

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderchirurgie und Kinderurologie mit Poliklinik

**Analyse zu Expression und Funktion des
„non-functional P2X₇ Rezeptors“
in kindlichen soliden Tumoren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hein, Anna Sophie

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Fuchs

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

Tag der Disputation: 21.07.2022

Meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Kindliche solide Tumoren	1
1.2 Purinerge Rezeptoren	3
1.2.1 P2X Rezeptoren	6
1.2.2 P2X ₇ Rezeptor	11
1.2.3 Non-functional P2X ₇ Rezeptor	16
1.3 Zielsetzung der Arbeit	21
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte	23
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.2 Geräte	24
2.1.3 Kulturmedien und Reagenzien	25
2.1.4 Programme	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellkultur	26

2.2.2 Antikörper gegen den nf-P2X ₇ Rezeptor.....	34
2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)	36
2.2.4 Immunhistochemie (IHC).....	43
2.2.5 Analyse von Patientencharakteristika von Patienten mit extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren.....	50
2.2.6 Calcium-Messung	51
2.2.7 Transwell Migration Assay.....	53
2.2.8 Colony Forming Assay (CFA).....	55
2.2.9 Statistische Auswertung	56
3 ERGEBNISSE	58
3.1 Das Expressionsmuster des nf-P2X ₇ Rezeptors in extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren.....	58
3.1.1 Durchflusszytometrische Analyse des Expressionsmusters des Membranrezeptors nf-P2X ₇ in kindlichen soliden Tumoren.....	58
3.1.2 Immunhistochemische Analyse des Expressionsmusters des nf-P2X ₇ Rezeptors in kindlichen soliden Tumoren.....	66
3.2 Analyse von Patientencharakteristika von Patienten mit extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren.....	72
3.3 Analyse des Effektes von Antikörpern gegen den nf-P2X ₇ Rezeptor	77
3.3.1 Calcium-Messung	78
3.3.2 Transwell Migration Assay.....	80
3.3.3 Colony Forming Assay (CFA).....	81

4 DISKUSSION	83
4.1 Expressionsmuster des nf-P2X ₇ Rezeptors in extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren	84
4.2 Patientencharakteristika von Patienten mit extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren	89
4.3 Effekte der nf-P2X ₇ Antikörper Applikation in kindlichen soliden Tumoren	91
4.4 Limitation.....	98
4.5 Ausblick.....	100
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	103
6 LITERATURVERZEICHNIS	105
7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	121
8 DANKSAGUNG.....	122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentuale Verteilung von pädiatrischen Krebserkrankungen und soliden Tumoren bei Kindern bis zum 14. Lebensjahr (modifiziert nach Allen-Rhoades et al., 2018)	1
Abbildung 2: Chemische Strukturformel von Purin und seiner Bestandteile Pyrimidin und Imidazol (erstellt nach Franzen and Tois, 2003)	3
Abbildung 3: Chemische Strukturformel von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) (erstellt nach Agteresch et al., 1999)	4
Abbildung 4: Einteilung purinerger Rezeptoren (erstellt nach Burnstock, 2007)	5
Abbildung 5: Aufbau einer P2X Untereinheit (erstellt nach Burnstock, 2007)	6
Abbildung 6: Räumliche Konfiguration der P2X Rezeptoren am Beispiel des Zebrafisch P2X ₄ Rezeptors (Kawate et al., 2009, Hattori and Gouaux, 2012)	7
Abbildung 7: Konfigurationen des P2X Rezeptors (modifiziert nach Peverini et al., 2018)	9
Abbildung 8: nf-P2X ₇ Rezeptor mit ATP-Bindungsstellen und extrazellulär lokalisiertem Epitop E200 (Biosceptre International Limited, 2017)	17
Abbildung 9: Mechanismus der Tumorzellen durch Aufrechterhaltung der Überlebensvorteile und Umgehung der Initiierung von Zelltod durch Expression von nf-P2X ₇ bei erhöhter ATP-Konzentration im Tumormikromilieu (kurz TME von engl. <i>tumour microenvironment</i>) (modifiziert nach Gilbert et al., 2019)	20
Abbildung 10: Wachstumsmuster der Zelllinie RD	28
Abbildung 11: Wachstumsmuster der Zelllinie RH30	29
Abbildung 12: Prinzip der durchflusszytometrischen Messung (A) und Geometrie der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenz (B) (Sack et al., 2007)	37
Abbildung 13: Exzitations- & Emissionspektren von 7AAD und FITC	38
Abbildung 14: Behandlungsansätze für durchflusszytometrische Messung	40
Abbildung 15: Exemplarische Dot-Plots einer durchflusszytometrischen Messung der BIL03s FITC und 7AAD (PerCP-Cy5-5-A) Färbung der RMA-Zelllinie RH30	41
Abbildung 16: Histogramme und Overlay einer exemplarischen durchflusszytometrischen Messung der RMA-Zelllinie RH30	42

