplasmatischen Expression des nfP2X7-Rezeptors (signifikante Werte mit * markiert). 75

6.2 Abbildungen

- Abbildung 1:** Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2010 (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., , 2013). 2
- Abbildung 2:** Interaktionen zwischen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (grau), p53 (grün) und Retinoblastomprotein (orange)-Pathways im Kontext der Zell-Zyklus-Kontrolle (Mitra *et al.*, 2012). 13
- Abbildung 3:** Struktur und Signalfunktion des P2X7-Rezeptors. (a) Jeder P2X7-Rezeptor ist ein Trimer, mit drei Proteinuntereinheiten, die um die für Kationen permeable Pore angeordnet sind. Die Untereinheiten haben eine gleiche Topologie, mit 2 Plasmamembran übergreifende Domänen (TM1 und TM2), einem großen Loop mit der ATP Bindungsstelle und 10 ähnlich beanstandete Cysteine und Glykosylierungsstellen sowie intrazelluläre Carboxyl- und Aminoterminis. (b) eine kurze Aktivierung (<10 Sekunden) des P2X7-Rezeptors resultiert in einer schnellen reversiblen Kanalöffnung, welcher für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ permeabel ist. Die akute Rezeptoraktivierung triggert eine Reihe von intrazellulären Abläufen, wie Depolarisation, Degranulation und Membran-Blebbing, sowie andren Signalkaskaden. (c) Eine fortbestehende Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Dilatation des Kanals, was zu einer Membranpassierbarkeit für kationische Moleküle bis zu einer Größe von 900 Da. Darüber hinaus resultiert diese Aktivierung in manchen Zellen in einer Induktion der Apoptose / Zell-Lyse, sowie durch die Aktivierung der Caspase-1 in einer Freisetzung von Interleukin (IL)-1 β (Skaper *et al.*, 2009). 17
- Abbildung 4:** Funktionsprinzip des TMA (Giltneane and Rimm, 2004). 23
- Abbildung 5:** Indirekte Methode der Immunhistochemie (Eigene Darstellung)
Rotes Dreieck = Antigen, 1 = Primärantikörper, 2 = Sekundärantikörper, grünes Fünfeck = Enzym, blauer Punkt = Substrat, brauner Punkt = Farbstoff..... 24

Abbildung 6: Beispiele der jeweiligen Färbeintensitäten *oben* in der Übersicht des Gewebedots (250-fache Vergrößerung), *unten* jeweils der oben rot markierte Ausschnitt in 750-facher Vergrößerung..... 29

Abbildung 7: Beispiele der jeweiligen membranständigen Färbeintensitäten oben in der Übersicht des Gewebedots (250-fache Vergrößerung), unten jeweils der oben rot markierte Ausschnitt in 1000-facher Vergrößerung..... 29

Abbildung 8: 8a (links) und 8b (rechts): Geschlechts und Altersverteilung im Patientenkollektiv. 34

Abbildung 9: BPM09-Antikörperfärbung als Braufärbung dargestellt A: benignes Urothel eines gesamten Gewebedots; B: Urothelkarzinom eines gesamten Gewebedots (Vergrößerung 250-fach)..... 37

Abbildung 10: Beispielbilder (A) zytoplasmatische Färbung am Beispiel einer benignen Gewebeprobe und (B) membranständige Färbung am Beispiel eines maligne veränderten Gewebedots. Jeweils Ausschnitt eines Gewebedots in 8-facher Vergrößerung. 38

Abbildung 11: Verteilungen der membranständigen Färbeintensität des nfP2X7-Rezeptors in (A) Tumorgewebe und (B) Normalgewebe..... 40

Abbildung 12: Linearer Zusammenhang zwischen der Membranständigen und Zytoplasmatischen Expression des nfP2X7-Rezeptors. Die Abbildung zeigt dies links am Tumorgewebe und rechts am Normalgewebe. Signifikante p-Werte mit * markiert..... 42

Abbildung 13: Vergleich der membranständigen Expression des nfP2X7-Rezeptors in Tumor und Normalgewebe. Signifikante p-Werte mit * markiert.. 44

Abbildung 14: Vergleich der zytoplasmatische Expression des nfP2X7-Rezeptors in Tumor und Normalgewebe. Signifikante p-Werte mit * markiert.. 45

Abbildung 15: Vergleich der membranständigen Expression des nfP2X7-Rezeptors in Tumor und Normalgewebe beim weiblichen Geschlecht. Signifikante p-Werte mit * markiert..... 49

