

Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. A. Stenzl

KLF-5 und DeltaNp63 als Marker urothelialer
Stammzellproliferation – eine morphologische Studie an
Zystektomiepräparaten

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin
der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Michaela Karin Mann
aus Erwitte

2022

Dekan: Professor Dr. rer. nat. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Arnulf Stenzl

2. Berichterstatter: Professor Dr. Arndt-Christian Müller

Tag der Disputation: 21.03.2023

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	5
I.1	Urothel / Urothelentwicklung	6
I.2	Physiologische Regeneration des Urothels	7
I.3	Stammzeleigenschaften	7
I.4	Immunhistologische urotheliale Marker	8
I.5	Tissue Engineering	9
I.6	Ausgewählte Marker	10
I.6.1	DeltaNp63.....	10
I.6.2	KLF-5.....	10
I.6.3	Uroplakin II.....	11
I.7	Fragestellung	11
II	Material und Methoden	14
II.1	Proben / Patienten dieser Studie	14
II.1.1	Einschlusskriterien.....	15
II.1.2	Ausschlusskriterien.....	16
II.2	Ethikvotum	16
II.3	Gewebeaufbereitung des Operationspräparates und Weiterverarbeitung zu Kleinflächenschnitten	16
II.4	Immunhistochemie	18
II.4.1	Allgemeines Funktionsprinzip.....	18
II.4.2	Verwendete Materialien.....	19
II.4.3	Durchführung der immunhistochemischen Färbung.....	20
II.5	Erfassung und Interpretation des Expressionsverhaltens	22
II.6	Vertiefende Analyse zur genaueren Lokalisation von Zellen mit Proliferationseigenschaften	26
II.6.1	Uroplakin II.....	27
II.6.2	DeltaNp63.....	28
II.6.3	KLF-5.....	29
II.7	Datenbankerstellung und -verarbeitung	30
II.8	Datenschutzbestimmungen	31
II.9	Verwendete Software	31
III	Ergebnisse	32
III.1	Übersicht H-Score der ersten Analyse	32
III.2	Übersicht Verteilung der Expressionslevel der Marker	34
III.2.1	Uroplakin II.....	34
III.2.2	DeltaNp63.....	35
III.2.3	KLF-5.....	36
III.3	Übersicht Ergebnisse vertiefende Analyse	37
III.3.1	Uroplakin II.....	37
III.3.2	DeltaNp63.....	41
III.3.3	KLF-5.....	44

IV	<i>Diskussion</i>	52
IV.1	Uroplakin II	52
IV.2	DeltaNp63	53
IV.3	KLF-5	55
IV.4	Ausblick für die Zukunft	57
V	<i>Zusammenfassung</i>	59
VI	<i>Anhang</i>	62
VII	<i>Tabellen und Abbildungen</i>	63
VII.1	Abbildungsverzeichnis	63
VII.2	Tabellenverzeichnis	65
VIII	<i>Literaturverzeichnis</i>	66
IX	<i>Erklärung zum Eigenanteil</i>	70
X	<i>Danksagung</i>	71

I Einleitung

In der aktuellen Forschung haben die Stammzeleigenschaften von Zellen in der Harnblasenwand einen hohen Stellenwert. Die genaue Lokalisation und die Art der Proliferation ist bis heute noch nicht abschließend geklärt (Larsson HM, 2014), (Al-Kurdi, 2017). Urothelzellen mit Stammzeleigenschaften im Urothel sind besonders deshalb interessant, da sie gezielt mit Blasenspülungen extrahiert, vermehrt und ggf. zur künstlichen Erzeugung von in-vitro-Gewebe verwendet werden können.

Dies wäre v.a. in der Urologie für rekonstruktiv-urologische Eingriffe wie zum Beispiel Harnröhrenrekonstruktionen oder Rekonstruktionen der Harnblase, beispielsweise bei Patienten mit funktionellen oder onkologischen Erkrankungen der Harnblase, relevant (Atala, Bauer, Soker, Yoo, & Retik, 2006). Vor allem im Bereich des Tissue Engineering sind neben optimalen Gerüsten aus Bindegeweben geeignete Quellen von proliferierenden Stammzellen der jeweiligen Zielzelle erforderlich (Feil, 2011).

Diese Arbeit hat das Ziel innerhalb der unterschiedlichen Schichten der Harnblasenwand die Lokalisation von Urothelzellen mit ihren jeweiligen Stammzeleigenschaften und eine Proliferation deskriptiv zu erfassen.

Insbesondere die genaue Lage, also die lokoregionäre Verteilung der Stammzellen innerhalb des Harnblasenurothels sollen in dieser Arbeit untersucht werden.

Die Marker KLF-5 und DeltaNp63 werden anhand der aktuellen Literatur (siehe Kapitel I.4) auf ihre Eignung zum immunhistochemischen Nachweis von proliferierenden Zellen im Urothel untersucht. Sollte sich herausstellen, dass sich die Urothelzellen mit proliferierenden Stammzeleigenschaften im luminalen Urothel befinden, könnte dies Auswirkungen auf die Therapie von Patienten mit beispielsweise funktionellen und onkologischen Erkrankungen des oberen und unteren Harntrakts haben indem es die Gewinnung von Zellen mit Stammzell- Charakter stark vereinfachen würde.

Die Arbeit stellt in Kapitel I das allgemeine Umfeld der Arbeit inklusive der Marker vor. Kapitel II befasst sich mit Material und Methoden, hier wird der Aufbau und das Vorgehen des Experiments beschrieben. Kapitel III stellt die Ergebnisse vor, die in

Kapitel IV genauer diskutiert und eingeordnet werden. Die gesamte Arbeit wird in Kapitel V nochmals zusammengefasst.

I.1 Urothel / Urothelentwicklung

Das Urothel ist ein Übergangsepithel und kleidet die ableitenden Harnwege aus. Ein Teil der Urethra ist mit Plattenepithel ausgekleidet. Die Funktion des Urothels ist es hauptsächlich eine osmotische Barriere zwischen Urin und Stroma zu bilden. Das Urothel erstreckt sich vom Nierenbecken über Harnleiter, Blase bis in die Harnröhre. Es wird in der Harnblase durch mehrere Zellschichten gebildet: die Basalschicht, die eine Zelllage umfasst, einer Intermediärschicht aus mehreren Zelllagen, wobei die Morphologie von der Blasenfüllung und der damit verbundenen Blasendehnung abhängig ist, sowie einer luminalen, oberflächlichen Deckzellschicht. Die Deckzellschicht besteht ebenfalls aus einer Zelllage und ihre Zellen sind größer als in den anderen Schichten. Teilweise sind diese sogenannten Umbrellazellen multinuklär (Abbildung 1). Zwischen der Intermediärschicht und der Basalzellschicht existieren fließende Übergänge. Unter dem Urothel befindet sich die Lamina propria, eine schmale subepitheliale Bindegewebsschicht (Lüllmann-Rauch, 2012) (Gerhard Feil, 2008).

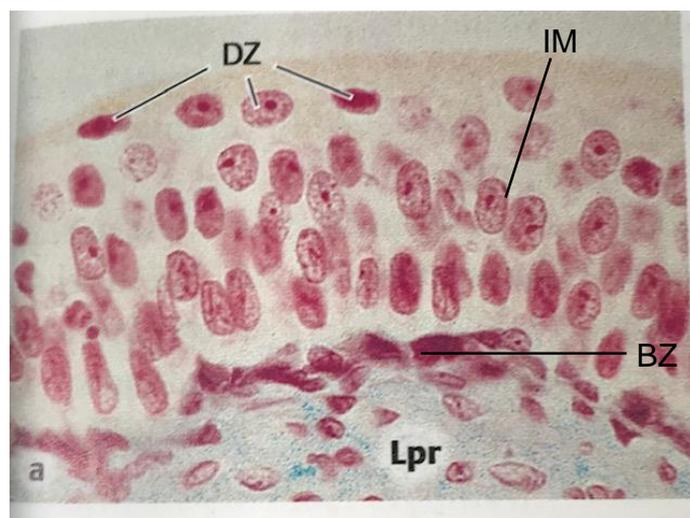


Abbildung 1 Zellschichten des Urothels, DZ = Deckzellen, IM = Intermediärschicht, BZ = Basalzellen, Lpr = Lamina propria, Abbildung verändert nach (Lüllmann-Rauch, 2012)

Die embryonale Urothelentwicklung geht vom Endoderm und Mesoderm der Keimscheibe aus. Aus endodermalem Gewebe entsteht die Harnblase während aus dem Mesoderm Nierenbecken und Harnleiter hervorgehen (Xue-Ru Wu, 1990).

I.2 Physiologische Regeneration des Urothels

Aufgrund der wirkenden Scherkräfte benötigt das Urothel eine besonders hohe Regenerationsfähigkeit. Dies betrifft alle Schichten des Urothels. Die Regeneration der Deckzellschicht geschieht zum einem aus der mitotischen Zellteilung der Deckzellen selbst, sowie aus Zellteilung der Basal- und Intermediärschicht. Vor allem bei Zellverlust überwiegt die Zellneubildung in der Basal- und Intermediärschicht. Die Basal- und Intermediärschicht erneuern sich, indem sie Tochterzellen abgeben, (Nettesheim & Oehlert, 1962). Für das Urothel wird auch der Begriff „Übergangsepithel“ verwendet, was bedeutet, dass alle Zellschichten des Urothels mit der Basallamina in Kontakt stehen, (Puneet Khandelwal, 2009). Bei übersteigenden Zellirritationen wie bspw. durch mechanische Reize oder chronische Entzündungen kommt es zu Atrophie des Urothels. Dabei kommt es zu einer übersteigerten Mitosefähigkeit, die alle Zellschichten betreffen kann. Dies führt zu einer gesteigerten Hyperplasie die hauptsächlich von der Basalschicht ausgeht und in vielen Fällen zu einer Metaplasie führt (Nettesheim & Oehlert, 1962).

I.3 Stammzelleigenschaften

Als Stammzellen werden Körperzellen bezeichnet, die die Eigenschaft besitzen sich in verschiedene Gewebe- oder Zelltypen auszudifferenzieren. Wichtige Merkmale von Stammzellen sind: Fähigkeit zur Selbsterneuerung, langsam laufender Zellzyklus sowie ein niedrigerer Differenzierungsgrad. Wenn sich eine Stammzelle teilt, entstehen meist zwei ungleiche Tochterzellen. So behält eine Tochterzelle die Eigenschaft zur Selbsterneuerung und verbleibt als Stammzelle, während die andere Tochterzelle zur Progenitorzelle (Vorläuferzelle) einer Population wird, welche sich stark vermehrt (Lüllmann-Rauch, 2012). Es werden embryonale und adulte Stammzellen unterschieden. Von der Potenz der Stammzelle hängt die Differenzierungsfähigkeit ab.

Embryonale Stammzellen sind entweder totipotent oder pluripotent und können sich in jegliches Gewebe ausdifferenzieren. Während totipotente Stammzellen einen ganzen Organismus ausbilden können, haben pluripotene die Fähigkeit zur Plazentausbildung verloren. Embryonale Stammzellen können sich in alle drei Keimblätter differenzieren: Ektoderm, Mesoderm und Endoderm (DeSaix, 2013). Adulte Stammzellen sind multipotent und können sich zu einem Gewebetyp spezialisieren. Sie können sich nicht mehr in jedes beliebige Gewebe differenzieren sowie sich nicht in alle drei Keimblätter differenzieren. Es können aus vielen Geweben des menschlichen Körpers adulte Stammzellen gewonnen werden. Sie sind trotz ihrer Eigenschaften eingeschränkt in ihrer Differenzierung sowie in ihrer Proliferationsfähigkeit (Shamblott M, 2001).

I.4 Immunhistologische urotheliale Marker

Die Zellspezifischen Prozesse im Urothel sind komplex und es gibt viele urotheliale Marker, vor allem bei entzündlichen Prozessen oder dem Urothelkarzinom. Hier werden ein paar Beispiele für Marker, welche eine wichtige Funktion im Urothel haben, kurz erläutert. Zu den gebräuchlichsten Markern zum Nachweis urothelialen Ursprungs von malignen Epithelzellen in der Harntraktzytologie zählen beispielsweise GATA3, CK7, CK20 und weitere (Vlajnic, 2022).

Uroplakine sind urothelspezifische Proteine, welche sich in der Zellmembran im Nierenbecken, Harnleiter und Harnblase befinden. Sie sind verantwortlich für die Struktur der Urothelzellen und verhelfen den Zellen so zu ihrer mechanischen und chemischen Widerstandsfähigkeit (Wu XR, 1995). Diese spezifischen Transmembranproteine befinden sich vor allem in der Deckzellenschicht des Urothels. Bei Verlust oder Schädigung des Uroplakins verliert sich auch die widerstandsfähige Barriere (Liao, 2018).

GATA 3 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsprotein, welches unter anderem mit CK 7, Uroplakin II und p40 bei Urothelkarzinomen gemeinsam exprimiert wird. Dieser ist bei der Diagnostik von Urothelkarzinomen relevant (M. Z. Leivo, 2016).

Cytokeratine (CK) sind Proteine welche intrazellulären Filamente bilden. Sie sind maßgeblich für die Stabilität des Zytoskeletts einer Zelle. Manche Cytokeratine werden im Urothel mit schweren Entzündungen und Dysplasien in Zusammenhang gebracht. Hierzu gehören beispielsweise CK 5, CK 7, CK 14, CK 17, CK 20 und weitere (Chan, Volkmer, & Weissman, 2010) (Moll R, 1992) (Soyuer, 2009). CK 7 wird in Urothelkarzinomen praktisch immer (87–100 %) exprimiert (Vlajnic, 2022).

I.5 Tissue Engineering

Tissue Engineering basiert auf dem Einsatz von in vitro hergestellten Geweben und bietet sich als eine mögliche, zukünftige Therapie in der Urologie für die Behandlung von Patienten mit funktionellen Störungen der Harnblase oder auch für Patienten mit Notwendigkeit der Harnblasenentfernung bei muskelinvasivem Urothelkarzinom an. Tissue Engineering ist eine vielversprechende Technik beispielsweise für die Entwicklung von biologischen Ersatzstoffen, mit denen eine Gewebefunktion aufrechterhalten, wiederhergestellt oder eine Verbesserung erreicht werden kann (Langer R, 1993) und gewinnt daher zunehmend an Bedeutung.

Beim Tissue Engineering sind die Prozesse der Zellproliferation, Differenzierung und Zell-Matrix-Interaktion von großer Bedeutung. Die Herstellung von organspezifischem Material aus menschlichen Geweben, welche autologe, somatische Stammzeleigenschaften aufweisen ist ein erheblicher Fortschritt für die rekonstruktive therapeutische Chirurgie. In der Urologie zielt Tissue Engineering auf die Rekonstruktion der Harnwege ab. Hierzu kann das aus pluripotenten Zellen erzeugte, funktionell und anatomisch gleiche Gewebe verwendet werden (Moad, 2013). Gegenwärtig genutzte Verfahren zur Isolation von Stammzellen wie die Entnahme von mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark oder das Explantieren von Urothelzellen sind invasive Methoden. Daher ist es wichtig neue Zellquellen und nicht invasive Techniken zu Gewinnung von Stammzellen zu finden. Dabei würde sich die Gewinnung durch Blasenspülungen oder die Entnahme von Stammzellen aus der Plazenta besonders eignen (Feil, 2011).

I.6 Ausgewählte Marker

I.6.1 DeltaNp63

DeltaNp63 ist ein Tumorsuppressorprotein, welches zu der Gruppe der Transkriptionsfaktoren p53 gehört. Zu dieser Gruppe gehören mindestens sechs weitere. Das Protein p53 wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Efeyan A, 2007). Es reguliert den Zellzyklus, indem es den Übertritt von der G1-Phase in die S-Phase reguliert und DNA-Reparaturen ermöglicht. Wenn die Zelle zu viel Stress erleidet und DNA-Schäden sich anhäufen, leitet das p53-Protein die Apoptose ein. Das p53 Protein ist ubiquitär im menschlichen Körper zu finden (Vassilev LT, 2004).

DeltaNp63 ist die verkürzte Isoform von p63, bei der die NH₂-Terminale entfällt. Die DeltaNp63-Isoform ist ein Marker, welcher unter anderem auch spezifisch für Basalepithelzellen ist. Es wird für die Entwicklung mehrerer Epithelgewebe wie beispielsweise Prostatagewebe aber auch Harnblasengewebe benötigt (Pignon JC, 2013). DeltaNp63 wird auch in Zusammenhang mit der Induktion und Aufrechterhaltung von gewissen Neoplasien gebracht, wie beispielsweise Brustkrebs oder dem Adenokarzinom der Lunge (Nekulova, 2016) (Napoli, 2022).

Basierend auf vorangegangener Forschung (Vlajnic, 2022), könnte DeltaNp63 ein geeigneter Biomarker sein, um die Differenzierung und das Vorkommen relevanter Zellen in den unterschiedlichen Schichten des Urothels zu untersuchen. Aus diesem Grund wird er in dieser Arbeit verwendet.

I.6.2 KLF-5

KLF (Krüppel-like Faktor) ist ein Protein, welches sich im Zellkern aller Zellen befindet und an der epidermalen Transkription bzw. Zellproliferation beteiligt ist (Gao Y, 2015). Dieses Protein gehört zu einer Unterfamilie der Zinkfingerproteine, welche in 17 verschiedene KLFs codieren.

KLF-5 ist an vielen epithelialen Zellprozessen beteiligt, wie der Apoptose, der Proliferation und der zellvermittelten Antwort auf Gewebeverletzungen sowie der Entwicklung und Differenzierung (Nandan, 2009). Dieses Protein hat eine hochrangige

Bedeutung für Urothelzellen. KLF-5 wird früh in der Entwicklung von Blasen-Urothelzellen aktiviert und es bindet an einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren. Somit steuert KLF-5 über die Aktivierung von Epithel-like transcription factor (ELF-3), welches von Peroxisomen proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR- γ) aktiviert wird, die Wachstumsfaktoren TGF- β und EGF-R, und damit die Urothelzellproliferation.

Die Urothelzelldifferenzierung wird von KLF-5 ebenfalls mittels ELF-3 gesteuert. ELF-3 spielt für die Urothelzelldifferenzierung als auch -proliferation eine relevante Rolle und balanciert diese beiden Prozesse aus. KLF-5 regelt die Faktoren PPAR- γ , ELF-3 und GRHL3 direkt, oder über eine Kaskade von Transkriptionsfaktoren, beginnend bei PPAR- γ (Al-Kurdi, 2017).

Dieser Marker ist noch sehr unerforscht und wurde auf Grund der o.g. Eigenschaften für die vorliegende Arbeit als interessanter Marker ausgewählt.

I.6.3 Uroplakin II

Dieses Protein ist eines von fünf spezifischen Proteinen des Urothels. Uroplakin II wird auf dem Chromosom 11q23.3 exprimiert (Fagerberg, 2014). Es wird von KLF-5 über mehrere Transkriptionsfaktoren zur Urothelzelldifferenzierung aktiviert (Al-Kurdi, 2017).

Es ist ein integrales Membranprotein der asymmetrischen (J Yu, 1994) Einheitsmembran, welches bei Säugetieren die apikale Urothelschicht stärkt und somit an der Permeabilitätsfunktion beteiligt ist (Wu XR, 1995). Diese asymmetrische Einheitsmembran verhindert bei Dehnung der Blase einen Zellbruch. Uroplakin II wird in dieser Arbeit als Urothelspezifischer Marker der Deckzellschicht als Gegenmarker für differenziertes Urothel zu KLF-5 und DeltaNp63 verwendet (Negrete HO & Berg J, 1996).

I.7 Fragestellung

Die Analyse dieser zwei ausgewählten Marker DeltaNp63 und KLF-5 soll Aufschluss darüber geben, welche Bereiche des Urothelgewebes proliferierende Zellen mit Stammzeleigenschaften aufweisen. Darüber hinaus wird Uroplakin II als Marker

verwendet, um die bereits bekannte Verteilung der Uroplakin II exprimierenden Deckschichtzellen zu bestätigen.