Abbildung 17: Indirekte immunhistochemische Färbung unter Verwendung der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode	48
Abbildung 18: Einteilung der nf-P2X ₇ Expressionsstärke anhand der Stadien 0 bis 3	50
Abbildung 19: Aufbau des Transwell Migration Assays	53
Abbildung 20: Expressionsanalyse des nf-P2X ₇ Rezeptors auf kindlichen soliden Tumorzelllinien des Rhabdomyosarkoms und des malignen Rhabdoid Tumors.....	59
Abbildung 21: Expressionsanalyse des nf-P2X ₇ Rezeptors auf kindlichen soliden Tumorzelllinien des hepatozellulären Karzinoms (HCC) und Hepatoblastoms (HB)	60
Abbildung 22: Expressionsanalyse des nf-P2X ₇ Rezeptors in kindlichen soliden Tumorzelllinien des Neuroblastoms.....	61
Abbildung 23: Expressionsanalyse des nf-P2X ₇ Rezeptors auf kindlichen soliden Tumorzelllinien des Ewing-Sarkoms und Osteosarkoms.....	62
Abbildung 24: Expressionsanalyse des nf-P2X ₇ Rezeptors in benignen Zellen.....	63
Abbildung 25: Expressionsanalyse des nf-P2X ₇ Rezeptors auf kindlichen soliden Tumorentitäten	65
Abbildung 26: Immunhistochemische Färbungen auf den nf-P2X ₇ Rezeptor im embryonalen (links) und alveolären Rhabdomyosarkom (mittig) sowie in gesunder Skelettmuskulatur ohne Farbreaktion (rechts)	67
Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung auf den nf-P2X ₇ Rezeptor im hepatozellulären Karzinom (links), Hepatoblastom (mittig) und gesunder Leber ohne Farbreaktion (rechts).....	68
Abbildung 28: nf-P2X ₇ Immunhistochemie und vergleichende H&E-Färbung in verschiedenen Neuroblastomen	69
Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung auf den nf-P2X ₇ Rezeptor im Wilms-Tumor mit vergleichender H&E-Färbung	70
Abbildung 30: Stadien der nf-P2X ₇ Expressionsstärke in kindlichen soliden Tumorproben	71
Abbildung 31: nf-P2X ₇ Expression in immunhistochemisch untersuchten kindlichen soliden Tumoren	72
Abbildung 32: ATP-induzierte Calcium-Messung der RMS-Zelllinien RD und RH30	78

Abbildung 33: Einfluss des P2X₇ Antagonisten KN62 und nf-P2X₇ Antikörper auf den ATP-induzierten Calciumhaushalt in den RMS-Zelllinien RD und RH30... 79

Abbildung 34: Transwell Migration der RMS-Zelllinien RD (A) und RH30 (B) bei unterschiedlichen Behandlungen mit nf-P2X₇ Antikörper und BzATP 80