Abbildung 16: Vergleich der membranständigen Expression des nfP2X7-Rezeptors in Tumor und Normalgewebe beim männlichen Geschlecht. Signifikante p-Werte mit * markiert. 51

Abbildung 17: Vergleich der zytoplasmatische Expression des nfP2X7-Rezeptors in Tumor und Normalgewebe beim weiblichen Geschlecht. Signifikante p-Werte mit * markiert. 52

Abbildung 18: Vergleich der zytoplasmatische Expression des nfP2X7-Rezeptors in Tumor und Normalgewebe beim männlichen Geschlecht. Signifikante p-Werte mit * markiert..... 53

Abbildung 19: Vergleich der membranständigen Expression des nfP2X7-Rezeptors zwischen Männern und Frauen. Signifikante p-Werte mit * markiert. 54

Abbildung 20: Vergleich der zytoplasmatische Expression des nfP2X7-Rezeptors zwischen Männern und Frauen. Signifikante p-Werte mit * markiert. 55

Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve Rezidiwwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbeintensität des membranständigen nfP2X7-Rezeptors dichotomisiert am Medianwert..... 62

Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve Rezidiwwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbeintensität des zytoplasmatischen nfP2X7-Rezeptors dichotomisiert am Medianwert..... 65

Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve der krankheitsabhängigen Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbeintensität des membranständigen nfP2X7-Rezeptors dichotomisiert am Medianwert. 68

Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve der krankheitsabhängigen Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbeintensität des zytoplasmatischen nfP2X7-Rezeptors dichotomisiert am Medianwert. 70

Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve der allgemeinen Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbeintensität des

membranständigen nfP2X7-Rezeptors. Signifikanter Wert mit * gekennzeichnet
dichotomisiert am Medianwert..... 72

Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve der allgemeinen
Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbeintensität des
zytoplasmatischen nfP2X7-Rezeptors dichotomisiert am Medianwert. 74

7 Literaturverzeichnis

Uncategorized References

- ADINOLFI, E., CALLEGARI, M. G., CIRILLO, M., PINTON, P., GIORGI, C., CAVAGNA, D., RIZZUTO, R. & DI VIRGILIO, F. 2009. Expression of the P2X7 receptor increases the Ca²⁺ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 10120-10128.
- ADINOLFI, E., CALLEGARI, M. G., FERRARI, D., BOLOGNESI, C., MINELLI, M., WIECKOWSKI, M. R., PINTON, P., RIZZUTO, R. & DI VIRGILIO, F. 2005. Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Molecular biology of the cell*, 16, 3260-3272.
- ADINOLFI, E., RAFFAGHELLO, L., GIULIANI, A. L., CAVAZZINI, L., CAPECE, M., CHIOZZI, P., BIANCHI, G., KROEMER, G., PISTOIA, V. & DI VIRGILIO, F. 2012. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer research*, 72, 2957-2969.
- AUGER, R., MOTTA, I., BENIHOUD, K., OJCIUS, D. M. & KANELLOPOULOS, J. M. 2005. A role for mitogen-activated protein kinase Erk1/2 activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 28142-28151.
- AUMÜLLER, G., AUST, G. & DOLL, A. 2010. *Duale Reihe Anatomie*, Georg Thieme Verlag.
- BABJUK, M., BÖHLE, A., BURGER, M., CAPOUN, O., COHEN, D., COMPÉRAT, E. M., HERNÁNDEZ, V., KAASINEN, E., PALOU, J. & ROUPRÊT, M. 2017. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2016. *European urology*, 71, 447-461.
- BAJORIN, D. F., DODD, P. M., MAZUMDAR, M., FAZZARI, M., MCCAFFREY, J. A., SCHER, H. I., HERR, H., HIGGINS, G. & BOYLE, M. G. 1999. Long-term survival in metastatic transitional-cell carcinoma and prognostic factors predicting outcome of therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 17, 3173-3181.
- BARDEN, J., YUKSEL, A., PEDERSEN, J., DANIELETTO, S. & DELPRADO, W. 2014. Non-functional P2X7: a novel and ubiquitous target in human cancer. *J Clin Cell Immunol*, 5, 237.
- BARDEN, J. A., SLUYTER, R., GU, B. J. & WILEY, J. S. 2003. Specific detection of non-functional human P2X(7) receptors in HEK293 cells and B-lymphocytes. *FEBS Lett*, 538, 159-62.
- BARICORDI, O. R., MELCHIORRI, L., ADINOLFI, E., FALZONI, S., CHIOZZI, P., BUELL, G. & DI VIRGILIO, F. 1999. Increased proliferation rate of

- lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor. *J Biol Chem*, 274, 33206-8.
- BATRA, S. & AL-HIJJI, J. 1998. Characterization of nitric oxide synthase activity in rabbit uterus and vagina: downregulation by estrogen. *Life Sci*, 62, 2093-100.
- BELLMUNT, J., CHOUEIRI, T. K., FOUGERAY, R., SCHUTZ, F. A., SALHI, Y., WINQUIST, E., CULINE, S., VON DER MAASE, H., VAUGHN, D. J. & ROSENBERG, J. E. 2010. Prognostic factors in patients with advanced transitional cell carcinoma of the urothelial tract experiencing treatment failure with platinum-containing regimens. *Journal of Clinical Oncology*, 28, 1850-1855.
- BOSCH, K. 1997. *Lexikon der Statistik: Nachschlagewerk für Anwender*, München, R. Oldenbourg Verlag.
- CARNEIRO, B. A., MEEKS, J. J., KUZEL, T. M., SCARANTI, M., ABDULKADIR, S. A. & GILES, F. J. 2015. Emerging therapeutic targets in bladder cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 41, 170-178.
- CHEEWATRAKOOLPONG, B., GILCHREST, H., ANTHES, J. C. & GREENFEDER, S. 2005. Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332, 17-27.
- COONS, A. H. 1971. The development of immunohistochemistry. *Ann N Y Acad Sci*, 177, 5-9.
- COONS, A. H., H. H. CREECH & R.N. JONES 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 200-202.
- COONS, A. H. & KAPLAN, M. H. 1950. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med*, 91, 1-13.
- DETRE, S., JOTTI, G. S. & DOWSETT, M. 1995. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *Journal of clinical pathology*, 48, 876-878.
- DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT E.V. 2016. *Onkologie Leitlinienprogramm, Konsultationsfassung: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Lang-version 4.0, 2016 AWMF Registernummer: 043/022OL* [Online]. Deutsche Krebsgesellschaft e.V. Available: https://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/LL_Prostata_Kurzversion_4.0.pdf [Accessed].
- DI VIRGILIO, F., CHIOZZI, P., FALZONI, S., FERRARI, D., SANZ, J. M., VENKETARAMAN, V. & BARICORDI, O. R. 1998. Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell death and differentiation*, 5, 191.

- DOEHN, C. 2012. Endourologische Bildgebung mittels „narrow band imaging“. *Der Urologe*, 51, 784-790.
- E.V., R. K.-I. U. D. G. D. E. K. I. D. 2013. Krebs in Deutschland 2009/2010. *Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.* [Online], 9. Ausgabe.
- EFEYAN, A. & SERRANO, M. 2007. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell cycle*, 6, 1006-1010.
- EGAN, T. M., SAMWAYS, D. S. & LI, Z. 2006. Biophysics of P2X receptors. *Pflügers Archiv*, 452, 501-512.
- FALZONI, S., DONVITO, G. & VIRGILIO, F. D. 2013. Detecting adenosine triphosphate in the pericellular space. *Interface Focus*, 3, 20120101.
- FERNÁNDEZ, M. I. 2016. Urothelkarzinom der Harnblase: Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren. In: MICHEL, M. S., THÜROFF, J. W., JANETSCHEK, G. & WIRTH, M. (eds.) *Die Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- FREEDMAN, N. D., SILVERMAN, D. T., HOLLENBECK, A. R., SCHATZKIN, A. & ABNET, C. C. 2011. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women Smoking and Risk of Bladder Cancer. *JAMA*, 306, 737-745.
- FRY, C. H. & VAHABI, B. 2016. The Role of the Mucosa in Normal and Abnormal Bladder Function. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 119, 57-62.
- GAKIS, G., NGAMSRI, T., RAUSCH, S., MISCHINGER, J., TODENHÖFER, T., SCHWENTNER, C., SCHMID, M. A., HASSAN, F. A.-S., RENNINGER, M. & STENZL, A. 2015. Fluorescence-guided bladder tumour resection: impact on survival after radical cystectomy. *World journal of urology*, 33, 1429-1437.
- GAKIS, G. & STENZL, A. 2016. *Molekulare Marker beim high-grade Harnblasenkarzinom: diagnostisch-prognostisch-prädiktiv*, Springer-Verlag.
- GILBERT, S., GIDLEY BAIRD, A., GLAZER, S., BARDEN, J., GLAZER, A., TEH, L. & KING, J. 2017. A phase I clinical trial demonstrates that nfP2X7-targeted antibodies provide a novel, safe and tolerable topical therapy for basal cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*, 177, 117-124.
- GILBERT, S. M., OLIPHANT, C. J., HASSAN, S., PEILLE, A. L., BRONSERT, P., FALZONI, S., DI VIRGILIO, F., MCNULTY, S. & LARA, R. 2019. ATP in the tumour microenvironment drives expression of nfP2X7, a key mediator of cancer cell survival. *Oncogene*, 38, 194-208.
- GILTANE, J. M. & RIMM, D. L. 2004. Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 1, 104.