In der vorliegenden Arbeit sollen die nachfolgenden Fragestellungen beantwortet werden:

- Lassen sich durch immunhistochemische Färbungen die drei Zellmarker im Urothelgewebe nachweisen?
- Wie verteilen sich Zellen mit DeltaNp63- bzw. KLF-5-Eigenschaften in den unterschiedlichen Schichten des Urothels? Stimmt die Verteilung von Uroplakin II mit der Erwartung überein?
- Lassen sich durch die Ergebnisse klinische Implikationen für Diagnostik, Therapie und Prognostik ableiten?

II Material und Methoden

II.1 Proben / Patienten dieser Studie

Diese Studie umfasst Proben von 55 ausgewählten Patienten, die sich im Zeitraum von 2008 bis 2014 in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen einer radikalen Cystektomie (CX) aufgrund einer funktionellen Störung oder einem onkogenen Geschehen, unterzogen haben. Das Kollektiv wurde ohne systematische Vorgehensweise konsekutiv nach den unter Punkt II.1.1 und II.1.2 aufgeführten Kriterien ausgewählt.

Die aus den Akten retrospektiv zusammengetragenen Daten und Befunde eines jeden Patienten wurden in Microsoft Excel 2019 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) hinterlegt. Diese Daten und Befund umfassen u.a. Geschlecht, Alter zu Operationszeitpunkt, präoperativ histologisch /pathologisch gesichertes Karzinom oder funktionellen Erkrankung der Harnblase, sowie mögliche Einflussfaktoren wie bspw. Diabetes mellitus, Adipositas, Schilddrüsenerkrankungen und rezidivierende Harnwegsinfekte. Des Weiteren wurden Zigarettenkonsum und der Beruf der Patienten miterfasst. Auch Frühinstallationen wie Mitomycin sind berücksichtigt.

Es erfolgte eine Verblindung der Daten, indem jedem einzelnen Gewebeschnitt eine Nummer zugewiesen wurde. Bei drei Patienten ist kein gesichertes Harnblasenkarzinom vorhanden. Zwei dieser Zystektomien erfolgten bei diesen Patienten im Rahmen einer Prostataektomie. Eine erfolgte bei einer weiblichen Patientin aufgrund rezidivierender Zystitiden welche therapieresistent waren. Postoperativ wurde das genauere TNM Stadium festgelegt, sowie die histopathologische Auswertung, auf welcher die Basis das Urothelkarzinom entstanden ist. Die Patienten befanden sich, nach histopathologischer Auswertung in folgenden TNM Stadien (Tabelle 1). Hierbei ist zu beachten, dass Patienten ohne Tumorbefund in Bezug auf das Urothel als T0 gewertet werden. Von den drei Patienten mit der TNM-Klassifikation T0, war ein Patient aufgrund eines Prostatakarzinoms in Behandlung, das mit entfernte Urothel war im Befund allerdings unauffällig. Bei zwei weiteren Patienten wurde bei einem ein Blasendivertikel und bei dem anderen Patienten chronische Zystiden diagnostiziert. Bei diesen Patienten wird ebenfalls die TNM-Klassifikation als T0 gewertet.

Tabelle 1 Detaillierte TNM Klassifikation der Patienten

pT-Stadium	Anzahl
T0	3
Ta	2
Tis	0
T1	5
T2a	14
T2b	3
T3a	12
T3b	11
T4a	5
T4b	0
	n=55

Tabelle 2 Übersicht der Grading-Einteilung der Tumorzellen

Grading	Anzahl
G0	5
G1	4
G2	16
G3	28
G4	2
	n=55

Das Durchschnittsalter beläuft sich auf 67,5 Jahre (Median: 69 Jahre), wobei das Alter des ältesten Patienten zum Operationszeitpunkt 82 Jahre und das des jüngsten Patienten 46 Jahre betrug.

II.1.1 Einschlusskriterien

- Gewebe von Patienten mit Indikation zur radikalen Zystektomie
- Paraffinblöcke wurden gemäß der routinemäßigen, histopathologischen Aufarbeitung verarbeitet

- Vorliegende Zustimmung zur Gewebeasservierung

II.1.2 Ausschlusskriterien

- Fehlende Verfügbarkeit der Paraffinblöcke.
- Fehlende Möglichkeit zur Beurteilung des Urothelgewebes, beispielsweise wenn nicht genug Urothelgewebe mikroskopisch erkennbar war oder zu viel ulzeriertem sowie ödematösen Gewebe vorhanden war.
- Fehlende Dokumentation wie beispielsweise histopathologischer Status oder OP-Indikation.
- Entzug der Zustimmung des Patienten zum Biobanking nach Asservierung.

Von ursprünglich 67 ausgewählten Patienten schieden so 12 Patienten aufgrund dieser Ausschlusskriterien dieser Studie aus. Die Proben von 55 Patienten werden für diese Arbeit herangezogen.

II.2 Ethikvotum

Vor der Operation wurde das Einverständnis der Patienten zur wissenschaftlichen Verwendung der Gewebeproben eingeholt. Der Ethikantrag 551/2018BO2, vom 23.07.2018 mit Bezug auf die bestehende Biodatenbank (379/2010BO2), wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Universität Tübingen am 15.08.2018 bewilligt.

II.3 Gewebeaufbereitung des Operationspräparates und Weiterverarbeitung zu Kleinflächenschnitten

Es erfolgt die Entfernung von Corpus (Abbildung 2). Dann wird die Blase ventral eröffnet und ein Stück makroskopisch benignes aussehendes Gewebe, (ca. 1x0,4cm breit und ein 1cm tief) möglichst tumorfern, entnommen. Anschließend wird dieses Gewebe in Formalin (SAV-Formaldehydlösung neutral gepuffert 4,5%, SAV-LP, Flintsbach) in einem lichtgeschützten Behältnis aufbewahrt. Die fixierten Gewebeproben werden nach

zwei Tagen im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen durch einen Automaten entwässert und paraffiniert.

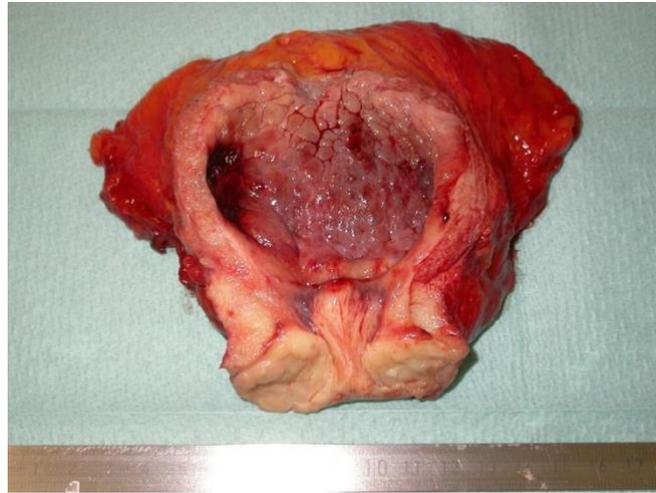


Abbildung 2: Präparat einer Harnblase mit Harnblasenkarzinom (Kühs, 2018)

Nach der Dehydrierung des Gewebes folgt das Einbetten der Gewebeproben in Paraffin mit Hilfe von speziellen Gewebe-Einbettkassetten. Pro Paraffinblock werden anschließend mit einem Rotationsmikrotom (Abbildung 3: Mikrotom Leica RM 2235) jeweils vier 5 µm dicke Flächenschnitte angefertigt.



Abbildung 3: Mikrotom Leica RM 2235

Die Schnitte werden in einem Wasserbad bei 48°C gestreckt und auf einen Adhäsionsobjektträger Superfrost plus (Langenbrink, Emmendingen) der Größe 26x76mm aufgezogen und im Wärmeschrank (Binder, Tuttlingen) bei 37°C über Nacht getrocknet.

Anschließend wird eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) durchgeführt.

II.4 Immunhistochemie

II.4.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Untersuchung von Geweben, welche bestimmte Zell- und Gewebsstrukturen durch gezielte Färbung von Antigenen darstellt. Die Methode der Immunhistochemie (IHC) beruht auf dem Nachweis von speziellen Antigenen (AG), mit Hilfe von Antikörpern (AK), welche spezifisch an Epitope des AGs binden. Durch dieses Verfahren werden spezifische AG/AK Bindungen, durch Kopplung an Enzymen, sichtbar gemacht. Es wird zwischen einer indirekten und einer direkten Immunhistochemie unterschieden. Bei der hier verwendeten indirekten Immunfluoreszenz (IIF) werden die primären, an das Antigen gebundenen Antikörper durch sekundäre, markierte Antikörper erkannt (Renz, 2009). Im ersten Schritt wird ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf die zu untersuchenden Zellen aufgebracht. Danach wird in einem zweiten Schritt ein weiterer Antikörper aufgetragen, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. Dieser sog. Sekundärantikörper, ist hier entweder direkt mit einem Enzym oder Biotin gekoppelt. Bei direkter Konjugation des AK mit dem Enzym entsteht die Farbe durch Umsatz eines Substrats der zur Färbung führt. Bei der Verwendung von biotinylierten AK kommt die Avidin Biotin Methode zum Einsatz, die auf einer hohen Affinität von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) und Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin basiert. Sowohl Streptavidin als auch Avidin besitzen jeweils vier Bindungsstellen an die Biotin binden kann und sind ihrerseits wiederum enzymgekoppelt (Boenisch, 2003). Durch anschließende Zugabe eines Substrates kommt es wiederum zur Farbentstehung durch einen sichtbaren Farbstoff. Das verwendete Enzym ist dabei zumeist Peroxidase, welche durch Katalyse von H₂O₂ Sauerstoffradikale freigesetzt, welche wiederum mit einem zugegebenen Farbstoff interagieren und so zu einer Färbung führen.

Schematische Reaktionskette:

Antigen + Primärantikörper + biotinylierter Sekundärantikörper + Streptavidin/Avidin mit Enzym + Substrat/Chromogen → Farbe (Hubert Rehm, 1996).

II.4.2 Verwendete Materialien

II.4.2.1 Verwendete Marker/Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Antikörper beziehungsweise Marker

Antikörper	Klon	Konzentration	Hersteller
KLF5	Bioss bs-2385R	1:800	Bioss Freiburg, Deutschland
Delta Np63 Antibody	ab167612	1:2000	Abcam Bristol, England
Anti-Uroplakin II Antibody	ab 213655	1:2000	Abcam Bristol, England

II.4.2.2 Verwendete Puffer

Citratpuffer, pH 6,0

Material: Citronensäure-Monohydrat, Tri-Natrium-Dihydrat, Aqua dest.

Stammlösung A: 10,6 g Citronensäure in 500 ml Aqua dest. lösen

Stammlösung B: 14,7g Natriumcitrat in 500 ml Aqua dest. lösen

Gebrauchslösung: 9 ml Stammpuffer A + 41 ml Stammpuffer B + 450 ml Aqua dest.

Tris-Puffer, pH 7,6

Stammlösung A: Tris 1 molar (121,14 g)

Material: TRIZMA BASE (Fa. Sigma), 32% HCL (Fa. Merck), Aqua dest.

Stammlösung B: NaCl 3 molar (175,32 g)

Material: Natriumchlorid (Fa. Merck), Aqua dest.

Gebrauchslösung: 100 ml Stammlösung A + 50 ml Stammlösung B auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen.

TBST-Tween 20; 0,1%

Material: Tri-gepufferte Kochsalzlösung (siehe oben), Tween 20 (Fa. Dako; S 1966)

Gebrauchslösung: 1L angestezte Tris Gebrauchslösung + 1ml Tween 20

II.4.2.3 Verwendete Kits

Tabelle 4 Für die Herstellung der Schnitte verwendete Kits

Kit	Artikelnummer	Hersteller
VECTASTAIN Elite ABC-HRP Peroxidase Kit,	VEC-PK-6100	Vector Laboratories, Eching, Deutschland
ImmPACT DAB Substrate, Peroxidase (HRP)	VEC-SK-4105	Vector Laboratories, Eching, Deutschland
DAB-Substrate Kit, Peroxidase (HRP), with Nickel, (3,3-diaminobenzidine)	VEC-SK-4100	Vector Laboratories, Eching, Deutschland
VectaMount (Vector/Linaris)	VEC-H-5700	Vector Laboratories, Eching, Deutschland

II.4.3 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Zu Beginn der Färbung, wird zunächst das Paraffin abgeschmolzen indem die Schnitte 30 Minuten bei 58°C im Wärmeschrank (ED 35, WTB Binder/Tuttlingen) erwärmt und anschließend in einer Xylol-Lösung 1x10 Minuten und dann 2x5 Minuten entparaffiniert werden. Durch eine absteigende Alkoholreihe mit jeweils 2x5 Minuten 100% Ethanol, 2x5 min 96% Ethanol und 1x5 Minuten mit 70% Ethanol erfolgt die Rehydrierung des Gewebes.

Um eine falsch positive Färbung durch endogene Peroxidase im Gewebe zu eliminieren, werden die Schnitte für 30 Minuten in 3% Wasserstoffperoxid (H₂O₂, Sigma) in Aqua dest. inkubiert. Danach folgt ein Waschschritt für 5 Minuten in TBST (triss buffered saline, 0,1% Tween 20, pH 7,6).

In einem 10mM Citrat Puffer pH 6,0 (18ml Citronensäure, 82ml Trinatriumcitrat) werden die Schnitte in einer Färbeküvette in einer Mikrowelle (Moulinex) 3x5 Minuten gekocht

und dann 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Dies ist erforderlich, um die bei der Formalinfixierung entstandenen Aldehydvernetzungen zu demaskieren und die Antigene für die Antikörper wieder zugänglich zu machen. Anschließend werden die Schnitte 2x5 Minuten in TBST gewaschen. Danach werden die Schnitte in einer feuchten Kammer weiterbearbeitet. Mit einem saugfähigen Tuch wird die Umgebung des Schnitts getrocknet und um das Präparat mit einem liquid blocker (Dako pen, Dako) eine Barriere gezogen, damit die aufgetragenen Lösungen sicher auf dem Präparat bleiben und keine Austrocknungsartefakte entstehen können.

Dann erfolgt ein Blocking mit Avidin/Biotin Kid -Kit SP-2001 (Vector Linaris). Es werden jeweils 3 Tropfen Avidin Solution auf jeden Objektträger aufgetragen. Anschließend zur guten Durchmischung werden die Objektträger geschwenkt und 15 Minuten zur Inkubation ruhen gelassen. Dann 2x5 Minuten in TBST waschen. Dasselbe erfolgt mit Biotin-Solution, auch sie wird 2x5 Minuten in TBST gewaschen. Mit diesem Kit wird im Gewebe enthaltenes, endogenes Biotin abgebunden und kann kein falsch positives Signal mehr erzeugen.

Nun folgte die immunhistochemische Färbung mit der Avidin/Biotin Methode des Vectastain Elite ABC/HRP-Kit (PK 6200 universal, Vector Linaris) nach Herstellerangaben.

Zunächst wird auf jeden Objektträger eine Blocklösung aufgetragen, um unspezifische Hintergrundfärbung zu blockieren. Dazu wurde auf jeden Schnitt 200 µl Blocklösung aufgetragen und 30 Minuten inkubiert. Im Fall des Primärantikörpers KLF5 Antibody und Anti p40 – Delta Np63 Antibody besteht die Blocklösung aus 1,5% Normalserum horse in einem proteinhaltigen Verdünnungsmedium Dako Diluent S0809 (Dako, Glostrup, Denmark). Im Fall von Uroplakin 2 Antibody wird nur das proteinhaltige Verdünnungsmedium aufgetragen.

Die Blocklösung wird nun abgekippt und der verdünnte Antikörper (siehe Tabelle 3; anti-KLF5 und anti-p40-DeltaNp53 verdünnt in Blocklösung, anti-Uroplakin II in Dako Diluent) aufgetragen. Die mitgeführte Negativkontrolle je Färbegang wird nur mit der entsprechenden Blocklösung inkubiert und enthält keinen Antikörper. Die Objektträger werden bei 4°C über Nacht im Kühlschrank inkubiert (ca. 19 h).

Am nächsten Tag werden die Proben aus dem Kühlschrank entnommen und die Negativprobe von den anderen Proben getrennt 3x5 Minuten in TBST gewaschen. Nun werden alle Proben, auch die Negativkontrolle, gleichbehandelt. Zunächst werden der biotinylierte Sekundärantikörper Mouse/Rabbit IgG aus dem Kit Vectastain Elite ABC/HRP Konjugat in der Verdünnung von 1:200 mit dem Verdünnungsmedium Dako Diluent hergestellt. Jeweils 200 µl werden auf einen Objektträger pipettiert und für 30 Minuten in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit, 30 Minuten vor dem Auftragen, wird der HRP-enzymgekoppelte ABC-Komplex nach Herstellerangaben in TBS hergestellt. Dazu wurden 20 µl Lösung A und 20 µl Lösung B aus dem Vectastain Kit in 1000 ml TBS gemischt und 30 Minuten auf dem Taumler bewegt, damit die Komponenten aneinander binden zu können. Der Avidin-Biotin-Substratkomplex bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper und wird durch das Farbsubstrat DAB (3,3'-Diaminobenzidin) visualisiert. Im Fall vom KLF5 und Anti-p40 wurde der Testkit ImmPACT™DAB (Vector/Linaris) für 2 Minuten und bei Uroplakin DAB SK-4100 (Vector/Linaris) für 5 Minuten inkubiert. Die Präparate werden sofort nach Erreichen der Farbintensität in Aqua. dest. abgewaschen und anschließend für 45 Sekunden in Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modifikation, Dako) gefärbt. Anschließend wird durch Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 7 Minuten ein Farbumschlag erzeugt, womit man eine blaue Färbung der Zellkerne als Gegenfärbung erhält. Die Dehydrierung der Schnitte erfolgt durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Danach werden die Schnitte permanent mit VectaMount (Vector/Linaris) eingedeckt.

Nach der erfolgreichen Färbung wird mit einem Mikroskop (Zeiss Axio LabA1), welches mit einer Kamera ausgestattet ist, von jedem einzelnen Schnitt ein Bild mit der Auflösung 1200x1600 Pixel für die anschließende Analyse angefertigt.

II.5 Erfassung und Interpretation des Expressionsverhaltens

Jeder Gewebeschnitt wird mittels eines Zeiss Universal-Lichtmikroskop (Zeiss Universal, Carl Zeiss, Jena) bei konstanter Lichtintensität und 160-facher Vergrößerung beurteilt. Zur genaueren Betrachtung wird teilweise das Objektiv mit 400-facher

Vergrößerung eingesetzt. Dabei wird die Entscheidung getroffen, ob die jeweilige immunhistochemische Färbung erfolgreich war. Dies geschieht auf Basis der oben erwähnten Negativkontrolle und einer subjektiven Einschätzung des Färbeergebnisses, indem zu stark oder zu schwach angefärbte Präparate ausgeschlossen werden. Zusätzlich wird anhand der oben aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien entschieden, ob das Präparat mit in die Auswertung aufgenommen wird.

Die Auswertung erfolgt durch eine Bewertung der Färbeintensität mittels etablierter Scoring-Systeme, hier mit dem H-Score ((McCarty KS Jr, 1985), (Djaballah, 2012)). Zunächst wird eine Kalibrationsskala der Farbintensitäten definiert. Hierzu werden in einer ersten Durchsicht der Proben, die auftretenden Intensitäten beurteilt und repräsentative Zellen für die jeweilige Intensitätsstufe ausgewählt. Dies erfolgte für jeden Marker.

Die Skala wird in Farbintensitätsstufen von 0-3, also vier verschiedenen Farbintensitäten von ‚gar nicht‘ bis ‚stark gefärbte Zelle‘ eingeteilt (siehe Abbildung 5).