Abbildung 35: Colony Forming Assay (CFA) der RMS-Zelllinien RD (A&B) und RH30 (C&D) mit nf-P2X₇ Antikörper und BzATP-Behandlung 81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Molekulare Mechanismen und Modifikationen des P2X ₇ Rezeptors mit fehlender oder beeinträchtigtger Makroporenfunktion.....	15
Tabelle 2: Übersicht der nf-P2X ₇ Rezeptor Expression in Tumorentitäten von Erwachsenen.....	18
Tabelle 3: Zelllinien.....	26
Tabelle 4: Volumen des Zellkulturmediums in entsprechenden Zellkulturflaschen.....	30
Tabelle 5: Verwendete Zellzahlen der einzelnen Tumorzelllinien in den jeweiligen Versuchen.....	32
Tabelle 6: Übersicht über verwendete nf-P2X ₇ Antikörper.....	36
Tabelle 7: Herstellung einer Hämalaun Lösung.....	45
Tabelle 8: Herstellung einer 1 % wässrigen Eosin Vorratslösung.....	45
Tabelle 9: Herstellung eines Citratpuffers.....	46
Tabelle 10: TRIS Waschpuffer.....	46
Tabelle 11: Verwendete Antikörper Konzentrationen in der IHC.....	47
Tabelle 12: Übersicht über weitere analysierte Patientencharakteristika von kindlich soliden Tumorentitäten	51
Tabelle 13: Durchschnittliche Expression und mediane Fluoreszenzintensität (MFI) des nf-P2X ₇ Rezeptors auf benignen Zellen und kindlichen soliden Tumorentitäten.....	64
Tabelle 14: Auflistung der Patientencharakteristika bei Patienten mit alveolärem (links) und embryonalem Rhabdomyosarkom (rechts)	73
Tabelle 15: Auflistung der Patientencharakteristika bei Patienten mit Lebertumoren im Vergleich: Hepatozelluläres Karzinom (links) und Hepatoblastom (rechts)	74
Tabelle 16: Auflistung der Patientencharakteristika bei Patienten mit Neuroblastom	75
Tabelle 17: Auflistung der Patientencharakteristika bei Patienten mit Wilms-Tumor	76

Abkürzungsverzeichnis

~	etwa
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Å	Ångström (Längeneinheit)
AB	Antikörper (von engl. <i>antibody</i>)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AFP	Alpha-Fetoprotein
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BzATP	Benzoylbenzoyl-Adenosintriophosphat
BZK	Basalzellkarzinom
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Ca	Karzinom
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CAR-T-Zelltherapie	chimäre Antigenrezeptor-T-Zelltherapie
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4
CDR	komplementaritätsbestimmende Regionen (von engl. <i>complementarity determining regions</i>)
CFA	Koloniebildungsassay (von engl. <i>colony forming assay</i>)
CFTR	von engl. <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
DAMP	von engl. <i>danger associated molecular pattern</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
ED	Erstdiagnose
ELISA	von engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
FCS	Fetales Kalbserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (von engl. <i>forward side scatter</i>)
g	Erdbeschleunigung
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
h	Stunde
H-Kette	schwere Kette (von engl. <i>heavy chain</i>)
H&E-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HB	Hepatoblastom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
K ⁺	Kalium
Kap.	Kapitel
L-Kette	leichte Kette (von engl. <i>light chain</i>)
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
mIBG	meta-Iodobenzylguanidine
mind.	mindestens
mM	Millimol
mRT	maligner Rhabdoid Tumor
n	Anzahl der Einzelversuche
N-Terminus	Amino-Terminus

Na ⁺	Natrium
NB	Neuroblastom
nf-P2X ₇ Rezeptor	non-functional P2X ₇ Rezeptor
NMDG ⁺	N-Methyl-D-Glucamin
p	Standardabweichung
P2RX7	kodierendes Gen für P2X ₇ Rezeptor
PBMCs	von engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
RMA	Alveoläres Rhabdomyosarkom
RME	Embryonales Rhabdomyosarkom
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S-S	Disulfidbrücke
SIOP	Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique
siRNA	von engl. <i>small interfering ribonucleic acid</i>
sog.	sogenannt
SSC	Seitwärtsstreulicht (von engl. <i>sideward light scatter</i>)
TM	Transmembrandomäne
TME	Tumormikromilieu (von engl. <i>tumour microenvironment</i>)
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (von engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
WT	Wilms-Tumor
zfP2X ₄	P2X ₄ Rezeptor des Zebrafischs
7AAD	7-Amino-Actinomycin D