- GÓMEZ-VILLAFUERTE, R., GARCÍA-HUERTA, P., DÍAZ-HERNÁNDEZ, J. I. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2015. PI3K/Akt signaling pathway triggers P2X7 receptor expression as a pro-survival factor of neuroblastoma cells under limiting growth conditions. *Scientific Reports*, 5, 18417.
- HABUCHI, T., MARBERGER, M., DROLLER, M. J., HEMSTREET, G. P., 3RD, GROSSMAN, H. B., SCHALKEN, J. A., SCHMITZ-DRAGER, B. J., MURPHY, W. M., BONO, A. V., GOEBELL, P., GETZENBERG, R. H., HAUTMANN, S. H., MESSING, E., FRADET, Y. & LOKESHWAR, V. B. 2005. Prognostic markers for bladder cancer: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*, 66, 64-74.
- HAUTMANN, R. E., DE PETRICONI, R. C., PFEIFFER, C. & VOLKMER, B. G. 2012. Radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder without neoadjuvant or adjuvant therapy: long-term results in 1100 patients. *European urology*, 61, 1039-1047.
- HSU, S.-M., RAINE, L. & FANGER, H. 1981a. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *American journal of clinical pathology*, 75, 816-821.
- HSU, S.-M., RAINE, L. & FANGER, H. 1981b. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29, 577-580.
- HUANG, L. & FU, L. 2015. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5, 390-401.
- HUMPHREY, P. A., MOCH, H., CUBILLA, A. L., ULBRIGHT, T. M. & REUTER, V. E. 2016. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part B: prostate and bladder tumours. *European urology*, 70, 106-119.
- JELASSI, B., CHANTOME, A., ALCARAZ-PEREZ, F., BAROJA-MAZO, A., CAYUELA, M., PELEGRIN, P., SURPRENANT, A. & ROGER, S. 2011. P2X 7 receptor activation enhances SK3 channels-and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. *Oncogene*, 30, 2108.
- JOCHAM, D., STEPP, H. & WAIDELICH, R. 2008. Photodynamic diagnosis in urology: state-of-the-art. *European urology*, 53, 1138-1150.
- JONES, R. T., FELSENSTEIN, K. M. & THEODORESCU, D. 2016. Pharmacogenomics: biomarker-directed therapy for bladder cancer. *Urologic Clinics*, 43, 77-86.
- KAWAHARA, T., KASHIWAGI, E., IDE, H., LI, Y., ZHENG, Y., MIYAMOTO, Y., NETTO, G. J., ISHIGURO, H. & MIYAMOTO, H. 2015. Cyclosporine A and tacrolimus inhibit bladder cancer growth through down-regulation of NFATc1. *Oncotarget*, 6, 1582.
- KECK, B. 2016. Urothelkarzinom der Harnblase: systemische Therapie des metastasierten Urothelkarzinoms. In: MICHEL, M. S., THÜROFF, J. W.,