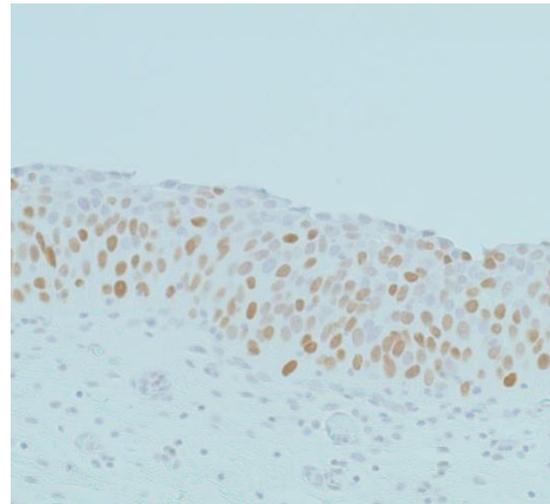
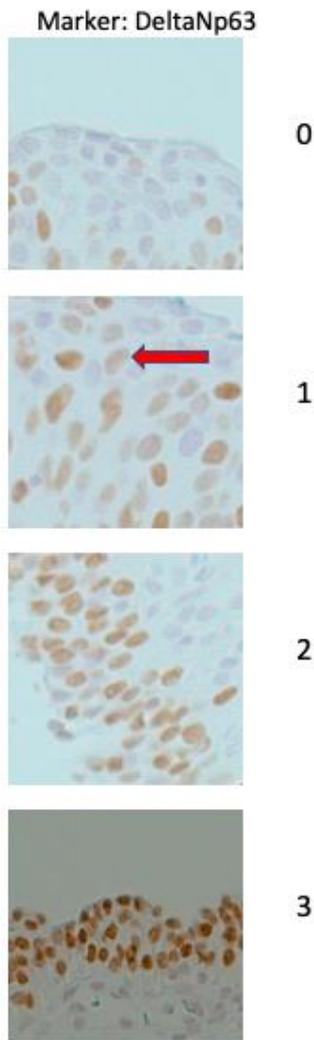


Abbildung 5: Ausschnitt aus dem Urothelgewebe, das mit DeltaNp63 angefärbt wurde.

Abbildung 4: Kalibrationsskala am Beispiel von DeltaNp63.
Der rote Pfeil zeigt die für den Färbegrad relevante Zelle an.

Dann wird jeder Objektträger anhand dieser Skalen beurteilt bzw. ausgewertet. Die Auswertung geschieht anonymisiert und verblindet. Die Verblindung erfolgt dadurch, dass jedem einzelnen Gewebeschnitt eine Nummer zugewiesen wird. Dadurch können bei der Beurteilung keinerlei Rückschlüsse auf persönliche Daten, klinisch-pathologische oder diagnostische Parameter des Patienten gezogen werden.

Nach Auswertung der Schnitte kann eine eindeutige Zuordnung anhand dieser Nummer in der zuvor aufgestellten Datenerfassungstabelle durchgeführt werden.

Für die Dokumentation und um die Auswertung am PC zu ermöglichen, wird durch das Mikroskop von jedem Objektträger ein Foto erstellt.

Für jede Farbtintensität wird versucht die jeweils in dieser Intensität eingefärbten Zellen zu zählen. Wie in Abschnitt I.1 beschrieben, lässt sich das Urothel in verschiedene Gewebeschichten einteilen. Analog wurde für die Auswertung entschieden, die Zählung für diese drei Schichten durchzuführen. Es handelt sich dabei um die jeweils etwa eine Zelllage dicke Basal- und Luminalschicht und die aus mehreren Zelllagen bestehende mittlere Intermediärschicht. Das entspricht einer quantitativen Einteilung von etwa 15 % / 70 % / 15 %, wobei sich bei der Auswertung an der vorgegebenen Struktur der Schichten orientiert wurde, und nicht an einem festen Prozentsatz. Da der Zählprozess von subjektiver Einschätzung abhängig ist, wurde entschieden jede Probe mindestens zwei Mal, an verschiedenen Tagen, auszuwerten. Wenn die Anzahl der gezählten Zellen in den beiden Auswertungsdurchgängen mehr als 10 Zellen auseinanderliegt, wird ein dritter Durchgang durchgeführt. In Anbetracht von typischen Zellanzahlen in einem Urothelpräparat von ~200 Zellen wird 10 als sinnvoller Grenzwert für einen dritten Durchgang definiert. Im Falle von zwei Messwerten wird der Mittelwert der beiden Werte genommen, daher kann es auch zu nicht-ganzzahligen Werten kommen. Im Fall von drei Messungen wird der Wert mit der höchsten Abweichung eliminiert und der Mittelwert der beiden verbliebenen Werte gebildet. Hierzu werden die Differenzen zwischen den drei Werten gebildet und derjenige Wert mit der größten Abweichung verworfen. Damit soll verhindert werden, dass ein einmaliger Fehler beim Auszählen ins Endergebnis einfließt, da der Wert komplett aus der Auswertung fällt, ohne den Mittelwert nach oben oder unten zu verzerren. In Abbildung 7 wird das Prinzip für zwei und drei Messwerte anschaulich dargestellt.



Abbildung 6: Bestimmung des Mittelwertes bei zwei Werten und im Falle von drei Werten, wenn der Extremste verworfen wird.

Durch die oben beschriebene Zählweise erhält man einen Wert für die Anzahl der Zellen pro Schicht und Farbstufe, der einzelne Messausreißer ignoriert bzw. ausgeglichen wird. Dieser kann in einen prozentualen Anteil umgerechnet werden, indem er mit der Gesamtzahl der Zellen pro Schicht normiert wird.

Um die gesamte Färbeintensität einer Schicht über die verschiedenen Färbegrade hinweg zu bewerten, wird der H-Score verwendet (DETRE, 1995). Dieser gewichtet die Anzahl der Zellen mit der Färbeintensität und gibt einen einzelnen Wert zurück, der die Gesamt-Färbeintensität einer Schicht angibt. Für den H-Score werden die Anzahlen der gefärbten Zellen mit der Stufe ihrer Farbintensität multipliziert und mit der Gesamtzellzahl normiert. Das entspricht der Summe über die gewichteten prozentualen Häufigkeiten und ergibt die Formel:

$$H = \frac{\sum_{i=1}^3 \alpha_i \cdot n_i}{\sum_{i=1}^3 n_i} = \sum_{i=1}^3 \alpha_i \cdot p_i$$

Hier ist mit n_i bzw. p_i die Anzahl bzw. der Prozentsatz der Zellen in der jeweiligen Farbintensität gemeint, die Stufe der Intensität ist mit α_i angegeben und bewegt sich in den Werten [1, 2, 3]. Das bedeutet, dass der Wert für den H-Score zwischen 0 und 300 liegen muss.

Für die drei Marker Uroplakin II, DeltaNp63 und KLF-5 wird jeweils für alle Präparate der H-Score für jede der drei Schichten (luminal, intermediär und basal) bestimmt. Diese Ergebnisse werden in der weiteren Arbeit als die erste Analyse bezeichnet.

II.6 Vertiefende Analyse zur genaueren Lokalisation von Zellen mit Proliferationseigenschaften

Mittels der in Abschnitt II.5 dargelegten ersten Analyse kann eine generelle Verteilung und Lokalisation der jeweiligen Marker beschrieben werden. In diesem Kapitel soll auf die vertiefende Analyse eingegangen werden, die die genauere lokoregionäre Verteilung einzelner Zellen mit Proliferationseigenschaften beschreibt. Diese vertiefende Analyse

wurde durchgeführt nachdem durch die erste Analyse aus Abschnitt II.5 ein erstes Verständnis über die lokoregionäre Verteilung der Zellen entstanden war. Hierbei soll die Verteilung der mit dem jeweiligen Marker angefärbten Zellen auch innerhalb der oben beschriebenen Schichten erfasst werden und etwaige Strukturen und Muster deskriptiv analysiert werden.

Dazu werden die Marker jeweils einzeln betrachtet und es wird ein System überlegt und festgelegt, wie die Auswertung erfolgen soll. Dies erfolgt für jeden Marker auf unterschiedliche Art und Weise.

II.6.1 Uroplakin II

Es zeigte sich bei der ersten Analyse, dass Uroplakin II positiv angefärbte Zellen, nicht nur in der Luminalschicht des Urothels vorhanden sind. Sondern es wurde festgestellt, dass einzelne Zellen auch in der Intermediärschicht angefärbt wurden. In dieser zweiten Analyse soll das Vorkommen gefärbter Zellen in der Intermediär-Schicht genauer untersucht werden.

Für Uroplakin II erfolgt deswegen eine weitere differenzierte Einteilung der Intermediärschicht, in eine obere (luminale) und eine untere (basale) Hälfte. So ist es möglich den H-Score nicht nur für die gesamte Intermediärschicht wie in der vorangegangenen ersten Analyse, sondern den H-Score auch für die obere und untere Hälfte der Intermediärschicht anzugeben. Zusätzlich wird noch ein Prozentwert bestimmt, der den prozentualen Anteil der Intermediärschicht angibt, die mindestens Uroplakin II angefärbte Zellen der Stufe 1 enthält. Die Hauptfärbung von Uroplakin II in der Intermediärschicht geht von der luminalen Schicht aus, sodass sich ein sogenannter „Vorhang“ von angefärbten Zellen ergibt. Es wird der prozentuale Anteil gefärbter Zellen in der IM-Schicht ausgehend von der luminalen Schicht analysiert. Findet man beispielsweise angefärbte Zellen bis zum oberen Viertel der IM-Schicht, würde dieser Wert mit 25 % angegeben werden, ist die komplette Schicht angefärbt wird der Vorhangwert mit 100 % angegeben.

Dadurch können die Uroplakin II angefärbten Zellen genauer lokalisiert werden und deren Gradient der Expression über die Intermediärschicht hinweg genauer determiniert werden.

II.6.2 DeltaNp63

In der ersten Auswertung des Markers DeltaNp63 ergab sich, dass die meisten Zellen in der basalen Schicht des Urothels, und von dort ausstrahlend auch unterschiedlich weit in der Intermediärschicht aufzufinden waren. Vor allem diese Verteilung in der Intermediärschicht soll weiter untersucht werden.

Aufgrund der sehr inkonsistenten Form und Dicke des Urothels auf dem Objektträger und einigen Lücken bzw. Abrissen verspricht eine weitere Aufteilung der Intermediärschicht in viele Unterschichten sehr fehleranfällig zu sein. Anstatt einzelne Zellen zu zählen, wird entschieden eine Einteilung nach Kategorien vorzunehmen. Für jedes Präparat wird demnach der prozentuale Anteil gefärbter Zellen in der IM-Schicht ausgehend von der basalen Schicht bestimmt. Die Prozent-Stufen werden dazu in 10 % Schritten gewählt. Eine feinere Auflösung der Prozentstufen ist nicht möglich, da die Urotheldicke oft nur wenige Zellschichten beträgt. Deswegen werden dabei eventuell auftretende wellenförmige Verläufe gemittelt.

Im nicht zusammenhängend gefärbten Bereich können einzelne gefärbte Zellen beobachtet werden. Diese werden vom oben beschriebenen Verfahren nicht erfasst und werden daher gesondert erfasst. Es wird die Anzahl der einzelnen gefärbten Zellen im nicht gefärbten Bereich erfasst (Abbildung 7).

Der Grenzverlauf zwischen gefärbten und nichtgefärbten Zellen bildet meist keine horizontale Linie, so dass, wie oben beschrieben, mit dem Mittelwert gearbeitet wird. Darüber hinaus soll dieser Grenzverlauf noch qualitativ beschrieben werden. Hierzu werden die folgenden vier Kategorien

0. Flach
1. Leicht wellig
2. Stark wellig
3. Spitze Ausläufer

bestimmt und die Grenzverläufe entsprechend dieser Kategorien genauer festgehalten.

Als vierte und letzte Untersuchung wird wieder ein prozentualer Anteil der IM-Schicht gewählt, dieses Mal von der basalen Schicht ausgehend. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Untersuchung, wird der gefärbte Anteil der IM-Schicht nicht bis zum

Mittelwert der Ausläufer, sondern bis zu ihren Spitzen angegeben. Dadurch erhält man einen numerischen Eindruck der Welligkeit der Ausläufer des Grenzverlaufes. Im Falle eines flachen Verlaufs sind dieser Messwert und der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen von oben identisch. In Abbildung 7 sind die vier Metriken anschaulich grafisch erläutert.

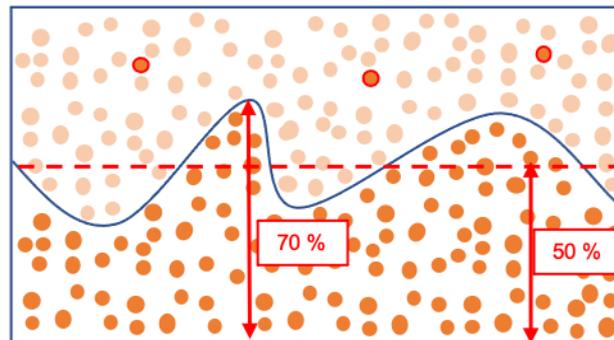


Abbildung 7: Hier werden die in der zweiten Analyse verwendeten DeltaNp63 Metriken schematisch dargestellt:

Der Anteil der gefärbten Schicht (50%), die Anzahl gefärbter Zellen im ungefärbten Bereich (3), der qualitative Verlauf der Färbung (Kategorie 3 - spitze Ausläufer) und der maximal gefärbte Anteil der Spitzen (70 %)

II.6.3 KLF-5

Bei KLF-5 zeigte sich in der ersten Analyse, dass KLF-5 positive Zellen in jeder Zellschicht des Urothels vorhanden waren. Hier soll es darum gehen genauer zu ermitteln, ob stärker gefärbte Zellen in den jeweiligen Schichten vorhanden sind und diese dann genauer zu lokalisieren.

Der in II.5 beschriebene und verwendete H-Score vermischt die Zellen aller Farbintensitäten und berechnet so einen kombinierten Score für jede Schicht. Die Informationen über einzelne stark gefärbte Zellen gehen dabei verloren. Daher wird in dieser Analyse besonders auf die Zellen der Farbeintensität 2 und 3 eingegangen. Hierzu werden die vorherigen Auswertungen aus Kapitel II.5 wiederverwendet. Lediglich die Analyse wird angepasst.

Um die Lokalisation der besonders stark gefärbten Zellen zu bestimmen, werden die Farbintensitäten 0 und 1, sowie 2 und 3 in je eine Kategorie *nicht gefärbt* und *gefärbt*, zusammengefasst. Neben der vertiefenden Analyse der Daten aus der ersten Analyse werden für die zweite Analyserunde aber auch nochmals eigene Daten erhoben. Auch bei

KLF-5 wird sich auf die Intermediärzellschicht des Urothels konzentriert. Für KLF-5 ist die IM-Schicht meist recht gleichmäßig angefärbt und ein Ansatz wie bei den vorigen Markern daher nicht möglich. Es wird entschieden eine qualitative Einordnung der IM-Schicht zu treffen. Die Aussagen

- Basale Hälfte der IM-Schicht stärker angefärbt
- Luminale Hälfte der IM-Schicht stärker angefärbt
- Einzelne stark gefärbte Zellen in der basalen Hälfte
- Einzelne stark gefärbte Zellen in der luminalen Hälfte

werden jeweils unabhängig voneinander gemäß einer binären wahr/falsch-Logik beantwortet. Durch die ersten beiden Punkte lässt sich ein eventueller Unterschied zwischen basaler und luminaler IM-Schicht erkennen. Zusätzlich wird das eventuelle Auftreten von stark gefärbten Zellen in der IM-Schicht mit den beiden letzten Punkten genauer lokalisiert.

II.7 Datenbankerstellung und -verarbeitung

Aus den bereits vorhandenen Patientenakten sind retrospektiv personenbezogene klinische relevante Daten und Befunde erfasst und in eine Excel-Tabelle hinzugefügt worden. Zu diesen Informationen gehören zum einen die unter „Patienten/Proben“ aufgeführten klinisch relevanten Parameter, wie beispielsweise, Alter, Geschlecht und diverse Vorbehandlungen an der Blasenregion. Zum anderen auch Informationen der histopathologisch erfassten Daten wie Nummer, Anzahl, Lokalisation sowie TNM-Klassifikation des Tumorareals. Um eine mikroskopische Auswertung des entnommenen Gewebes zu erhalten, erhielt jede Harnblasenentnahme eine fortlaufende Probennummer. Somit können die Messwerte der oben beschriebenen Analysen, jeder fortlaufenden Nummer zu geordnet und zur Auswertung herangezogen werden. Dies geschieht für beide Stufen der Analyse. Durch die Verwendung der laufenden ID-Nummer ist es möglich Messdaten und Patientendaten voneinander getrennt zu verwalten. Und doch bei Bedarf, die Werte zuzuordnen.

II.8 Datenschutzbestimmungen

Alle persönlichen Patientendaten werden in pseudonymisierter Form, unter strengen Datenschutzauflagen und unter Beachtung des Datenschutzgesetzes erfasst und verarbeitet.

II.9 Verwendete Software

Grafikerstellung: python insbesondere die Analysebibliothek pandas (1.0.0)

Grafikbibliothek und H-Score Berechnung: seaborn (0.10.0)

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

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

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

III Ergebnisse

In einer ersten Analyse wird die Verteilung des H-Scores auf die Urothelschichten für KLF5, DeltaNp63 und Uroplakin II untersucht. Die Ergebnisse dieser ersten Analyse werden in Kapitel III.1 und III.2 dargestellt und erläutert. Basierend auf den Erkenntnissen aus der ersten Analyse, werden die weiterführenden Analysen für jeden einzelnen Marker designt. Die Ergebnisse davon werden in Kapitel III.3 ausgeführt.

III.1 Übersicht H-Score der ersten Analyse

Um die Expressionsmuster von KLF5, DeltaNp63 und Uroplakin II zu analysieren wird der jeweilige H-Score in den Urothelschichten verglichen. Dabei können starke Unterschiede in der Verteilung der drei Marker in den verschiedenen Schichten festgestellt werden. Bei der Expression von Uroplakin II kann eine sukzessive Abnahme in der Expression in den tieferen Schichten des Gewebes gemessen werden. Während der mediane H-Score in der luminalen Schicht noch 269 beträgt und damit in fast allen Zellen die höchste Expression festgestellt werden kann, liegt er in der intermediären Schicht nur noch bei 104 und in der basalen Schicht nur noch bei 5. Im Gegensatz dazu nimmt die Expression von DeltaNp63 in den tieferen Schichten des Gewebes zu. So liegt der mediane H-Score in der luminalen Schicht nur bei 9 und nimmt stark zu in der intermediären Schicht (Median von 276). In der basalen Schicht nimmt der Mediane H-Score nicht mehr zu (Median von 285), allerdings lässt sich eine homogenere Verteilung im Vergleich zur IM-Schicht nachweisen. Die Expression von KLF5 ist sehr homogen zwischen den verschiedenen Schichten. So lag der mediane H-Score in der luminalen, intermediären und basalen Schicht bei 204, 201 und 201 respektive.

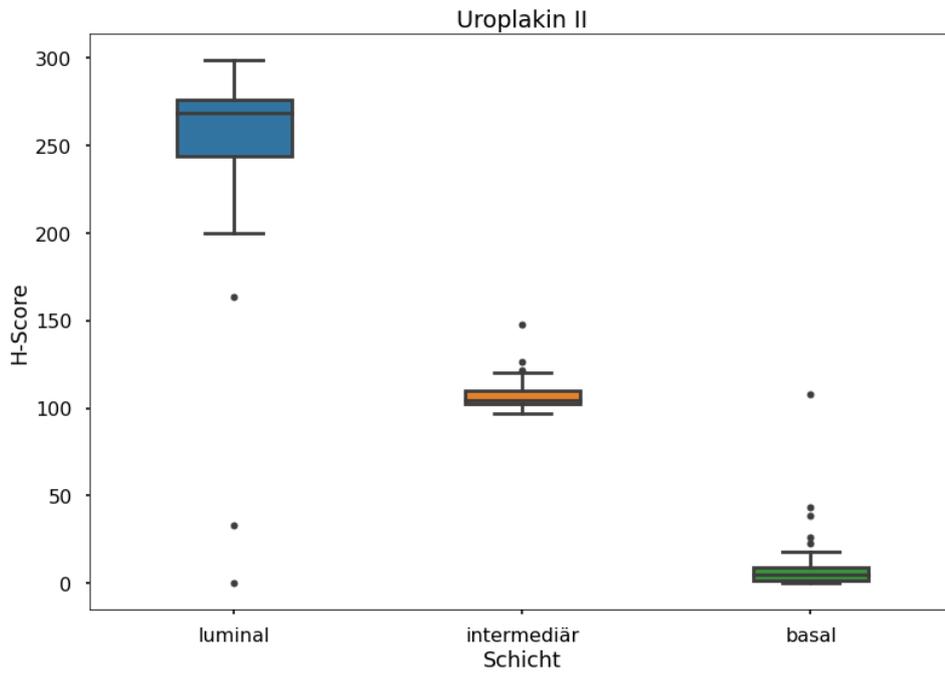


Abbildung 8: Expression von Uroplakin II in den verschiedenen Ebenen des Urothels, dargestellt anhand des H-Scores.