- JANETSCHEK, G. & WIRTH, M. (eds.) *Die Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- KITAMURA, H., TSUKAMOTO, T., SHIBATA, T., MASUMORI, N., FUJIMOTO, H., HIRAO, Y., FUJIMOTO, K., KITAMURA, Y., TOMITA, Y. & TOBISU, K. 2014. Randomised phase III study of neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, doxorubicin, vinblastine and cisplatin followed by radical cystectomy compared with radical cystectomy alone for muscle-invasive bladder cancer: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0209. *Annals of Oncology*, 25, 1192-1198.
- KITAWAKI, J., KUSUKI, I., KOSHIBA, H., TSUKAMOTO, K., FUSHIKI, S. & HONJO, H. 1999. Detection of aromatase cytochrome P-450 in endometrial biopsy specimens as a diagnostic test for endometriosis. *Fertility and sterility*, 72, 1100-1106.
- KOCH-INSTITUT, R. 2017. Krebs in Deutschland für 2013/2014. Robert Koch-Institut.
- KONONEN, J., BUBENDORF, L., KALLIONIMENI, A., BÄRLUND, M., SCHRAML, P., LEIGHTON, S., TORHORST, J., MIHATSCH, M. J., SAUTER, G. & KALLIONIMENI, O.-P. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature medicine*, 4, 844.
- KRAYWINKEL, K., FIEBIG, J. & SCHULZ, G. B. 2018. Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms in Deutschland. *Der Onkologe*, 24, 6-13.
- KRUSKAL, W. H. W., W.A. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47, 583-621.
- LEHEN, K., HANTUTE-GHESQUIER, A., HAUSTRATE, A. & PREVARSKAYA, N. 2019. MONOCLONAL ANTIBODIES TARGETING ION CHANNELS AND THERAPEUTIC POTENTIAL. *Frontiers in pharmacology*, 10, 606.
- LICHTENSTEIN, P., HOLM, N. V., VERKASALO, P. K., ILIADOU, A., KAPRIO, J., KOSKENVUO, M., PUKKALA, E., SKYTTHE, A. & HEMMINKI, K. 2000. Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England Journal of Medicine*, 343, 78-85.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2009. Taschenlehrbuch Histologie. Vol. Thieme Verlag.
- MARTINI, T. 2016. Urothelkarzinom der Harnblase: Diagnostik. In: MICHEL, M. S., THÜROFF, J. W., JANETSCHEK, G. & WIRTH, M. (eds.) *Die Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- MASSARD, C., GORDON, M. S., SHARMA, S., RAFII, S., WAINBERG, Z. A., LUKE, J., CURIEL, T. J., COLON-OTERO, G., HAMID, O. & SANBORN, R. E. 2016. Safety and efficacy of durvalumab (MEDI4736), an anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint inhibitor, in patients with advanced urothelial bladder cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34, 3119.

- MAYGARDEN, S. J., NOVOTNY, D. B., MOUL, J. W., BAE, V. L. & WARE, J. L. 1994. Evaluation of cathepsin D and epidermal growth factor receptor in prostate carcinoma. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 7, 930-936.
- MERSDORF, A., KRAMER, W. & JONAS, D. 2006. Anatomie und Physiologie. *Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- METTS, M. C., METTS, J. C., MILITO, S. J. & THOMAS, C. R., JR. 2000. Bladder cancer: a review of diagnosis and management. *J Natl Med Assoc*, 92, 285-94.
- MITRA, A. P., BIRKHAHN, M. & COTE, R. J. 2007. p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer. *World journal of urology*, 25, 563-571.
- MITRA, A. P., HANSEL, D. E. & COTE, R. J. Prognostic value of cell-cycle regulation biomarkers in bladder cancer. *Seminars in oncology*, 2012. Elsevier, 524-533.
- MURTA-NASCIMENTO, C., SILVERMAN, D. T., KOGEVINAS, M., GARCÍA-CLOSAS, M., ROTHMAN, N., TARDÓN, A., GARCÍA-CLOSAS, R., SERRA, C., CARRATO, A., VILLANUEVA, C., DOSEMECI, M., REAL, F. X. & MALATS, N. 2007. Risk of Bladder Cancer Associated with Family History of Cancer: Do Low-Penetrance Polymorphisms Account for the Increase in Risk? *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16, 1595-1600.
- NAKAGAWA, T., TAGUCHI, S., UEMURA, Y., KANATANI, A., IKEDA, M., MATSUMOTO, A., YOSHIDA, K., KAWAI, T., NAGATA, M. & YAMADA, D. Nomogram for predicting survival of postcystectomy recurrent urothelial carcinoma of the bladder. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2017. Elsevier, 457. e15-457. e21.
- OHAEBGULAM, K. C., ASSAL, A., LAZAR-MOLNAR, E., YAO, Y. & ZANG, X. 2015. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends in molecular medicine*, 21, 24-33.
- ORRENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B. & NICOTERA, P. 2003. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 552-565.
- PETRYLAK, D. P., POWLES, T., BELLMUNT, J., BRAITEH, F., LORIOT, Y., MORALES-BARRERA, R., BURRIS, H. A., KIM, J. W., DING, B. & KAISER, C. 2018. Atezolizumab (MPDL3280A) monotherapy for patients with metastatic urothelial cancer: long-term outcomes from a phase 1 study. *JAMA oncology*, 4, 537-544.
- POWLES, T., EDER, J. P., FINE, G. D., BRAITEH, F. S., LORIOT, Y., CRUZ, C., BELLMUNT, J., BURRIS, H. A., PETRYLAK, D. P. & TENG, S.-L. 2014. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, 515, 558.
- RAILKAR, R., KRANE, L. S., LI, Q. Q., SANFORD, T., SIDDIQUI, M. R., HAINES, D., VOURGANTI, S., BRANCATO, S. J., CHOYKE, P. L., KOBAYASHI,