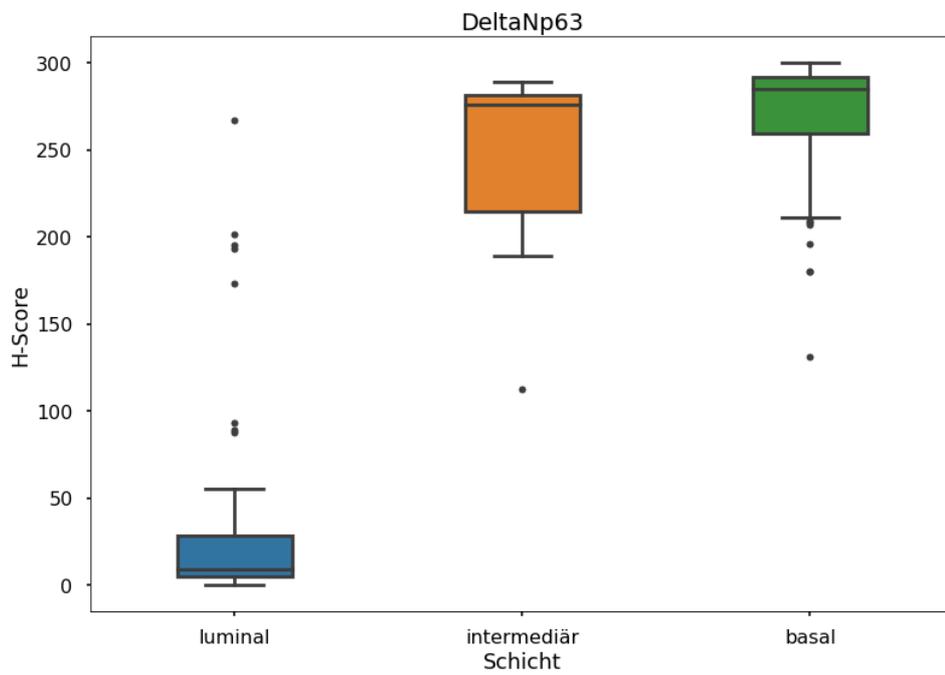


Abbildung 9: Expression von DeltaNp63 in den verschiedenen Ebenen des Urothels, dargestellt anhand des H-Scores.

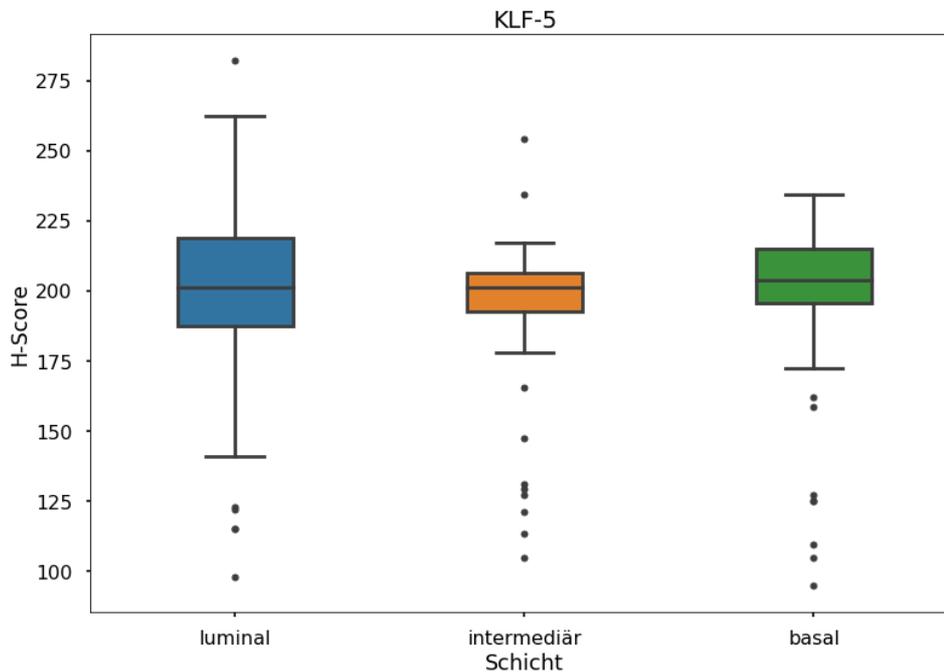


Abbildung 10: Expression von KLF-5 in den verschiedenen Ebenen des Urothels, dargestellt anhand des H-Scores.

III.2 Übersicht Verteilung der Expressionslevel der Marker

III.2.1 Uroplakin II

Wie schon in Abbildung 8 in der Boxplot-Darstellung, sieht man auch in Abbildung 11 in der Darstellung als Histogramm, dass die H-Scores der einzelnen Schichten für Uroplakin II über alle Gewebeproben hinweg gut voneinander abgesetzt sind. Die luminalen Zellschicht ist am stärksten gefärbt, die basale Zellschicht so gut wie gar nicht. Der Färbegrad der intermediären Schicht bewegt sich zwischen dem der beiden vorigen Schichten. Dabei zeigen vor allem die basale und intermediäre Schicht eine sehr homogene Färbung, während die Färbung in der luminalen Schicht heterogener ist. Da die Intermediärschicht deutlich dicker ist als die ein- oder zweilagige Luminal- bzw. Basalschicht, bietet sich die Möglichkeit die lokoregionäre Verteilung der gefärbten Zellen innerhalb dieser Schicht genauer zu untersuchen, um mehr über das Proliferations-

und gegebenenfalls Differentiationsverhalten der Urothelzellen herauszufinden. Daher wird in Kapitel III.3 die Verteilung der gefärbten Zellen in dieser Schicht näher analysiert.

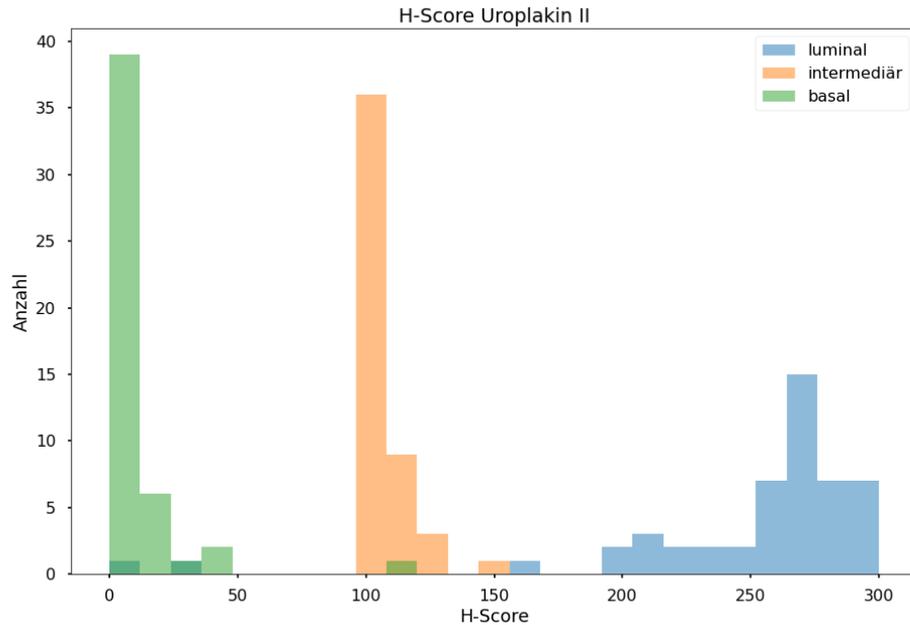


Abbildung 11: Verteilung des H-Scores in den verschiedenen Schichten für Uroplakin

III.2.2 DeltaNp63

In der Verteilung der H-Scores von DeltaNp63, sowohl wie in Abbildung 9 in der Darstellung als Boxplot, als auch in der Darstellung als Histogramm in Abbildung 12, fällt auf, dass die luminalen Zellschicht so gut wie gar nicht gefärbt ist. Die Intermediärschicht als auch die basale Schicht sind allerdings beide sehr gut und nahezu komplett gefärbt, was an den H-Scores zu erkennen ist, die nahe an den maximal möglichen Wert von 300 heranreichen.

Die Intermediärschicht weist dabei eine Verteilung auf, die weiter hin zu kleineren Werten verschoben ist. Dies lässt sich gut an dem längeren unteren Whisker des Boxplots für die Intermediärschicht, im Gegensatz zum basalen Whisker erkennen (Abbildung 9). In der Darstellung als Histogramm ist dies nicht direkt zu erkennen (Abbildung 12). Diese Verteilung „von unten nach oben“ ist gemäß der Funktionsweise von DeltaNp63 zu erwarten, soll aber insbesondere in der IM-Schicht untersucht und genauer dargestellt

werden. Daher wird auch hier in einer vertiefenden Analyse in Kapitel III.3 die genauere Verteilung innerhalb der Intermediärschicht untersucht.

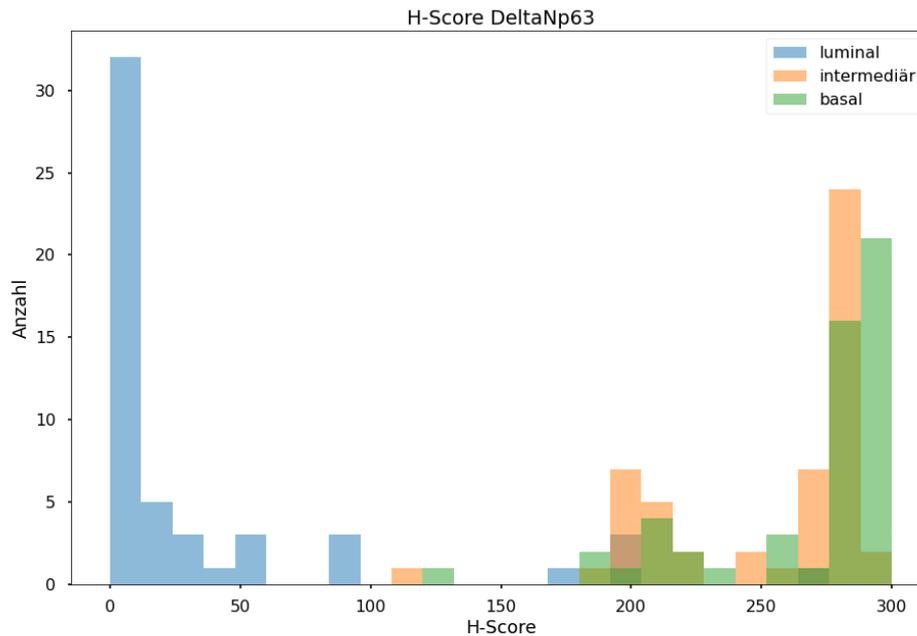


Abbildung 12: Verteilung des H-Scores in den verschiedenen Schichten für DeltaNp63

III.2.3 KLF-5

Auch in der Darstellung als Histogramm zeigt sich kein starker Unterschied in den Expressionsleveln zwischen den verschiedenen Urothelschichten. Generell zeigt sich ein stark homogener H-Score, der bei den meisten Präparaten zwischen 180 und 230 liegt. Die luminal Schicht weist dabei eine leicht heterogene Verteilung auf, die Verteilung der IM-Schicht ist am schärfsten definiert. Analog zu den beiden oben beschriebenen Markern ist eine vertiefende Analyse der IM-Schicht nötig, die auch die Färbeverläufe und Strukturen innerhalb der Intermediärschicht untersucht. Diese Analyse und deren Ergebnisse werden im folgenden Kapitel beschrieben.

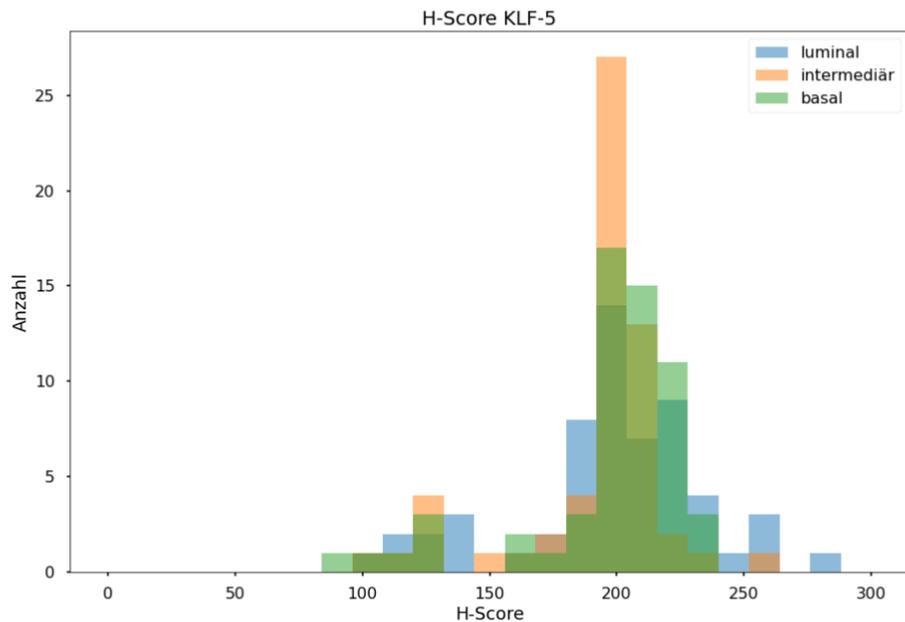


Abbildung 13: Verteilung des H-Scores in den verschiedenen Schichten für klf-5

III.3 Übersicht Ergebnisse vertiefende Analyse

Im vorangegangenen Kapitel wurden die Anzahlen von Zellen in den verschiedenen Färbestufen (0-3) in den drei Schichten (luminal, intermediär und basal) ermittelt und deren Verteilung dargestellt. Eine Untersuchung der genaueren Verteilungen der markierten Zellen innerhalb der Schichten wurde bisher nicht betrachtet. Diese Analyse wird in diesem Kapitel behandelt. Da sowohl die luminale als auch die basale Schicht nur aus 1-2 Zellschichten bestehen, ist hier eine Untersuchung der Struktur dieser Schichten wenig aussagekräftig. Das folgende Kapitel fokussiert sich daher auf die Untersuchung der Färbestrukturen, bzw. der lokoregionären Verteilung der jeweiligen Marker ausschließlich in der Intermediärschicht.

III.3.1 Uroplakin II

Wie in den vorangegangenen Kapiteln aufgezeigt wurde, färbt Uroplakin II hauptsächlich die luminale Schicht des Urothels an. Die intermediäre Schicht ist deutlich weniger gefärbt (H-Scores etwa im Bereich 100 – 150) und es lässt sich erkennen, dass die Uroplakin II gefärbten Zellen in der IM-Schicht vermehrt in ihrem oberen luminalen

Bereich vorhanden sind. Es wird für jede Probe bestimmt, wie weit der von der luminalen Schicht ausgehende gefärbte Bereich in die IM-Schicht hereinragt, der so genannte „Vorhang“. Die Verteilung der so bestimmten Eindringtiefe ist in Abbildung 14 dargestellt. Da die Urothel-Proben unterschiedlich dicke Zellschichten aufweisen wird die Eindringtiefe zur besseren Vergleichbarkeit in Prozent der Intermediärschicht angegeben. Das Histogramm in Abbildung 14 stellt die Häufigkeit des Vorkommens der verschiedenen Eindringtiefen dar. Daraus wird ersichtlich, dass die meisten Proben nur eine geringe Eindringtiefe in die IM-Schicht aufweisen. Eine klare Abgrenzung kann aber auch nicht festgestellt werden, da das gesamte Spektrum, bis hin zu einer vollständigen Färbung, vorgekommen ist. Die tieferen Eindringtiefen der Uroplakin II gefärbten Zellen werden aber zunehmend seltener.

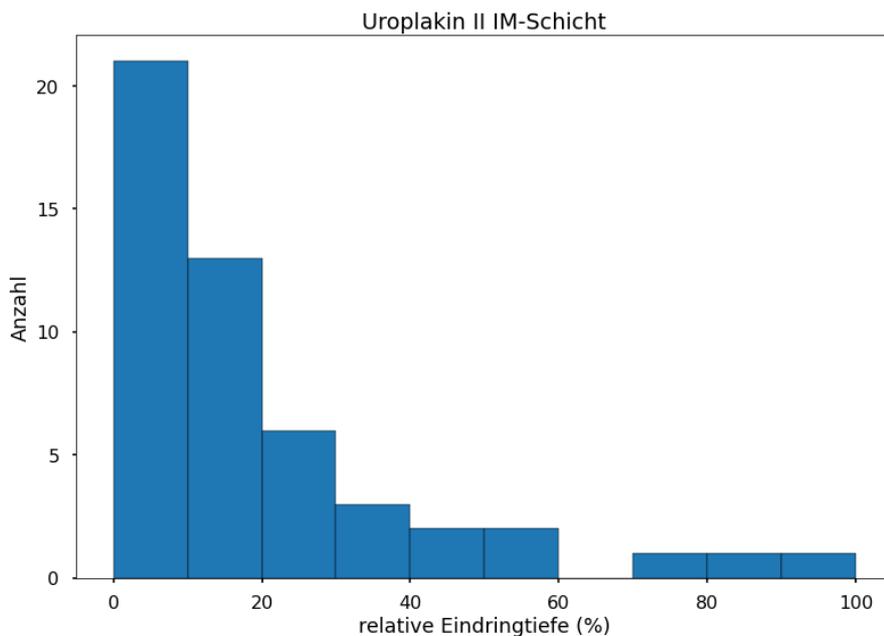


Abbildung 14: Relative Eindringtiefe des mit Uroplakin II gefärbten Bereichs in die Intermediärschicht ausgehend von der luminalen Schicht.

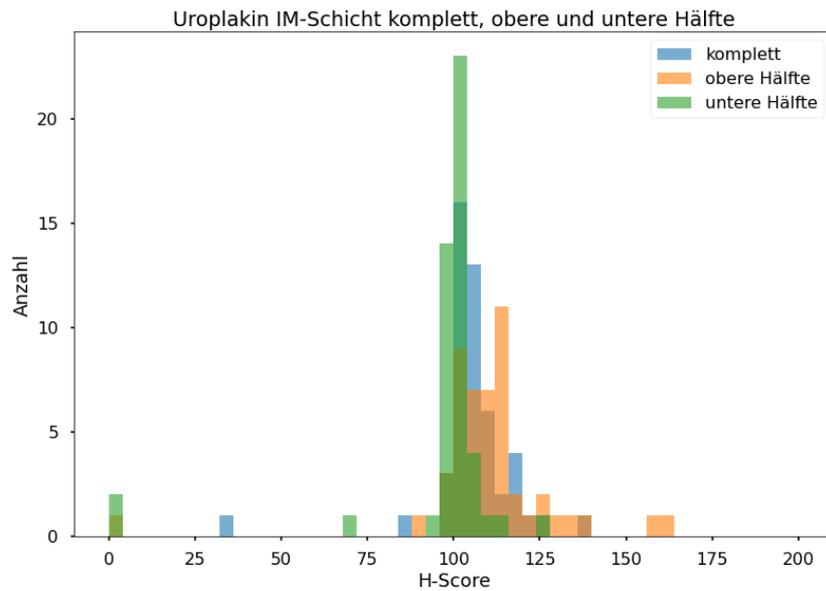
Die Färbung durch Uroplakin II der IM-Schicht ist im oberen Bereich am stärksten (Abbildung 8). Um diese Beobachtung tiefergehend statistisch auszuwerten, wird die IM-Schicht in zwei Hälften unterteilt (luminal und basal) und die einzelnen Zellen nochmals gemäß ihres Färbegrades gezählt. Die Zuteilung der Zellen in die jeweilige Hälfte der IM-Schicht findet dabei von Hand statt und unterliegt daher einer gewissen Subjektivität. Es werden jedoch wieder die oben beschriebenen mehrfachen Zählungen

durchgeführt, um diesen Einfluss zu minimieren. Daraus wird für jede Hälfte der H-Score berechnet. In Abbildung 15 sind die Verteilungen der H-Scores als Histogramm und als Boxplots dargestellt. Für die Mittelwerte der H-Scores und deren Fehler ergibt sich:

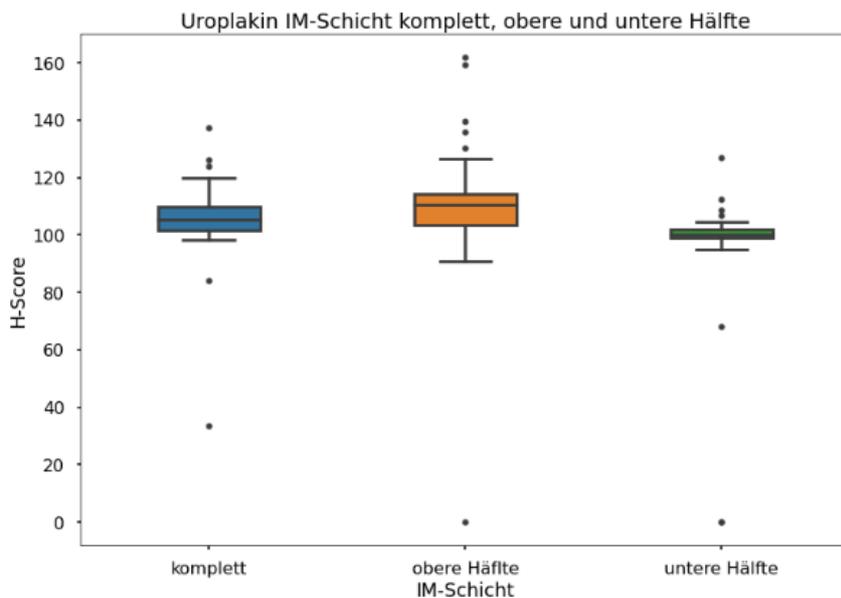
Tabelle 5 Mittelwerte der H-Scores der IM-Schicht für Uroplakin

	Mittelwert	Fehler des Mittelwertes
Komplett	105,6	± 1,9
Untere Hälfte	96,5	± 3,1
Obere Hälfte	110,6	± 3,0

Der mittlere H-Score der oberen Hälfte liegt mit 110,6 ca. 15% höher als der der unteren Hälfte (96,5). In Abbildung 15 b) sind in den Boxplots die höheren H-Scores für die obere Hälfte im Vergleich zur Unteren nochmal besser erkennbar. Der Mittelwert der beobachteten Verteilung für die obere Hälfte ist signifikant größer als der Mittelwert der unteren Hälfte, da mit einem einseitigen t-Test nach Welch ein p-Wert von 0,00073 bestimmt wird. Damit kann die Nullhypothese, dass $\mu_{\text{unten}} \geq \mu_{\text{oben}}$ verworfen werden und es gilt: $\mu_{\text{unten}} < \mu_{\text{oben}}$. Die obere Hälfte der IM-Schicht ist also im Mittel stärker gefärbt als die Untere.



a)



b)

Abbildung 15: Vergleich der Verteilung des H-Scores für die komplette IM-Schicht, die obere und untere Hälfte als Histogramm (a) und als Boxplot (b)

Mit dieser zweiten vertiefenden Analyse kann also gezeigt werden, dass die Färbung mit Uroplakin II innerhalb der IM-Schicht von der luminalen Schicht ausgeht. Die H-Scores, die die Färbung der gesamten, oberen und unteren Schicht angeben unterscheiden sich nur wenig, durch einen statistischen Test kann aber festgestellt werden, dass der

Mittelwert des H-Score für das Patientenkollektiv für die obere Hälfte der Intermediärschicht höher liegt als für die untere IM-Schicht.

III.3.2 DeltaNp63

Im Gegensatz zu Uroplakin II wird für DeltaNp63 eine hohe Expression in der basalen und Intermediärschicht gemessen und ein niedriger H-Score in der luminalen Schicht. Analog zur Berechnung der Eindringtiefe in Abbildung 15 wird diese auch für DeltaNp63 analysiert. Aufgrund der umgedrehten Verteilung wird allerdings ausgehend von der basalen Schicht gemessen. Die Häufigkeitsverteilung in Abbildung 16 zeigt klar, dass meist die komplette Intermediärschicht, oder zumindest ein großer Teil, angefärbt ist. So zeigen 70 % der Präparate eine Eindringtiefe von 80 – 100%. Dies steht im Gegensatz zur Färbung bei Uroplakin II, bei der meist nur eine geringe Färbung bzw. Eindringtiefe zu beobachten ist. Es ergab sich ein einzelner negativer Wert. Dieser ist auf eine einzige Probe zurückzuführen, bei der die Färbung von der luminalen, anstatt der basalen Schicht ausging. Dafür wurde der negative Wert verwendet.

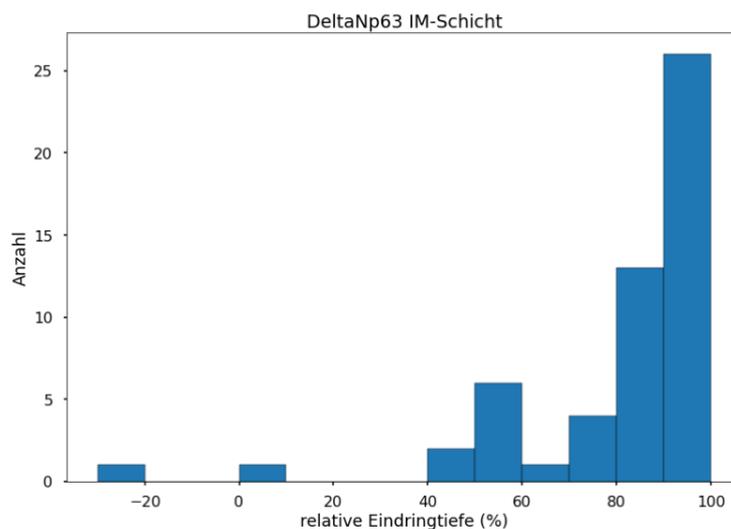


Abbildung 16: Relative Eindringtiefe des mit DeltaNp63-gefärbten Bereichs in die Intermediärschicht ausgehend von der basalen Schicht.

Wie im Material und Methoden-Teil für DeltaNp63 (Kapitel II.6.2) beschrieben, werden einzelne stark angefärbte, Zellen im nichtgefärbten Bereich gezählt. Die Verteilung der Anzahl dieser einzelnen, mit DeltaNp63, angefärbten Zellen im ungefärbten Bereich ist in Abbildung 17 dargestellt. Dabei werden Präparate, bei denen die komplette IM-Schicht

gefärbt ist, ausgeschlossen. Dies ist bei 32% der Präparate der Fall. Bei einer komplett gefärbten IM-Schicht kann es keine Zellen im ungefärbten Bereich geben. Es zeigt sich, dass bei den meisten Präparaten nur wenige voll gefärbte Zellen im ansonsten ungefärbten Bereich nachgewiesen werden können (0-10 Stück). Werte darüber, also viele einzelne gefärbte Zellen, kommen nur sporadisch vor.

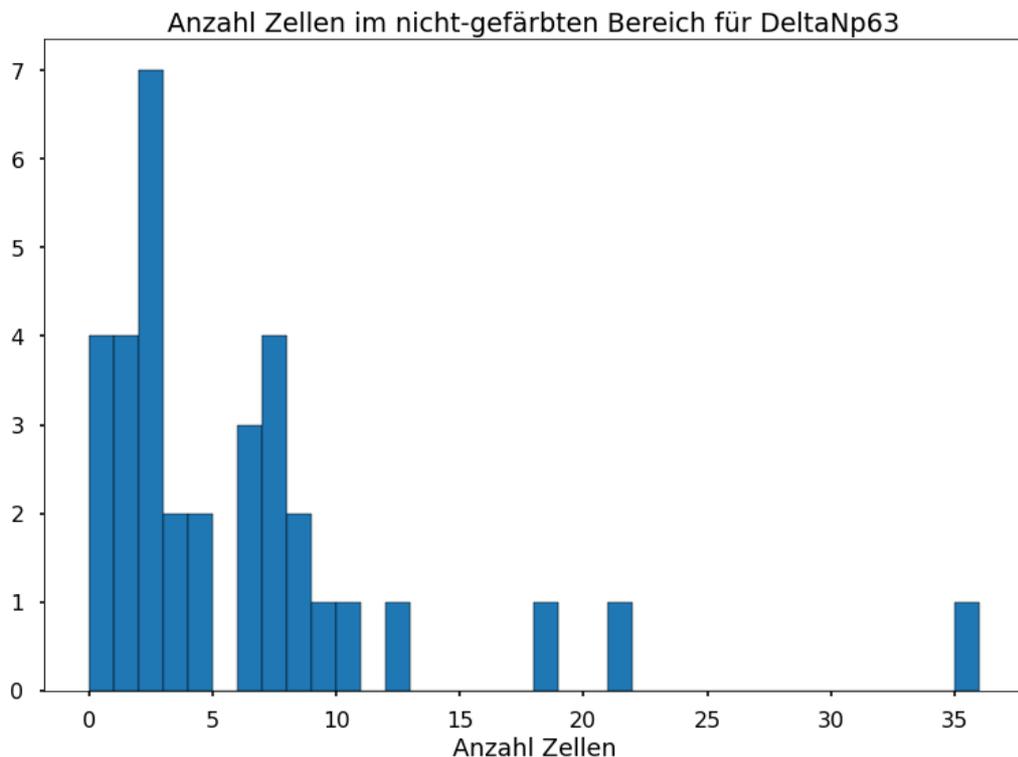


Abbildung 17: Anzahl einzelner Zellen im nicht-gefärbten Bereich in der Intermediärschicht für DeltaNp63

Weiterhin wird der qualitative Verlauf des Grenzbereichs zwischen gefärbten und ungefärbten Zellen beschrieben. Wie oben auch schon beschrieben, muss dabei bedacht werden, dass komplett gefärbte IM-Schichten natürlich keinen Grenzverlauf haben können. Bei diesen Präparaten, bei denen kein Grenzverlauf ersichtlich ist, wird dieser ebenfalls als „flach“ kategorisiert. Die Verteilung der Grenzverlaufsbeschreibungen ist in Abbildung 18 dargestellt. Die Häufigkeit der Verläufe nimmt von flach bis zu spitzen Ausläufern ab.

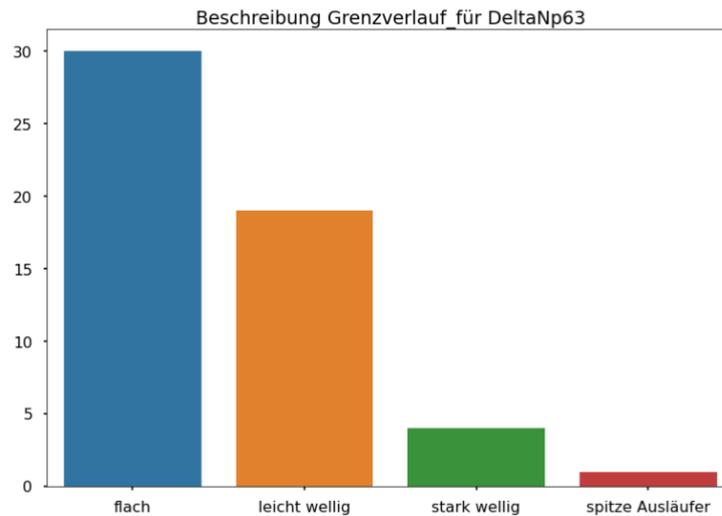


Abbildung 18: Häufigkeit des Vorkommens der Kategorie, die den Verlauf der Färbung an der Grenzschicht beschreibt.

Zuletzt wird noch die Differenz der Ausläuferspitzen analysiert. Dazu wird die Differenz der Eindringtiefe des durchschnittlichen Verlaufs und der maximalen Eindringtiefe in einer Ausläuferspitze gebildet. Im schematischen Bild aus Abbildung 7 würde das zu einem Wert von

$$70 \% - 50 \% = 20 \%$$

führen. Die Verteilung dieser Differenzen, die angeben wie unregelmäßig der Grenzverlauf ist, ist in Abbildung 19 dargestellt. Der Verlauf ähnelt der qualitativen Verteilung aus Abbildung 18, da es viele flache oder nur leicht wellige Verläufe gibt, kommt es auch zu vielen Werten mit nur kleinen Differenzen.

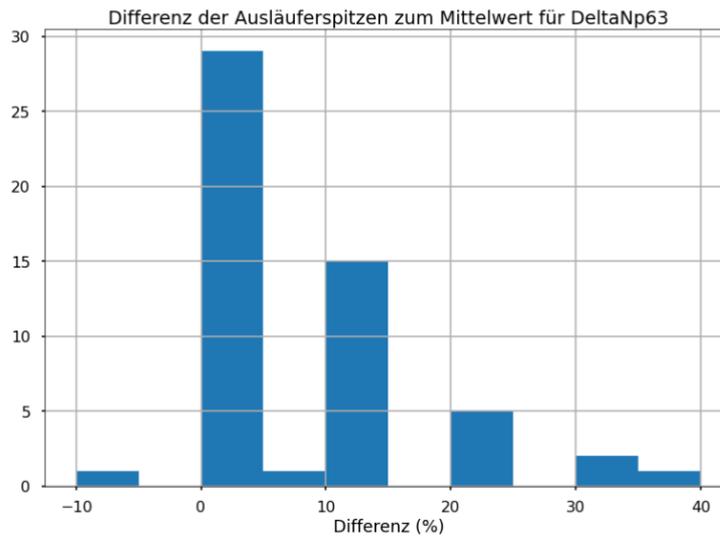


Abbildung 19: Differenz zwischen den Ausläuferspitzen des gefärbten Bereichs und dem Mittelwert des Grenzverlaufs in Prozent der gesamten Schichtdicke.

Für die Verteilung von DeltaNp63 in der Intermediärschicht kann gesagt werden, dass sich die Färbung meist bis weit in den luminalen Bereich bzw. über die komplette IM-Schicht erstreckt. Stark wellige Verläufe mit ausgeprägten Spitzen kommen vor, sind aber die Ausnahme.

III.3.3 KLF-5

Stark gefärbte Zellen in allen Schichten

Der KLF5-Marker weist, wie in Abbildung 13 zu sehen ist, eine relative homogene Färbung in allen drei Schichten auf. Auch innerhalb der Intermediärschicht lassen sich keine Strukturen erkennen. In dieser zweiten Analyse sollen zuerst die Verteilungen von stark gefärbten Zellen in allen drei Schichten genauer betrachtet werden. Danach wird in einer weiteren Analyse die IM-Schicht genauer untersucht werden.

Für die vertiefende Analyse der stark gefärbten Zellen wird, wie in Kapitel II.6.3 beschrieben, eine neue Analyse basierend auf der ersten Auswertung durchgeführt. Hierzu werden die vier Färbekategorien in zwei Gruppen zusammengefasst. Zuerst 0 und 1 zu „nicht gefärbt“, 2 und 3 zu „gefärbt“. Für eine weitere Untersuchung der einzelnen stark gefärbten Zellen wird dann nochmal nur die Intensität 3 als gefärbt gewertet, die anderen drei Stufen werden zusammen als nicht gefärbt gewertet. Es wird für die gefärbte

und nicht gefärbte Gruppe, in beiden Gruppierungsvarianten, der Beitrag der gefärbten Zellen an der Gesamtanzahl der Zellen angegeben. Diese Verteilungen für die verschiedenen Präparate sind aufgeteilt nach ihrer Schicht in Abbildung 20 dargestellt. Die Verteilungen gleichen sich sehr, man erkennt lediglich einen leicht verringerten Beitrag zur Gesamtzahl in der luminalen Schicht. Insgesamt sind die Anteile recht hoch (nahe an eins), das kommt daher, dass die Proben meist recht gleichmäßig angefärbt sind und vor allem viele Zellen in die Intensitätsstufe 2 fallen.

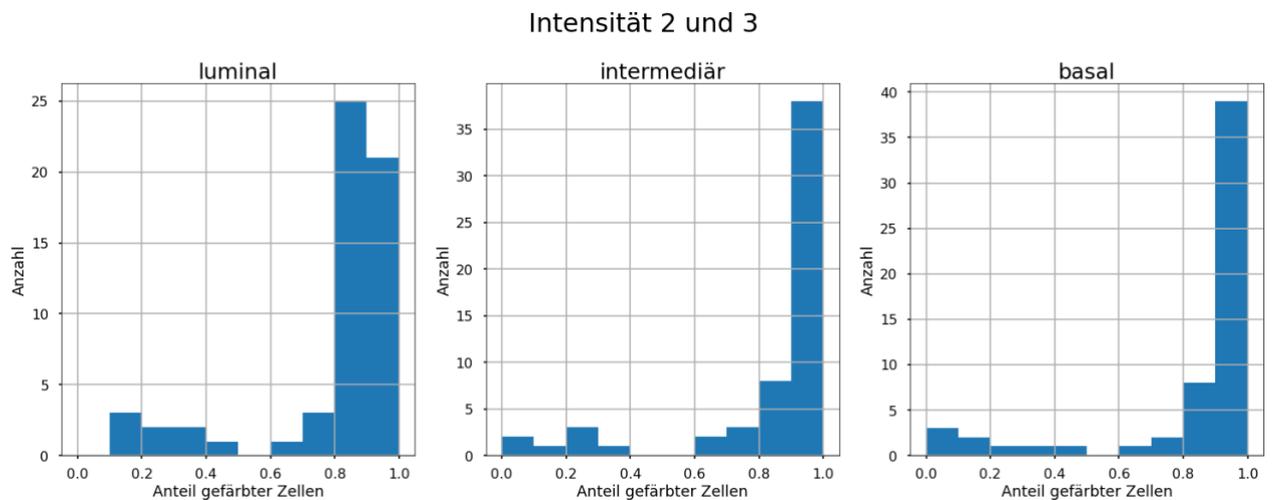


Abbildung 20: Anteil der gefärbten Zellen (Intensität 2 und 3) an der Gesamtzahl der Zellen

Daher wird neben der Intensität 2 & 3 auch ausschließlich die Intensitätsstufe 3 untersucht. Die Verteilungen für die drei Schichten sind in Abbildung 21 dargestellt. Hier ergibt sich ein völlig anderes Bild, der Anteil der Stufe 3 gefärbten Zellen an der Gesamtzahl ist sehr viel geringer.