- H. & AGARWAL, P. K. 2017. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-targeted Photoimmunotherapy (PIT) for the Treatment of EGFR-expressing Bladder Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16, 2201-2214.
- RAUSCH, S., HENNENLOTTER, J., TEEPE, K., KUEHS, U., AUFDERKLAMM, S., BIER, S., MISCHINGER, J., GAKIS, G., STENZL, A. & SCHWENTNER, C. Muscle-invasive bladder cancer is characterized by overexpression of thymidine kinase 1. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2015. Elsevier, 426. e21-426. e29.
- RÖDEL, C., GRABENBAUER, G. G., KÜHN, R., PAPADOPOULOS, T., DUNST, J. R., MEYER, M., SCHROTT, K. M. & SAUER, R. 2002. Combined-modality treatment and selective organ preservation in invasive bladder cancer: long-term results. *Journal of Clinical Oncology*, 20, 3061-3071.
- SANCHEZ-CARBAYO, M. 2003. Use of high-throughput DNA microarrays to identify biomarkers for bladder cancer. *Clin Chem*, 49, 23-31.
- SHERIF, A., HOLMBERG, L., RINTALA, E., MESTAD, O., NILSSON, J., NILSSON, S. & MALMSTRÖM, P.-U. 2004. Neoadjuvant cisplatinium based combination chemotherapy in patients with invasive bladder cancer: a combined analysis of two Nordic studies. *European urology*, 45, 297-303.
- SKAPER, S., DEBETTO, P. & GIUSTI, P. 2009. P2X7 Receptors in Neurological and Cardiovascular Disorders. *Cardiovascular psychiatry and neurology*, 2009, 861324.
- SLATER, M., DANIELETTO, S., GIDLEY-BAIRD, A., TEH, L. C. & BARDEN, J. A. 2004. Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors. *Histopathology*, 44, 206-15.
- SLATER, M., SCOLYER, R. A., GIDLEY-BAIRD, A., THOMPSON, J. F. & BARDEN, J. A. 2003. Increased expression of apoptotic markers in melanoma. *Melanoma research*, 13, 137-145.
- SLUYTER, R. & STOKES, L. 2011. Significance of P2X7 receptor variants to human health and disease. *Recent patents on DNA & gene sequences*, 5, 41-54.
- SPEARMAN, C. 1904. The proof and measurement of association between two things. *The American journal of psychology*, 15, 72-101.
- STENZL, A., COWAN, N. C., DE SANTIS, M., KUCZYK, M. A., MERSEBURGER, A. S., RIBAL, M. J., SHERIF, A. & WITJES, J. A. 2011. Treatment of Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Update of the EAU Guidelines. *Eur Urol*.
- STERN, M. C., LIN, J., FIGUEROA, J. D., KELSEY, K. T., KILTIE, A. E., YUAN, J.-M., MATULLO, G., FLETCHER, T., BENHAMOU, S., TAYLOR, J. A., PLACIDI, D., ZHANG, Z.-F., STEINECK, G., ROTHMAN, N., KOGEVINAS, M., SILVERMAN, D., MALATS, N., CHANOCK, S., WU, X., KARAGAS, M. R., ANDREW, A. S., NELSON, H. H., BISHOP, D. T., SAK,