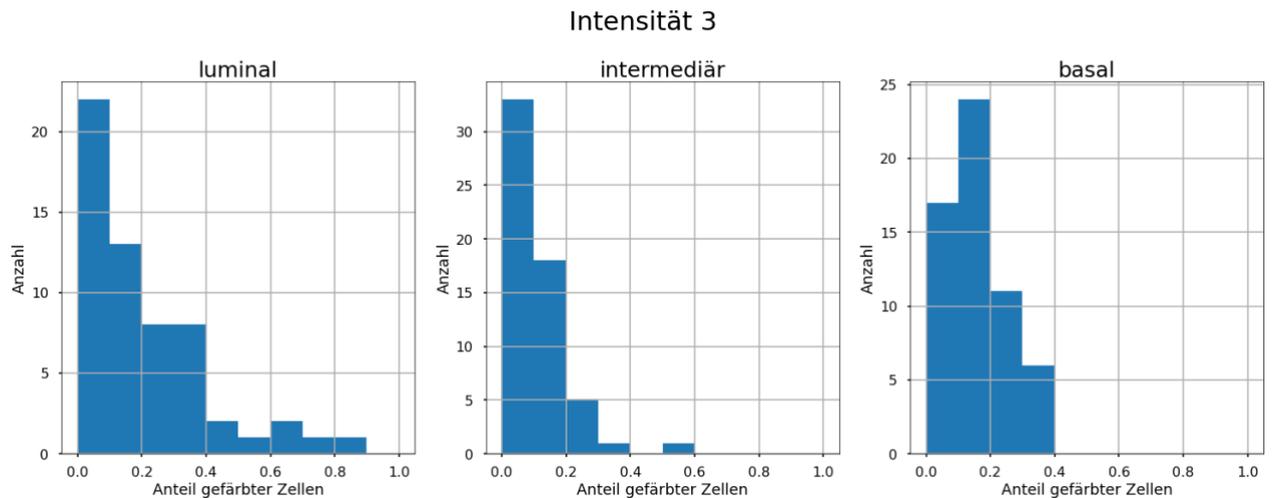


Abbildung 21: Anteil der stark gefärbten Zellen (Intensität 3) an der Gesamtzahl der Zellen

Vor allem fällt auf, dass sich die Verteilung in der luminalen Schicht bis 0,9 (also 90 %) zieht. Manche Präparate weisen einen hohen Anteil stark gefärbter Zellen in der Luminalschicht auf. Bei der Berechnung der Mittelwerte zeigt sich, dass in der Luminalschicht mit 20,7% der höchste Anteil der stark gefärbten Zellen zu finden ist. Dies nimmt in der Intermediärschicht auf 10,5% ab und steigt wieder in der Basalschicht auf 15,7% (Tabelle 5).

Tabelle 6 Mittelwerte des Anteils stark gefärbter Zellen (Intensität 3)

Luminal	20,7 %
Intermediär	10,5 %
Basal	15,7 %

Vertiefende Analyse der IM-Schicht

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt die stark gefärbten Zellen in allen Schichten betrachtet wurden, wird in dieser vertiefenden Analyse der Fokus nun auf die Intermediärschicht gelegt. Dies wird getan, da nur die mehrschichtige IM-Schicht die Möglichkeit bietet überhaupt die lokoregionäre Verteilung zu bestimmen. Dazu wird auf qualitativer Basis bestimmt, ob die luminal oder basale Hälfte der Intermediärschicht stärker gefärbt ist bzw. einzelne gefärbte Zellen enthält (siehe II.6.3). Da auch Doppelnennungen möglich sind, also beide Hälften gefärbt sind bzw. beide Hälften einzelne stark gefärbte Zellen aufweisen, werden als Darstellungsmethode die Mengen- bzw. Venn-Diagramme gewählt (

Abbildung 22).

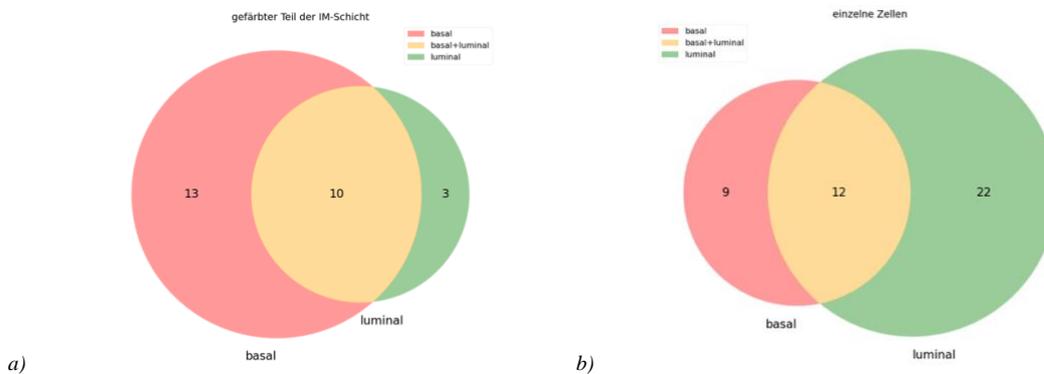


Abbildung 22: a) Anzahl Proben, die in der basalen, luminalen oder beiden Schichten der IM-Schicht angefärbt wurden. b) Anzahl Proben, bei denen in der basalen, luminalen oder beiden Schichten der IM-Schicht einzelne stark gefärbte Zellen auftreten.

Betrachtet man das Diagramm, das die gefärbten Hälften der Intermediärschicht darstellt (

Abbildung 22a), sieht man eine stärkere Färbung der Zellen in der basalen Hälfte der IM-Schicht gegenüber der Luminalen von 13 zu 3 Proben. In 10 Proben sind beide Hälften gleich stark gefärbt, 32 Proben von insgesamt 58 waren weder in der basalen noch in der luminalen Schicht stärker gefärbt und sind daher in dem Diagramm gar nicht enthalten. Eine flächige Färbung tritt also eher in der basalen Schicht der IM-Schicht auf.

Betrachtet man das Diagramm für die einzelnen gefärbten Zellen in (

Abbildung 22 b) ergibt sich ein anderes Bild: Hier weisen mehr Proben einzelne gefärbte Zellen in der luminalen IM-Schicht auf als in der Basalen, 22 zu 9 Proben. In 12 Gewebeproben tauchen einzelne Zellen in beiden Schichthälften auf. In 15 Proben gibt es keine einzelnen stark gefärbten Zellen. Einzelne stark gefärbte Zellen tauchen also eher in der luminalen IM-Schicht auf.

In den Mengendiagrammen in

Abbildung 22 wird vor allem gut dargestellt, ob eine Probe in der luminalen oder basalen Schicht (oder beiden) das jeweilige Merkmal „Schicht ist flächig gefärbt“ oder „einzelne Zellen“ aufweist. Dabei werden auch die Korrelationen zwischen einzelem oder gleichzeitigem Auftreten beider Merkmale betrachtet. Abbildung 23 gibt die absoluten Zahlen (in Prozent) für das Auftreten des jeweiligen Merkmals an. Proben die

beispielsweise in beiden Hälften eine Färbung aufweisen, werden in Abbildung 23 jeweils zur basalen und luminalen Schicht gezählt, während sie in Abbildung 22 in den orangenen Bereich fallen und gesondert gewertet werden.

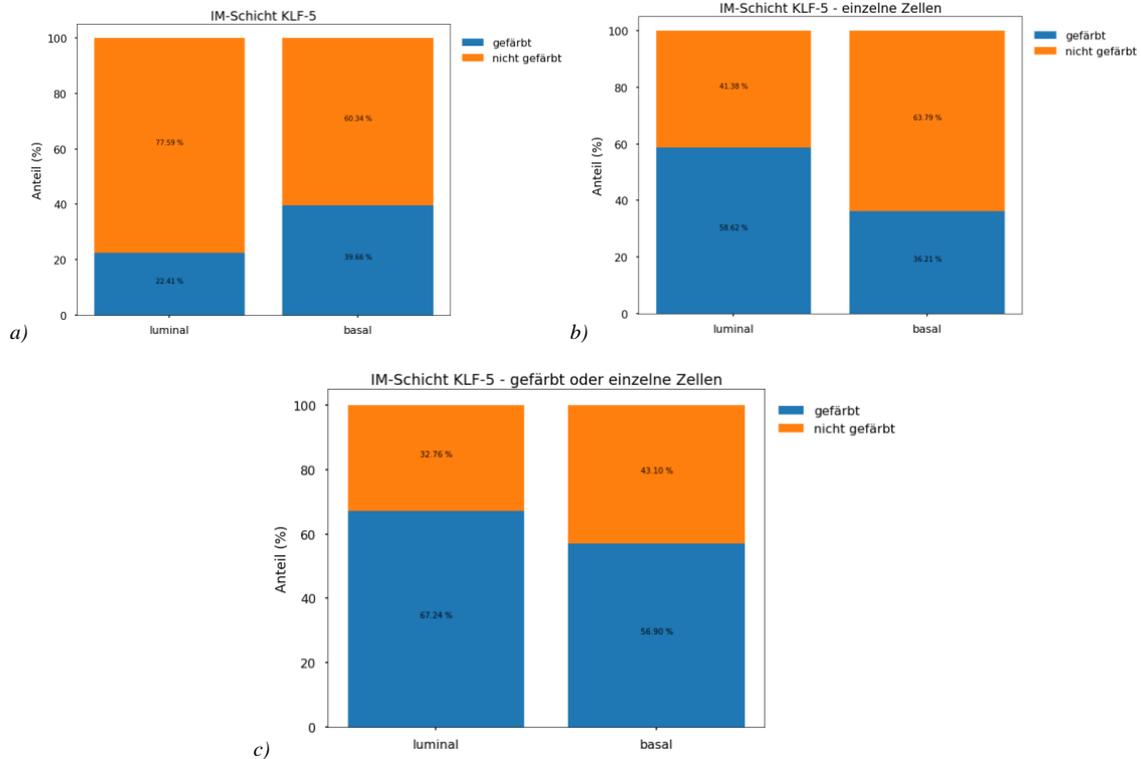


Abbildung 23: Anteile gefärbter/nicht gefärbter a) Bereiche der IM-Schicht, b) einzelner Zellen, c) entweder gefärbter Bereich oder einzelner Zellen in der Intermediärschicht

Abbildung 23 a) zeigt die Anteile gefärbter/nicht gefärbter Bereiche in den Hälften der IM-Schicht. Wie schon oben beschrieben, weist die basale IM-Schicht einen höheren gefärbten Anteil auf als die Luminale.

Tabelle 7: Prozentsatz in den IM-Schichthälften, die das jeweilige Merkmal erfüllen

	Merkmal	Gefärbte Bereiche	Einzelne Zellen	Beides
luminal	gefärbt	22,41 %	58,62 %	67,24 %
	nicht gefärbt	77,59 %	41,38 %	32,76 %
basal	gefärbt	39,66 %	36,21 %	56,90 %
	nicht gefärbt	60,34 %	63,79 %	43,10 %

Analog zu den Mengendiagrammen überwiegt bei den einzelnen gefärbten Zellen die luminalen Hälfte der Intermediärschicht (Abbildung 23 b)). Betrachtet man beide

Merkmale, zählt also, ob die gesamte Hälfte der Intermediärschicht gefärbt oder einzelne Zellen stark gefärbt sind, ergibt sich ein knapperes Ergebnis, die Luminalschicht dominiert aber weiterhin über die basale Hälfte (Abbildung 23 c)).

Die Prozentsätze in den beiden Schichthälften für die jeweiligen Merkmale sind in Tabelle 7 nochmals zusammengestellt.

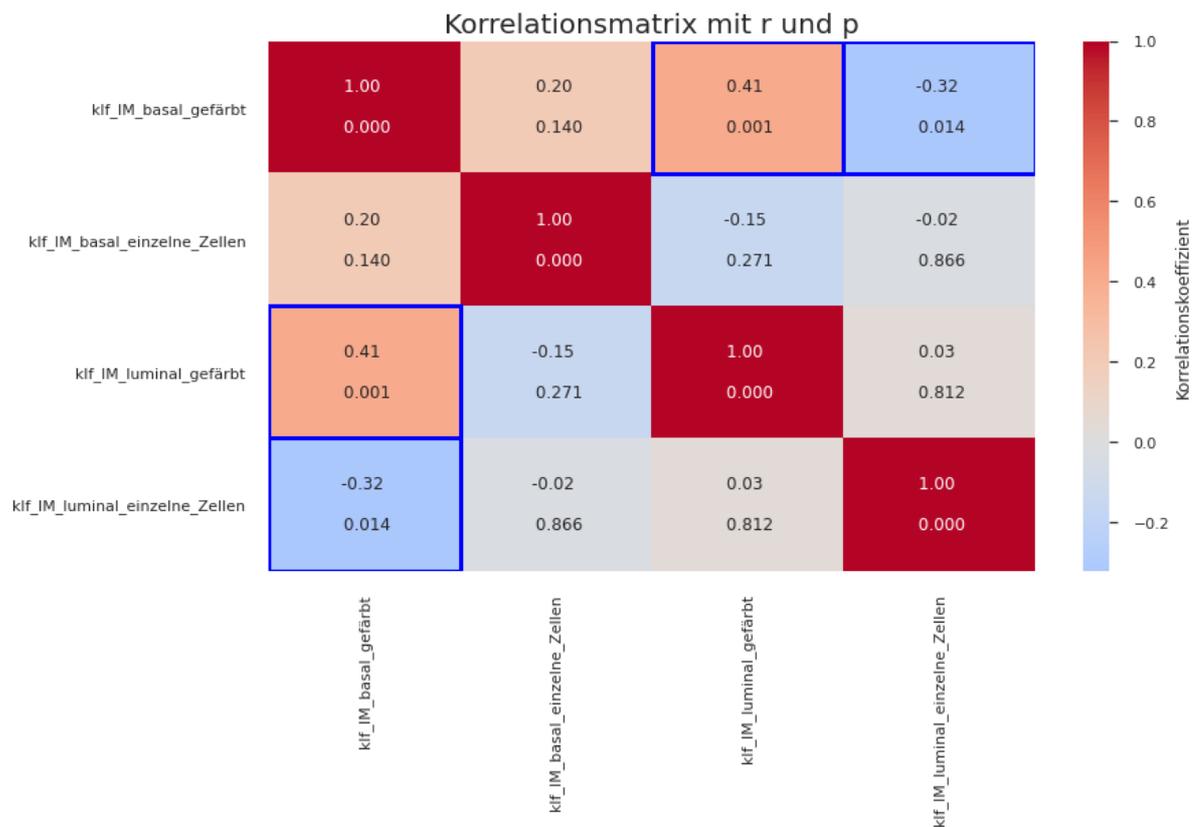


Abbildung 24: Korrelationsmatrix zwischen den qualitativ erhobenen Größen. Angegeben sind der Korrelationskoeffizient r und die Signifikanz der Korrelation p . Signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) sind blau umrandet dargestellt.

In Abbildung 24 ist die Korrelationsmatrix zwischen den Merkmalen in den beiden Schichten dargestellt. Es sind jeweils der Pearson-Korrelationskoeffizient r und der p -Wert für die statistische Signifikanz der Korrelation angegeben. Die Matrix ist symmetrisch, die Seiten oberhalb und unterhalb der Diagonalen sind identisch. Die signifikanten Felder ($\alpha < 0.05$) sind mit blauer Umrandung dargestellt. Die leichte

Korrelation ($r = 0,41$, $p = 0,001$) zwischen basal gefärbter Schicht und luminal gefärbter Schicht besagt, dass oft beide Schichten gefärbt sind, wenn es eine allein schon ist.

Die negative Korrelation ($r = - 0.32$, $p = 0.014$) in blau zwischen basal gefärbter Schicht und einzelnen Zellen in der luminalen Schicht ist ebenfalls noch interessant. Das bedeutet, dass wenn die „gegenüberliegende“ Hälfte flächig gefärbt ist, in der anderen Hälfte seltener einzelne gefärbte Zellen auftreten.

Gegenüberstellung H-Score für benigne und maligne Proben

KLF-5 wird über die Aktivierung von Epithel-like transcription gesteuert (Al-Kurdi, 2017), Epithel-like transcription wiederum ist ein Protein, das bei der Proliferation von Zellen im Urothel beteiligt ist. Darüber hinaus ist es aber auch beispielsweise in Lungenepithelzellen bei Entzündungsprozessen zu finden (Yu Z, 2015). Dieses Vorkommen bei Entzündungsprozessen liefert die Motivation, um mit einer weiteren Analyse die möglichen Korrelationen mit Entzündungsparametern zu untersuchen.

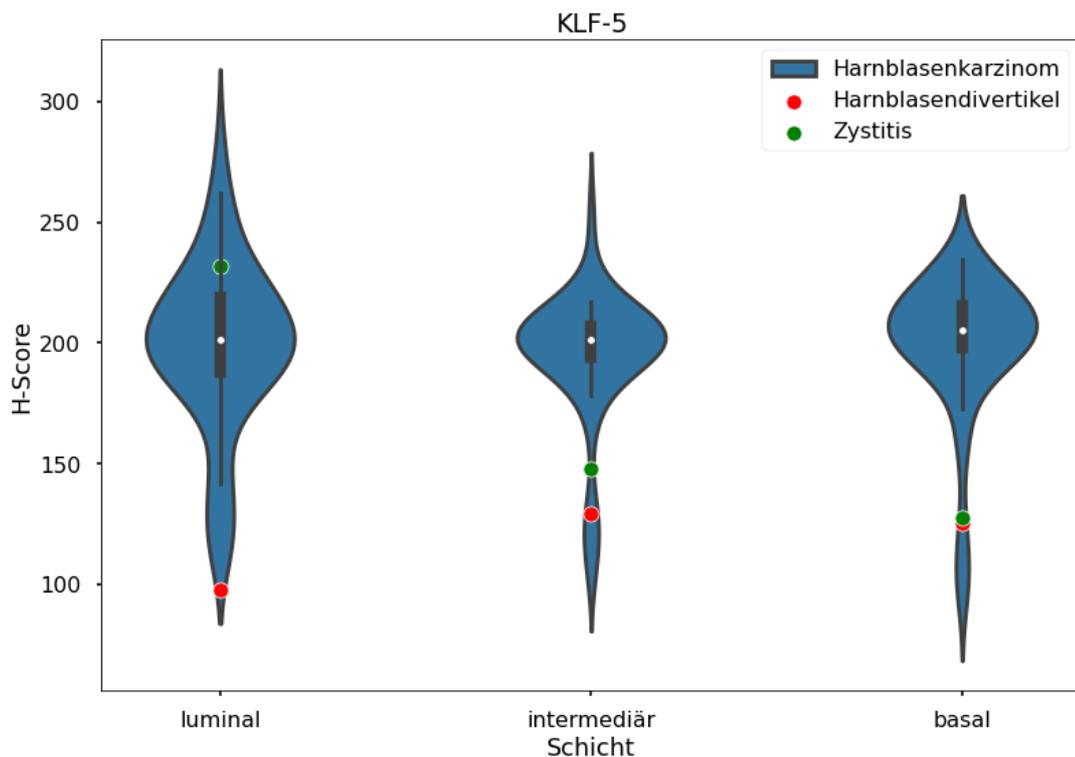


Abbildung 25: Verteilung der H-Scores in den drei Urothelschichten. Maligne Proben sind in blau, das Präparat mit einem Harnblasendivertikel in rot und das Präparat mit chronischer Zystitis in grün dargestellt.

Tabelle 8: H-Scores für die malignen Proben (Mittelwert und Standardabweichung), das Präparat mit Harnblasendivertikel und das Präparat mit Zystitis.

Schicht	Mittelwert	Standardabweichung	Divertikel	Zystitis
basal	199,1	29,8	97,8	231,7
intermediär	194,9	27,2	129,4	147,7
luminal	199,1	35,0	125,0	127,3

Tabelle 9: Z-Score für die Abweichung der Präparate vom Mittelwert der malignen Präparate

Schicht	Divertikel	Zystitis
basal	-3,40	1,09
intermediär	-2,41	-1,74
luminal	-2,12	-2,05

Von den insgesamt 55 Patienten waren drei Patienten ohne Harnblasenkarzinom, die eine Zystektomie erhalten haben. Darunter war ein Patient mit einem Harnblasendivertikel, ein Patient mit rezidivierenden Zystitiden und ein Patient mit einem Prostatakarzinom welcher aber bei der obigen Analyse nicht berücksichtigt werden konnte, da die immunhistochemische Färbung von KLF-5 nicht vorhanden war. Für die beiden Proben der Patienten ohne Harnblasenkarzinom erfolgt die genauere Betrachtung des H-Scores. Die Probe mit dem Harnblasendivertikel hat einen geringeren H-Score als ein Großteil der Verteilung der malignen Proben (rote Punkte in Abbildung 25). Bei dem Patienten mit den chronischen, rezidivierenden Zystitiden sind in der intermediären und basalen Schicht die Werte deutlich unterhalb des Durchschnitts der malignen Proben, für die luminale Schicht jedoch über dem Durchschnitt. Die weitere Interpretation wird im Diskussionsteil fortgesetzt.

IV Diskussion

Das Urothel ist mehrschichtig aufgebaut; es besteht aus einer luminalen Schicht, welche hauptsächlich hauptsächlich von den Deckzellen gebildet wird, einer Intermediärschicht (mehrschichtig) und einer basalen Schicht. Die basale Schicht grenzt an die Lamina propria an. In dieser Arbeit wird durch die oben beschriebenen deskriptiven und quantitativen Analysen von Uroplakin II, DeltaNp63 und KLF-5, die Zellverteilung im Urothel näher untersucht.

Die zu diskutierenden Schwerpunkte dieser Arbeit sind die Fragen, ob sich durch immunhistochemische Färbungen die beiden Zellmarker DeltaNp63 und KLF-5 nachweisen lassen und in welchen Bereichen der Urothelschicht diese Zellen lokalisiert sind. Uroplakin II wird auch als urothelial-spezifischer Marker verwendet und soll hauptsächlich die bereits bekannte Verteilung der Deckzellen nachweisen.

IV.1 Uroplakin II

Uroplakin II wurde als urothelspezifischer Marker für diese Arbeit gewählt. Wie in der Literatur beschrieben, ist Uroplakin II ein hochspezifischer immunhistochemischer Marker der Deckzellen und wird vor allem in der luminalen Urothelschicht exprimiert (Negrete HO & Berg J, 1996), (Li W, 2014) (Larsson HM, 2014). Im Gegensatz zu KLF-5 und DeltaNp63 exprimiert Uroplakin II vor allem die ausdifferenzierten Zellen in der oberen Deckzellschicht, was in der Literatur bereits bekannt ist, während die Lokalisation der anderen beiden Marker noch unklar ist und in dieser Arbeit beschrieben werden soll. In den immunhistochemisch angefärbten Schnitten wird eine klare Verteilung der Uroplakin II-Expression erkennbar. Stark Uroplakin II positive Zellen sind vor allem in der luminalen Urothelschicht zu erkennen und die Uroplakin II Expression nimmt in den tieferen Urothelschichten ab. Dies wird an der Verteilung der H-Scores für die drei Schichten des Urothels in Abbildung 8 direkt ersichtlich und deckt sich mit der Erwartung. Die ebenfalls beobachtete Färbung der IM-Schicht wird in der vertiefenden Analyse (III.3.1) genauer untersucht und es zeigt sich, wie die relative Eindringtiefe in

die IM-Schicht verteilt ist (Abbildung 14). Ausgehend von der luminalen Schicht ist ein annähernd exponentieller Abfall der relativen Eindringtiefe zu beobachten. Geringe Eindringtiefen kommen häufiger vor, während sehr tiefe relative Eindringtiefen nur selten vertreten sind. Da Uroplakin II ein Deckzell-spezifischer Marker ist, war diese Verteilung zu erwarten. Dieses Färbemuster zeigt, dass sich die ausdifferenzierten Urothelzellen hauptsächlich in der luminalen Urothelzellschicht finden lassen, als auch in den obersten Schichten der IM-Schicht. Zellen in den tieferen Schichten des Urothels sind also vermutlich noch nicht ausdifferenziert, da sie nicht Uroplakin II exprimieren.

Mit der Färbung gegen DeltaNp63 und KLF-5 sollen genauere Aussagen zu den Zellen in tieferen Schichten und ihrer Eigenschaften getroffen werden. Durch die Analysen zeigt sich, dass Uroplakin die ausdifferenzierten Zellen in der oberen Deckzellschicht wie erwartet anfärbt. Das bestätigt, dass die verwendete Methode der Immunhistochemie geeignet ist, um die differenzierte Expression von Markern im Urothel nachzuweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine weitergehende Analyse der Expressionsmuster von DeltaNp63 und KLF-5 durchgeführt werden.

IV.2 DeltaNp63

Delta-Np63 ist die verkürzte Isoform von p63, bei der die NH₂-Terminale entfällt. Die DeltaNp63-Isoform ist ein Marker welcher spezifisch für Basalepithelzellen in verschiedenen Geweben ist (Efeyan A, 2007). DeltaNp63-positive Zellen können alle Epithelien des Blasenepithels erzeugen und sind deswegen möglicherweise Stamm- / Vorläuferzellen (Pignon JC, 2013). Dies bildet den Anknüpfungspunkt für diese Arbeit, da die lokoregionäre Verteilung der DeltaNp63 exprimierten Zellen im Urothel untersucht werden soll, um weitere Hinweise auf mögliche Stammzell- / Proliferationseigenschaften zu erhalten. Durch die immunhistochemischen Verfahren in dieser Arbeit konnten DeltaNp63 positive Zellen angefärbt werden und lokalisiert werden. Die Verteilung der H-Scores auf die drei Urothelschichten ist in Abbildung 9 dargestellt. Es sind vor allem, wie in Übereinstimmung mit der Literatur beschrieben, die Zellen in der basalen Zellschicht des Urothels von DeltaNp63 angefärbt worden (Pignon JC, 2013). Die H-Scores der Intermediärschicht ($H_{\text{median,intermediär}} = 275,9$) erreichen jedoch fast ebenso hohe Werte wie die Basalschicht ($H_{\text{median,basal}} = 285,1$). Dies könnte

darauf hinweisen, dass sich die DeltaNp63 positiven Zellen erst später ausdifferenzieren bzw. der Entstehungsort weiter verteilt und nicht eng lokalisiert ist.

In der vertiefenden Analyse in III.3.2 wird gezeigt, dass die Intermediärschicht, ausgehend von der Basalzellschicht, ebenfalls stark angefärbt ist. Aus Abbildung 16 wird ersichtlich, dass die relative Eindringtiefe in die IM-Schicht sehr viel tiefer geht als für Uroplakin II (Abbildung 14). Für DeltaNp63 ist die Bezugsschicht die Basalschicht, für Uroplakin II ist es die Luminalschicht. Während bei Uroplakin II hauptsächlich kleine Eindringtiefen vorkommen, treten bei DeltaNp63 fast ausschließlich sehr große Eindringtiefen auf. Es kann gezeigt werden, dass die DeltaNp63 gefärbten Zellen ausgehend von der Basalschicht, bis tief in die Intermediärschicht eindringen können.

Es werden darüber hinaus vereinzelte Zellen in der zweiten, oberen Hälfte der Intermediärschicht des Urothels angefärbt. Dies kann darauf hindeuten, dass vereinzelte Zellen mit Proliferationscharakter sich erst später im Urothel ausdifferenzieren. In dieser Arbeit wird eine Darstellung der Verteilung von DeltaNp63 im Urothel also auch in der Intermediärschicht, veranschaulicht. Dies wird in der Literatur ebenfalls so beschrieben (Karni-Schmidt, 2011). Die luminale Urothelschicht ist mit ausdifferenzierten Urothelzellen bestückt. Da in dieser Forschungsarbeit keine DeltaNp63 angefärbten Zellen in dieser Schicht nachgewiesen werden können, kann kein Zusammenhang zwischen spezifischen ausdifferenzierten Urothelzellen zu DeltaNp63 hergestellt werden.

Weiter kommt DeltaNp63 in mehreren Gewebearten vor. Es wird beispielsweise bei nasopharyngealen Plattenepithelkarzinomen, Thymustumoren, Basalzellkarzinomen, Pankreastumoren wie auch Uteruskarzinomen, überexprimiert (Chiang CT, 2009), (Steurer, 2021). Es ist also nicht spezifisch für das Urothel. Aus diesem Grund ist dieser Marker kein geeigneter Marker für spezifische diagnostische und oder therapeutische Ansätze bei beispielsweise Urothelkarzinomen. Bei Urothelkarzinomen wird eher der Verlust von DeltaNp63 beschrieben (Steurer, 2021). Also ist dieser Marker eher ein unterstützender Marker zur Diagnostik. Da DeltaNp63 bei Urothelkarzinomen als Onkogen wirkt und auch für die Differenzierung von Urothel von Bedeutung ist (Karni-Schmidt, 2011).

IV.3 KLF-5

KLF-5 ist ein noch sehr unerforschtes Protein. Es gibt dazu unterschiedliche Forschungsansätze. Beispielsweise gibt es Hinweise darauf, dass KLF-5 bei der Pathogenese von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, sowie auch bei pathogenen Nierenerkrankungen und bei der Entwicklung und Differenzierung von Epithelzellen in der Lunge-, Darm-, Uterus- und Blasenepithelzellen, eine Rolle spielt (Luo Y, 2021) (B.B. McConnell, 2007). Letzteres könnte durch die in dieser Arbeit erhobenen Analysen bestätigt werden. Weitere Forschungen zeigen auch, dass durch die Expression von KLF-5 verschiedene Zellfunktionen beeinflusst werden, wie beispielsweise die Proliferation und Apoptose in verschiedenen Organen (Luo Y, 2021).

Hinweise auf eine Funktion in der Adipogenese bzw. bei der Differenzierung von Adipozyten ist auch bei Oishi et al. (Oishi Y, 2005) beschrieben. KLF-5 beeinflusst in der Niere die Apoptose von Podozyten und die Proliferation von Nierenzellen (Li J, 2021). Wie in Kapitel I.6.2 beschrieben, ist KLF-5 an verschiedenen Prozessen bei der Entwicklung und Differenzierung von Urothelzellen beteiligt. Von Bedeutung sind auch Forschungen welche beispielsweise den Bezug auf Brustkrebs, gastrointestinale Tumoren und Plattenepithelkarzinome herstellen (Liu R, 2013), (Li JC, 2021), (Yang S, 2021). Der Marker KLF-5 wurde in dieser Arbeit in jeder Schicht des Urothels mit unterschiedlichen Färbegraden angefärbt und konnte auf den meisten untersuchten Proben nachgewiesen werden. Die H-Scores der unterschiedlichen Schichten befinden sich auf nahezu demselben Niveau mit medianen H-Scores von 204, 201 und 201 für die basale, intermediäre und luminale Schicht. Die darauffolgende vertiefende Analyse aus II.6.3 trägt diesem Fakt Rechnung und versucht trotz dieser sehr ähnlich gefärbten Schichten doch noch feinere Unterschiede herauszuarbeiten.

Insbesondere für gefärbte Zellen der Färbestufe 3 kann gezeigt werden, dass diese in der luminalen Schicht etwas stärker vertreten sind als in den anderen beiden Schichten.

Bei der Untersuchung innerhalb der Intermediärschicht, wird gezeigt, dass mehr Proben in der basalen Hälfte der IM-Schicht eine flächige Färbung aufweisen (basal 13 Proben, luminal 3 Proben, beide 10 Proben). Betrachtet man einzelne stark gefärbte Zellen in der

IM-Schicht, ist das Ergebnis umgekehrt. Diese treten in der luminalen Hälfte der IM-Schicht häufiger auf als in der Basalen (basal 9, luminal 22, beide 12).

Dies könnte darauf hindeuten, dass einzelne stark gefärbte Zellen, die Proliferationseigenschaften haben, auch in der oberen Hälfte, weiter oben im Urothel zu finden sind. Diese könnte man sich für Spülzytologien zunutze machen. Um dies genauer zu beurteilen, müssten in zukünftigen Projekten die Transkriptionsfaktoren welche von KLF-5 gesteuert werden genauer betrachtet werden. Zudem sollte überprüft werden, ob sich diese Zellen mit Spülzytologien extrahieren lassen und ob sie nach Extraktion noch kultivierbar sind.

Al Kurdi et al. beschrieben, dass KLF-5 über die Aktivierung von Epithel-like transcription gesteuert wird. Epithel-like transcription ist ein Protein, welches bei der Proliferation von Zellen im Urothel mitwirkt, aber auch beispielsweise in Lungenepithelzellen bei Entzündungsprozessen exprimiert wird (Yu Z, 2015). In dieser Arbeit werden hauptsächlich Gewebeproben von Patienten mit Urothelkarzinomen untersucht. Karzinogene Aktivität korreliert meist mit einer Inflammation des Gewebes. Die von Al Kurdi et al. beschriebene Expression von KLF-5 in Lungenepithelzellen könnte auch in Blasenepithelzellen auftreten.

Die Annahme hierbei ist, dass karzinogenes Gewebe zu Entzündungsprozessen führt und so über das KLF-5 (und vorher das epithel-like transcription) zu einem höheren H-Score führen sollte. Umgekehrt müssen dann nicht-entzündliche Prozesse einen geringeren H-Score haben.

Insgesamt gibt es drei Präparate von Patienten, die kein Harnblasenkarzinom aufweisen. Davon ist ein Präparat ohne entzündliche Prozesse in der Anamnese vorhanden, es handelte sich um einen Harnblasendivertikel. Ein weiteres Präparat wurde aufgrund einer chronisch rezidivierenden Zystitis entnommen, besitzt also auch entzündliche Eigenschaften. Ein drittes Präparat ohne Blasenkarzinom existiert, es konnte aber keine KLF-5 Färbung angereichert werden. Das Präparat des Harnblasendivertikels weist in allen drei Schichten einen deutlich niedrigeren H-Score auf als der Mittelwert der

karzinogenen Proben. Zu beachten ist dabei natürlich, dass mit einem einzigen Präparat keine signifikante statistische Aussage getroffen werden kann. Die Z-Scores (siehe

Tabelle 9) liegen auf einem Niveau von größer 3 (luminal) bzw. größer 2 (intermediär und basal) und damit auf einem Konfidenzlevel von über 95% bzw. 90 %.

Bei der Zystitis verhält es sich für die intermediäre und basale Schicht ähnlich, wenn auch mit geringerem Z-Score. Für die luminale Schicht hingegen übersteigt der H-Score sogar den Mittelwert der malignen Proben. Dies kann jedoch auch im Rahmen der Korrelation mit einer Entzündung interpretiert werden, wenn man davon ausgeht, dass bei einer leichteren Zystitis nur die obere Schicht des Urothels betroffen ist.

Generell ist der beobachtete Zusammenhang der KLF-5 Expression mit Entzündungen sehr interessant, es kann jedoch auf Basis von einer bzw. zwei Proben keine endgültige Aussage getroffen werden. Hier wäre eine aufbauende, tiefergehende Forschungsarbeit sicher aufschlussreich.

Mit dieser Arbeit wird die genauere Verteilung von KLF-5 in den diversen Schichten des Urothelgewebes bestimmt. KLF-5 wird immunhistochemisch nachgewiesen und ist ubiquitär exprimiert. Da er sich in jeder Schicht des Urothels anfärben lässt, eignet sich KLF-5 demnach nicht als spezifischer Marker für Zellen mit Stammzeleigenschaften, da sonst jede Urothelzelle eine Stammzelle sein müsste. Um die Expression im Urothel und die spezifische Färbung des Antikörpers nachzuweisen, wäre z.B. eine Expressionsanalyse von KLF-5 mittels qPCR interessant. Dabei könnten zudem noch weitere Epithel- sowie andere Gewebeproben mit in die Analyse eingeschlossen werden, um die Expressionsmuster zu vergleichen.

IV.4 Ausblick für die Zukunft

Die Ergebnisse dieser Arbeit können als Ausgangspunkt betrachtet werden um weitere Forschungen in Bezug auf die Proliferationseigenschaften, durchzuführen.

Wenn Urothelzellen mit Stammzeleigenschaften in luminal gelegenen Schichten in größerer Anzahl vorhanden wären, wäre das beispielsweise für Spülzytologien sowie Tissue engineering in der Urologie von Bedeutung. Dazu wäre es notwendig, Zellen mit diesen Eigenschaften möglichst nah an der Oberfläche des Blasenepithels vorzufinden und nachzuweisen. Nur so könnten sie in relevantem Umfang für Spülzytologien verwendet werden. Um den Nachweis für die Stammzeleigenschaften erbringen zu können, muss das Zusammenspiel der Proteine bzw. deren Interaktionen in den Urothelzellen noch besser verstanden werden. Die verwendeten Marker sollen dabei helfen, spezifisch Zellen mit Stammzeleigenschaften besser bestimmen zu können.

Anhand von den verwendeten drei Markern und deren deskriptiver Analyse in dieser Arbeit zeigt sich, dass Urothelzellen mit Stammzell-Proliferationscharakter, vorwiegend in der basalen Schicht verankert sind und diese Zellen sich zur luminalen Schicht hin teilen bzw. differenzieren. Das Vorkommen von DeltaNp63 vorwiegend in der basalen Schicht und der basalen Hälfte der Intermediärschicht, lässt diese Aussage zu, da DeltaNp63-positive Zellen möglicherweise Stamm- / Vorläuferzellen sind (Pignon JC, 2013). Dazu bedarf es jedoch auch noch weiterer Forschungen.

Es könnte versucht werden aus Spülzytologien auf DeltaNp63 positive Zellen aus der Luminalschicht oder wenn möglich aus der oberen Intermediärschicht zu extrahieren und zu analysieren, um ein besseres Verständnis zu erhalten. Weiter könnten Koexpression durch Immunfluoreszenz von KLF-5 und DelaNp63 überprüft werden.

V Zusammenfassung

Mittels immunhistochemischer Färbungen wurde die lokoregionäre Verteilung von Zellen in den unterschiedlichen Urothelschichten durch die drei Marker Uroplakin II, DeltaNp63, und KLF-5 deskriptiv aufgezeigt. Dazu wurde der gesunde Bereich des bei einer Blasen-Zystektomie entfernten Urothelgewebes mit den Markern gefärbt und analysiert.

Die Verteilung der Zellen mit Proliferationseigenschaften im Urothel ist insbesondere für eine Anwendung im Tissue Engineering für beispielsweise der Rekonstruktion der Harnblase oder für den Nachweis von Stammzellen interessant.

Für diese Studie wurden 55 Präparate verwendet. Es konnten für die jeweiligen Marker folgende Verteilungen an markierten Zellen im Urothelgewebe bestimmt werden.

Uroplakin II

Uroplakin II wird hauptsächlich in der Luminalschicht des Urothels nachgewiesen. In einer sehr viel schwächeren Ausprägung, färbt es auch Zellen in der oberen Intermediärschicht an. In der vertiefenden Analyse wurde die Eindringtiefe der gefärbten Zellen in die Intermediärschicht bestimmt. In einer zweiten vertiefenden Analyse wurde gezeigt, dass die Verteilung des H-Score der luminalen Hälfte der Intermediärschicht größer ist als die der unteren Hälfte der IM-Schicht. Dies bestätigt noch einmal, dass die Färbung fast ausschließlich in der luminalen Hälfte der Intermediärschicht und vor allem der Luminalschicht stattfindet und die Deckschichtzellen des Urothels dort ausdifferenziert sind.

DeltaNp63

Die Verteilung der von DeltaNp63-angefärbten Zellen erstreckt sich vorrangig auf die basale und intermediäre Schicht. Die Luminalschicht ist praktisch nicht gefärbt. Bei der vertiefenden Analyse der Intermediärschicht konnte die Verteilung der Eindringtiefen bestimmt werden. Im Gegensatz zu Uroplakin II dringen die gefärbten Zellen von der basalen Schicht aus in die Intermediärschicht ein. Durch die qualitative Untersuchung des Grenzverlaufs, der Ausläuferspitzen und der Anzahl einzelner gefärbter Zellen kann

gesagt werden, dass die Verteilung weit in die Intermediärschicht hineinragt, wobei der Grenzverlauf meist recht flach ist. Daher sind die Ausläuferspitzen selten sonderlich ausgeprägt. Einzelne gefärbte Zellen im ansonsten nicht-gefärbten Bereich treten auf, sind aber in der Minderheit. Spülzytologien von Zellen mit DeltaNp63 aus der Luminalschicht oder aus der oberen Intermediärschicht zu extrahieren und zu analysieren, könnte weitere Hinweise für ein besseres Verständnis dieser Zellen liefern.

KLF-5

In der ersten Analyse der drei Urothelschichten fällt KLF-5 durch eine fast gleichförmige Färbung in allen drei Schichten auf. Erst durch die zweite vertiefende Analyse der drei Schichten wird eine genauere Differenzierung möglich. Betrachtet man statt des H-Scores nur die Zellen mit Färbeintensität 3, erhält man eine Verteilung, die eine stärkere Färbung der luminalen Schicht belegen. Der H-Score bildet einen Gesamtwert über alle vorkommenden Intensitäten und daher werden die einzelnen Intensitäten verwaschen. Wenn nur die stark gefärbten Zellen betrachtet werden sollen, kann man durch die Auswahl der Färbeintensitätsstufe 3 eine bessere Differenzierung zwischen den Schichten erhalten. Durch die qualitative Auswertung der Intermediärschicht nach den Kriterien „flächige Färbung“ und „einzelne gefärbte Zellen“ in den beiden Hälften der Intermediärschicht, kann die Aussage getroffen werden, dass eine flächige Färbung häufiger in der basalen IM-Hälfte auftritt, während sich einzelne gefärbte Zellen häufiger in der luminalen Hälfte finden.