- S. C., CHOUDHURY, A., BARRETT, J. H., ELLIOT, F., CORRAL, R., JOSHI, A. D., GAGO-DOMINGUEZ, M., CORTESSIS, V. K., XIANG, Y.-B., GAO, Y.-T., VINEIS, P., SACERDOTE, C., GUARRERA, S., POLIDORO, S., ALLIONE, A., GURZAU, E., KOPPOVA, K., KUMAR, R., RUDNAI, P., PORRU, S., CARTA, A., CAMPAGNA, M., ARICI, C., PARK, S. S. L. & GARCIA-CLOSAS, M. 2009. Polymorphisms in DNA Repair Genes, Smoking, and Bladder Cancer Risk: Findings from the International Consortium of Bladder Cancer. *Cancer Research*, 69, 6857-6864.
- STERNBERG, C. N., SKONECZNA, I., KERST, J. M., ALBERS, P., FOSSA, S. D., AGERBAEK, M., DUMEZ, H., DE SANTIS, M., THÉODORE, C. & LEAHY, M. G. 2015. Immediate versus deferred chemotherapy after radical cystectomy in patients with pT3–pT4 or N+ M0 urothelial carcinoma of the bladder (EORTC 30994): an intergroup, open-label, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology*, 16, 76-86.
- SUNSHINE, J. & TAUBE, J. M. 2015. Pd-1/Pd-L1 Inhibitors. *Current opinion in pharmacology*, 23, 32-38.
- SURPRENANT, A., RASSENDREN, F., KAWASHIMA, E., NORTH, R. A. & BUELL, G. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 272, 735-8.
- THUNBERG, U., TOBIN, G., JOHNSON, A., SÖDERBERG, O., PADYUKOV, L., HULTDIN, M., KLARESKOG, L., ENBLAD, G., SUNDSTRÖM, C., ROOS, G. & ROSENQUIST, R. 2002. Polymorphism in the P2X7 receptor gene and survival in chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*, 360, 1935-1939.
- TODENHOFER, T., HENNENLOTTER, J., ESSER, M., MOHRHARDT, S., TEWS, V., AUFDERKLAMM, S., GAKIS, G., KUEHS, U., STENZL, A. & SCHWENTNER, C. 2013. Combined application of cytology and molecular urine markers to improve the detection of urothelial carcinoma. *Cancer Cytopathol*, 121, 252-60.
- VALERA, S., HUSSY, N., EVANS, R. J., ADAMI, N., NORTH, R. A., SURPRENANT, A. & BUELL, G. 1994. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*, 371, 516.
- VASSILEV, L. T., VU, B. T., GRAVES, B., CARVAJAL, D., PODLASKI, F., FILIPOVIC, Z., KONG, N., KAMMLOTT, U., LUKACS, C. & KLEIN, C. 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 303, 844-848.
- VIRGINIO, C., MACKENZIE, A., RASSENDREN, F. A., NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. 1999. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nature Neuroscience*, 2, 315-321.
- WITJES, J. A., COMPERAT, E., COWAN, N. C., DE SANTIS, M., GAKIS, G., LEBRET, T., RIBAL, M. J., VAN DER HEIJDEN, A. G. & SHERIF, A. 2014. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol*, 65, 778-92.

- WITJES, J. A., LEBRET, T., COMPÉRAT, E. M., COWAN, N. C., DE SANTIS, M., BRUINS, H. M., HERNANDEZ, V., ESPINÓS, E. L., DUNN, J. & ROUANNE, M. 2017. Updated 2016 EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *European urology*, 71, 462-475.
- WOLDU, S. L., BAGRODIA, A. & LOTAN, Y. 2017. Guideline of guidelines: non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU international*, 119, 371-380.
- WORTHINGTON, R., SMART, M., GU, B., WILLIAMS, D., PETROU, S., WILEY, J. & BARDEN, J. 2002. Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X7 receptor function. *FEBS letters*, 512, 43-46.
- YAFI, F. A., BRIMO, F., AUGER, M., APRIKIAN, A., TANGUAY, S. & KASSOUF, W. Is the performance of urinary cytology as high as reported historically? A contemporary analysis in the detection and surveillance of bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2014. Elsevier, 27. e1-27. e6.
- YAFI, F. A., BRIMO, F., STEINBERG, J., APRIKIAN, A. G., TANGUAY, S. & KASSOUF, W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2015. Elsevier, 66. e25-66. e31.
- ZHANG, L. Y., IBBOTSON, R. E., ORCHARD, J. A., GARDINER, A. C., SEEAR, R. V., CHASE, A. J., OSCIER, D. G. & CROSS, N. C. P. 2003. P2X7 polymorphism and chronic lymphocytic leukaemia: lack of correlation with incidence, survival and abnormalities of chromosome 12. *Leukemia*, 17, 2097-2100.

Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Doktorvater Prof. Dr. med. Tilman Todenhöfer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte gemeinsam durch den Betreuer Prof. Todenhöfer, Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter und mich.

Im Rahmen eines Verbundprojekts, „Retrospektive immunhistochemische Untersuchungen zur Expression onkologisch relevanter Proteinparameter beim muskelinvasiven Urothelkarzinom der Harnblase mittels Tissue Micro Array Technik“, wurde die Datenbank von Frau Dr. med. Katharina Teepe angelegt und die TMA-Herstellung, sowie die immunhistochemische Färbung von Frau Ursula Kühs (medizinisch-technische Assistentin des Labors der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen) in der Urologischen Klinik durchgeführt.

Die histopathologische Verifizierung der untersuchten Gewebeproben wurde gemeinsam durch OA Dr. med. Marcus Scharpf aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen und mich durchgeführt.

Die Erstellung des Auswertungsscores wurde zusammen mit Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter vorgenommen, die Analyse der Expressionen des non-functional P2X-Rezeptors wurde selbstständig durch mich durchgeführt.

Die statistische Auswertung und Interpretation dieser Daten erfolgte nach Einarbeitung durch *cand. Inform.* Tim Neumann, eigenständig durch mich.

Die Diskussion der Ergebnisse wurde gemeinsam mit dem Betreuer besprochen.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 15.03.2020

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

T. Lütfnenk, J. Hennenlotter, U. Kühns, R. Handgretinger, S. Rausch, A. Stenzl, T. Todenhöfer – „Clinical implications of non-functional P2X7 receptor expression in muscle-invasive bladder cancer“ - Der Urologe – 2020 – Band 59 (Suppl 1) – Seite 57

Danksagung

Zu allererst möchte ich Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl, dem Ärztlichen Direktor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen bedanken, dafür dass er mir die Möglichkeit gegeben hat in der urologischen Abteilung zu promovieren, sowie dafür die Materialien und Räumlichkeiten zur Verfügung zur Verfügung zu stellen.

Anschließend gebührt Herrn Prof. Dr. med. Tilman Todenhöfer ein großer Dank für die Betreuung und seine außerordentliche Fachkompetenz sowie seiner Anregungen während dieser Arbeit.

Ganz besonders gilt meine Dankbarkeit Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Seine allzeit angebotene Hilfe und sein außerordentlich gutes und konstruktives Feedback haben die Arbeit stets begleitet. Seine Expertise war mir stets eine große Hilfe. Die stets offene Tür seines Labors und die Zeit, die er sich auch trotz unangemeldeten Besuchen genommen hat, haben mir stets Sicherheit gegeben.

Des Weiteren möchte ich dem Team des urologischen Labors, insbesondere Frau Ursula Kühs für die Hilfe bei der Erstellung der immunhistochemischen Färbung danken. Darüber hinaus gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Janina Johanning ihre Hilfe im Kontakt mit Wissenschaftlern auch über die Landesgrenzen hinaus.

Mein Dank gilt auch Tim Neumann der mir eine große Hilfe bei der statistischen Auswertung und der Erläuterung verschiedener Verfahren zur Auswertung des TMA war. Natürlich möchte ich auch Dr. med. Katharina Teepe für die Erstellung des TMA danken, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte auch Herrn OA Dr. med. Marcus Scharpf für sein offenes Ohr bei Fragen jeder Art, insbesondere zur pathologischen Auswertung des Arrays danken.

Des Weiteren gilt mein Dank auch Prof. Dr. med. Handgretinger, für die Bereitstellung des Antikörpers.

Danksagung

Zu guter Letzt will ich meinen allergrößten Dank aber meine Familie aussprechen. Der Dank gilt insbesondere meiner Frau Marleen Lütfnenk, die unendlich viel Geduld mit mir hatte und mich in allen Belangen meines Lebens unterstützt. Auch meine Mutter Hildegard Trockels-Lütfnenk gab mir immer den nötigen Rückhalt und ein offenes Ohr, und mein Vater Gerhard Lütfnenk, auf den ich immer verlassen kann. Ohne euch wären diese Arbeit und mein Studium nicht möglich gewesen! Danke!