Es konnte eine mögliche Korrelation von KLF-5-positiven Zellen mit einem entzündlichen Geschehen wie es bei Blasenkrebs gegeben ist, aufgezeigt werden. Da jedoch nur zwei Präparate ohne maligne Anamnese verfügbar waren, sollte diese Aussage noch weiter erforscht werden.

Das Wissen über die Verteilungen dieser Marker im Urothel kann als Grundlage für weitere Forschungen ggf. zur Stammzellverteilung bzw. genauere Zellverteilung von proliferierenden Zellen im Urothel, verwendet werden. Das Fernziel wäre die Nutzbarmachung (adulter) Stammzellen für therapeutische Ansätze beispielsweise für die Behandlung von urothelialen Tumoren. Auch für das Tissue Engineering bei einer Blasenrekonstruktion ist das Wissen über die Verteilung von proliferierenden Zellen mit

Stammzeleigenschaften im Urothelgewebe relevant. Für die Charakterisierung als Stammzelle ist die Verteilung der untersuchten Marker ein erster Schritt. Es sollten jedoch weitere Studien, vor allem mit KLF-5 durchgeführt werden, die ihren Fokus stärker auf das Verständnis der Zellprozesse und -proteine bei der Zellproliferation legen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich durch immunhistochemische Färbungen die drei Zellmarker DeltaNp63, Uroplakin II und KLF-5 in den Schichten des Urothelgewebes unterschiedlich stark nachweisen lassen. Die Verteilung dieser Marker konnte auch analysiert und näher beschreiben werden, vorherige Forschungen wurden bestätigt.

VI Anhang

Verwendete Abkürzungen

AG	Antigen
AK	Antikörper
BZ	Basalzellen
CK	Cytokreatin
CX	Cystektomie
DZ	Deckzellen
EGF-R	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
ELF-3	Epithel-like transcription factor 3
GATA 3	Zinkfinger-Tanskriptionsprotein
GRHL3	Grainy head like 3
H.E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IM	Intermediärschicht
KLF-5	Krüppel-like factor 5
Lpr	Lamina propria
pandas	Programmierbibliothek für python
PPAR-y	Peroxisome proliferator activated receptors
python	Programmiersprache
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (Polymerase Kettenreaktion)
seaborn	Programm zur Visualisierung in python
TGF- β	Transforming Growth-Factor- β

VII Tabellen und Abbildungen

VII.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Zellschichten des Urothels, DZ = Deckzellen, IM = Intermediärschicht, BZ= Basalzellen, Lpr = Lamina propria, Abbildung verändert nach (Lüllmann-Rauch, 2012).....	6
Abbildung 2: Präparat einer Harnblase mit Harnblasenkarzinom (Kühs, 2018).....	17
Abbildung 3: Mikrotom Leica RM 2235.....	17
Abbildung 5: Kalibrationskala am Beispiel von DeltaNp63. Der rote Pfeil zeigt die für den Färbegrad relevante Zelle an.....	24
Abbildung 6: Ausschnitt aus dem Urothelgewebe, das mit DeltaNp63 angefärbt wurde.	24
Abbildung 7: Bestimmung des Mittelwertes bei zwei Werten und im Falle von drei Werten, wenn der Extremste verworfen wird.....	25
Abbildung 7: Hier werden die in der zweiten Analyse verwendeten DeltaNp63 Metriken schematisch dargestellt: Der Anteil der gefärbten Schicht (50%), die Anzahl gefärbter Zellen im ungefärbten Bereich (3), der qualitative Verlauf der Färbung (Kategorie 3 - spitze Ausläufer) und der maximal gefärbte Anteil der Spitzen (70 %)	29
Abbildung 8: Expression von Uroplakin II in den verschiedenen Ebenen des Urothels, dargestellt anhand des H-Scores.....	33
Abbildung 9: Expression von DeltaNp63 in den verschiedenen Ebenen des Urothels, dargestellt anhand des H-Scores.....	33
Abbildung 10: Expression von KLF-5 in den verschiedenen Ebenen des Urothels, dargestellt anhand des H-Scores.....	34
Abbildung 11: Verteilung des H-Scores in den verschiedenen Schichten für Uroplakin	35
Abbildung 12: Verteilung des H-Scores in den verschiedenen Schichten für DeltaNp63	36
Abbildung 13: Verteilung des H-Scores in den verschiedenen Schichten für klf-5.....	37
Abbildung 14: Relative Eindringtiefe des mit Uroplakin II gefärbten Bereichs in die Intermediärschicht ausgehend von der luminalen Schicht.	38
Abbildung 15: Vergleich der Verteilung des H-Scores für die komplette IM-Schicht, die obere und untere Hälfte als Histogramm (a) und als Boxplot (b)	40
Abbildung 16: Relative Eindringtiefe des mit DeltaNp63-gefärbten Bereichs in die Intermediärschicht ausgehend von der basalen Schicht.	41
Abbildung 17: Anzahl einzelner Zellen im nicht-gefärbten Bereich in der Intermediärschicht für DeltaNp63	42
Abbildung 18: Häufigkeit des Vorkommens der Kategorie, die den Verlauf der Färbung an der Grenzschicht beschreibt.	43
Abbildung 19: Differenz zwischen den Ausläuferspitzen des gefärbten Bereichs und dem Mittelwert des Grenzverlaufs in Prozent der gesamten Schichtdicke.	44
Abbildung 20: Anteil der gefärbten Zellen (Intensität 2 und 3) an der Gesamtzahl der Zellen	45
Abbildung 21: Anteil der stark gefärbten Zellen (Intensität 3) an der Gesamtzahl der Zellen	46

Abbildung 22: a) Anzahl Proben, die in der basalen, luminalen oder beiden Schichten der IM-Schicht angefärbt wurden. b) Anzahl Proben, bei denen in der basalen, luminalen oder beiden Schichten der IM-Schicht einzelne stark gefärbte Zellen auftreten.	47
Abbildung 23: Anteile gefärbter/nicht gefärbter a) Bereiche der IM-Schicht, b) einzelner Zellen, c) entweder gefärbter Bereich oder einzelner Zellen in der Intermediärschicht .	48
Abbildung 24: Korrelationsmatrix zwischen den qualitativ erhobenen Größen. Angegeben sind der Korrelationskoeffizient r und die Signifikanz der Korrelation p. Signifikanten Korrelationen ($p < 0,05$) sind blau umrandet dargestellt.	49
Abbildung 25: Verteilung der H-Scores in den drei Urothelschichten. Maligne Proben sind in blau, das Präparat mit einem Harnblasendivertikel in rot und das Präparat mit chronischer Zystitis in grün dargestellt.	50

VII.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Detaillierte TNM Klassifikation der Patienten	15
Tabelle 2 Übersicht der Grading-Einteilung der Tumorzellen	15
Tabelle 3: Verwendete Antikörper beziehungsweise Marker	19
Tabelle 4 Verwendete Kits	20
Tabelle 5 Mittelwerte der H-Scores der IM-Schicht für Uroplakin	39
Tabelle 6 Mittelwerte des Anteils stark gefärbter Zellen (Intensität 3).....	46
Tabelle 7: Prozentsatz in den IM-Schichthälften, die das jeweilige Merkmal erfüllen.....	48
Tabelle 8: H-Scores für die malignen Proben (Mittelwert und Standardabweichung), das Präparat mit Harnblasendivertikel und das Präparat mit Zystitis.....	51
Tabelle 9: Z-Score für die Abweichung der Präparate vom Mittelwert der malignen Präparate	51

VIII Literaturverzeichnis

- Abcam plc. (10. 12 2020). Von Anti-p40 - DeltaNp63 antibody (ab167612): <https://www.abcam.com/p40-deltanp63-antibody-ab167612.html> abgerufen
- Al-Kurdi, B. (May-June 2017). Hierarchical transcriptional profile of urothelial cells development and differentiation . *Differentiation*, S. 10-20.
- Atala, A., Bauer, S. B., Soker, S., Yoo, J. J., & Retik, A. B. (2006). Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *The Lancet*, 367(9518), S. 1241-1246.
- AWMF. (2019). *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms*.
- B.B. McConnell, A. G. (2007). The diverse functions of Krüppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology. *willey*, S. 549-557.
- Boenisch, T. (2003). Färbemethoden Detektionssysteme. In *Handbuch immunchemische Färbemethoden* (S. 34-36). Carpinteria.
- Catto JW, H. A. (Jun 2006). Multifocal urothelial cancers with the mutator phenotype are of monoclonal origin and require panurothelial treatment for tumor clearance. *J Urol*, S. 2323-30.
- Chan, K. S., Volkmer, J.-P., & Weissman, I. (September 2010). *Current Opinion in Urology, Vol 20- Issue 5*. Wolters Kluwer.
- Chiang CT, C. W. (April 2009). Overexpression of delta Np63 in a human nasopharyngeal carcinoma cell line downregulates CKIs and enhances cell proliferation. *J Cell Physiol*. .
- DeSaix, P. B. (2013). *Anatomy & Physiology*. OpenStax.
- DETRE, S. J. (1995). M. . A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *Journal of clinical pathology*, S. 876-878.
- Djaballah, B. B. (2012). "A Simple Method for Analyzing Actives in Random RNAi Screens: Introducing the "H Score" for Hit Nomination & Gene Prioritization". *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, S. 686.
- Efeyan A, S. M. (28. May 2007). p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*.
- Fagerberg, L. H. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & cellular proteomics*. *MCP*, 13(2), S. 397–406.
- Feil, G. D. (2011). From tissue engineering to regenerative medicine in urology--the potential and the pitfalls. *Advanced drug delivery reviews*, S. 375–378.
- Ferreira, K., Gomes, E., Lima Filho, J. L., Castelletti, H., & Martins, D. (2018). Bioinformatics analysis of non-synonymous variants in the KLF genes related to cardiac diseases. *Gene*, S. 650.
- Gao Y, W. K. (2015). Beyond proliferation: KLF5 promotes angiogenesis of bladder cancer through directly regulating VEGFA transcription. *Oncotarget*, S. 43791-43805.
- Gerhard Feil, S. M.-D. (2008). Immunoreactivity of p63 in Monolayered and In Vitro Stratified Human Urothelial Cell Cultures Compared with Native Urothelial Tissue. *European Urology*, S. 1066-1073.

- Hubert Rehm, T. L. (1996). *Der Experimentator Proteinbiochemie Proteomics*. Heidelberg: Springer.
- J Yu, J. H. (1994). Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins. *J Cell Biol*, S. 171–182.
- J. Hatina, W. A. (June 2012). Stem cells in urothelium and urothelial cancer. Pilsen. Kühs, U. (2018). eigene Aufnahme.
- Karni-Schmidt, O. C.-M.-D.-C.-C. (2011). Distinct expression profiles of p63 variants during urothelial development and bladder cancer progression. *The American journal auf pathology*, S. 1350-1360.
- Lüllmann-Rauch, R. (2012). *Taschenlehrbuch Histologie 4. Auflage*. Stuttgart: Thieme.
- Langer R, V. J. (14. May 1993). Tissue engineering. *Science* , S. 920–926.
- Larsson HM, G. F. (2014). Clonal, Self-Renewing and Differentiating Human and Porcine Urothelial Cells, a Novel Stem Cell Population. *PLoS ONE*, 9(2).
- Li J, L. L. (Feb 2021). Roles of Krüppel-like factor 5 in kidney disease. *J Cell Mol Med*.
- Li JC, C. Q. (July 2021). The Partial Role of KLF4 and KLF5 in Gastrointestinal Tumors. *Gastroenterol Res Pract*.
- Li W, L. Y. (Dec 2014). Uroplakin II is a more sensitive immunohistochemical marker than uroplakin III in urothelial carcinoma and its variants. *Oxford Academic*.
- Liao, Y. (December 2018). Uroplakins play conserved roles in egg fertilization and acquired additional urothelial functions during mammalian divergence. *Molecular Biology of the Cell*(Vol. 29, No. 26).
- Liu R, D. J. (2013). Role of KLF5 in hormonal signaling and breast cancer development. *Vitam Horm*, S. 213-225.
- Luo Y, C. C. (2021). The roles and regulation of the KLF5 transcription factor in cancers. *Cancer Sci*.
- M. Z. Leivo, P. J. (Oktober 2016). A combination of p40, GATA-3 and uroplakin II shows utility in the diagnosis and prognosis of muscle-invasive urothelial carcinoma. *Pathology*, S. 543–549.
- Maike de Wit, T. B.-O.-L. (März 2019). <https://www.onkopedia.com>. Abgerufen am 06 2020 von <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/blasenkarzinom-urothelkarzinom/@@guideline/html/index.html#litID0E3GBI>
- Manski, D. m. (2019). *Urologie Lehrbuch*. Deutschland: Manski.
- McCarty KS Jr, M. L. (1985). Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med*, S. 716-721.
- Moad, M. P. (6. April 2013). A Novel Model of Urinary Tract Differentiation, Tissue Regeneration, and Disease: Reprogramming Human Prostate and Bladder Cells into Induced Pluripotent Stem C. *europaean urology*.
- Moll R, L. A. (Feb 1992). Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol*.
- Nandan, M. O. (2009). The role of Krüppel-like factors in the reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Histology and histopathology*, 24(10), S. 1343–1355.
- Napoli, M. W. (2022). ΔNp63 regulates a common landscape of enhancer associated genes in non-small cell lung cancer. *Nature Communications*, S. 614.
- Negrete HO, L. J., & Berg J, L. S. (1996). Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *American Journal of Physiology*, S. 886-894.

- Nekulova, M. H. (2016). Δ Np63 α expression induces loss of cell adhesion in triple-negative breast cancer cells. *BMC Cancer*, S. 782 .
- Nettesheim, P., & Oehlert, W. (1962). Die Wirkung des Wachstumshormons auf die DNS-Synthese in den Wechselgeweben der weißen Maus. *Beitr. path. Anat.*, 126, S. 395-412.
- Nieuwenhuijzen JA, P. F. (2005). *Survival after bladder-preservation with brachytherapy versus radical cystectomy; a single institution experience*. European Urology.
- Oishi Y, M. I. (2005). Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metabolism*, S. Pages 27-39.
- Onkologie, L. (September 2019). *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms*. Deutschland.
- Pignon JC, G. C. (14. May 2013). p63-expressing cells are the stem cells of developing prostate, bladder, and colorectal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, S. 8105-8110.
- Puneet Khandelwal, S. N. (Pages F1477-F1501. December 2009). Cell biology and physiology of the uroepithelium. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 297, Issue 6.
- R. Hautmann, J. G. (2014). *Urologie*. Heidelberg: Springer, 5. Auflage.
- Renz, H. (2009). *Praktische Labordiagnostik. Ein Lehrbuch zur Laboratoriumsmedizin, Klinischen Chemie und Hämatologi. de Gruyter*, S. 531ff.
- Robert Koch Institut. (2016). *Von Zentrum für Krebsregisterdaten*: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Harnblasenkrebs/harnblasenkrebs_inhalt.htm abgerufen
- Robert Koch Institut. (2017). *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- Robert Koch-Institut. (2016). *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. Berlin: Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut .
- Shamblott M, A. J. (2001). Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. S. 113–118.
- Soyuer, I. e. (2009). Which urine marker test provides more diagnostic value in conjunction with standard cytology- ImmunoCyt/uCyt+ or Cytokeratin 20 expression. *Diagn Pathol*, S. 20.
- spektrum.de. (28. Juli 2019). *Spektrum.de*. Von Immunhistochemie - Lexikon der Biologie: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/immunhistochemie/33808> abgerufen
- Steurer, S. R. (2021). p63 expression in human tumors and normal tissues: a tissue microarray study on 10,200 tumors. *Biomark Res* 9.
- The process of malignant transformation universally entails genetic damage and oncogenic signaling, t. s. (28 May 2007). p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*.
- Vassilev LT, V. B. (2. Jan 2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*.
- Vlajnic, T. B. (2022). Diagnostische und prädiktive Marker in der Harntraktzytologie. *Pathologie* 43, S. 99-104.

- Wu XR, M. J.-T. (1995). Selective interactions of UPIa and UPIb, two members of the transmembrane 4 superfamily, with distinct single transmembrane-domained proteins in differentiated urothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, S. 29752–29759.
- Xue-Ru Wu, M. M.-T. (06. Juni 1990). Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III. Molecular markers of urothelial differentiation. Department of Dermatology, Kaplan Cancer Center, New York University School of Medicine., New York, USA.
- Yang S, F. T. (2021). KLF5, a Novel Therapeutic Target in Squamous Cell Carcinoma. *DNA Cell Biol*, S. 1503-1512.
- Yang, A. K. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular cell* 2/3, S. 305–316.
- Yu Z, X. J. (2015). Epithelium-Specific Ets-Like Transcription Factor 1, ESE-1, Regulates ICAM-1 Expression in Cultured Lung Epithelial Cell Lines. . *Mediators Inflamm*.
- Zhang J, R. N. (Jul 2002). Identification of human uroplakin II promoter and its use in the construction of CG8840, a urothelium-specific adenovirus variant that eliminates established bladder tumors in combination with docetaxel. *Cell Genesys*.

IX Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, Michaela Mann, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Die Idee zur Konzeption dieser Studie wurde im Bereich Urologie der Universitätsklinik für Urologie Tübingen entwickelt. Daran beteiligt waren Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl, PD Dr. med. Bastian Amend, Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter und Ursula Kühs.

Bei der Anfertigung der immunhistochemischen Färbung war Frau Ursula Kühs als MTA, bis zu ihrem Rentenantritt, im Uro-Onkologischen Labor der Klinik beteiligt.

Alle weiteren Daten wurden von mir selbst erhoben. Die Auswertung und Interpretation aller Daten geschahen durch mich.

Herr Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter und Herr PD Dr. med. Bastian Amend aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen haben diese Arbeit aktiv betreut, gaben Hilfestellung bei den Analysen, sowie Inspirationen und Korrekturvorschläge bei der schriftlichen Ausarbeitung der Dissertationsschrift.

Michaela Mann

09.08.2022

X Danksagung

Zuerst möchte ich dem ärztlichen Direktor der Urologischen Klinik, Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl, für die Überlassung des Themas danken.

Meinen größten Dank möchte ich ganz besonders PD Dr. Bastian Amend, für die Begleitung der vorliegenden Arbeit und für seine Bereitschaft mich zu betreuen aussprechen. Er stand mir immer bei Fragen persönlich als Ansprechpartner zur Verfügung und konnte mir in schwierigen Phasen Hilfestellung leisten. Dafür gebührt ihm mein größter Dank und meine volle Anerkennung.

Einen Dank möchte ich Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter aussprechen. Für seine fachkundige Hilfe in vielen Fragen und seinem Engagement war er stets bemüht diese Promotion zu ermöglichen. Er war mit wertvollen Tipps und Anregungen zur Stelle. Bei Problemen war er vorerst die erste Anlaufstelle und hatte mit seiner selbstlosen Art stets Zeit für ungeklärte Fragen, selbst wenn er dafür seine Freizeit opfern musste.

Außerdem möchte ich dem ganzen Team des urologischen Labors für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken. Hier sei besonders Frau Ursula Kühs hervorgehoben, die mit ihrer unendlichen Geduld und liebenswürdigen Art nicht nur bei methodischen Fragen mir zur Seite stand.

Einen großen Dank möchte ich auch den Korrekturlesenden der vorliegenden Arbeit aussprechen.

Und last but not least möchte ich einen ganz herzlichen Dank an meinen Lebenspartner Christopher Schmitt aussprechen. Der mich immer motivierte und mich, wo es nur möglich war, geduldig unterstützte. Dies war mir stets ein wertvoller Antrieb.