1 EINLEITUNG

1.1 Kindliche solide Tumoren

Solide Tumoren im Kindesalter beschreiben eine heterogene Gruppe von nicht-hämatologischen, extrakraniellen Tumorentitäten, welche etwa 40 % aller pädiatrischen Krebserkrankungen ausmachen (siehe Abb. 1) (Allen-Rhoades et al., 2018). In Deutschland erkranken rund 15 von 100 000 Kindern und Jugendlichen pro Jahr an einem soliden Tumor (Fuchs, 2012).

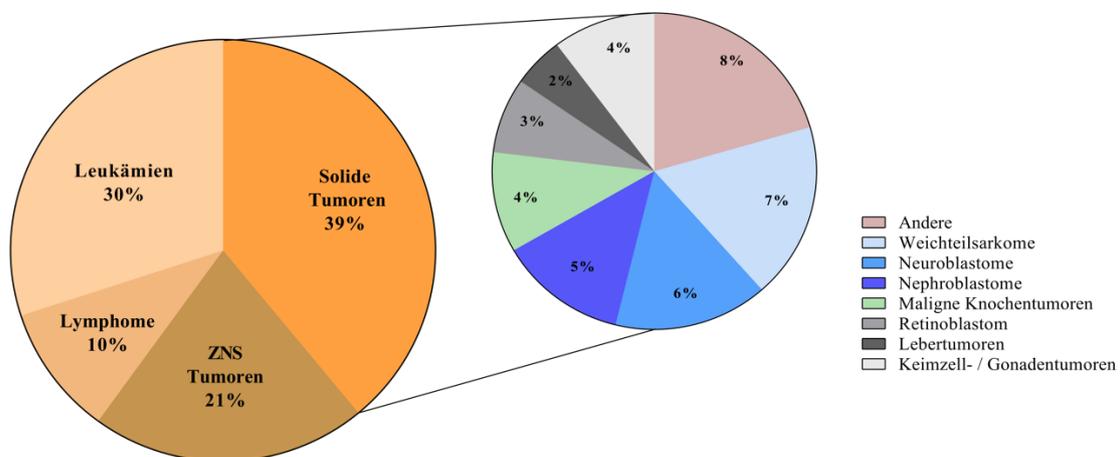


Abbildung 1: Prozentuale Verteilung von pädiatrischen Krebserkrankungen und soliden Tumoren bei Kindern bis zum 14. Lebensjahr (modifiziert nach Allen-Rhoades et al., 2018)

Zu den häufigsten kindlichen soliden Tumoren (siehe Abb. 1) gehören unter anderem Weichteilsarkome, Neuroblastome, Nephroblastome (Wilms-Tumoren), maligne Knochentumoren (Osteosarkome und Ewing-Sarkome) und Lebertumoren (z.B. Hepatoblastom) (Allen-Rhoades et al., 2018).

Insgesamt unterscheiden sich solide Tumorentitäten im Kindesalter sowohl in klinischen Eigenschaften als auch im zellulären Ursprung grundlegend von erwachsenen Tumorentitäten (Schmidt et al., 2018, Lee, 2018, Stewart et al., 2016). Sie entstehen vor allem durch Alterationen während des normalen Wachstums oder der Organogenese und sind meist embryonalen Ursprungs. Durch diese besondere Tumorbilogie ergeben sich eine große morphologische

Heterogenität und diverse therapeutische Herausforderungen (Schmidt et al., 2018, Allen-Rhoades et al., 2018).

Die Therapie solider Tumoren im Kindesalter gestaltet sich abhängig der Tumorentität als multidisziplinäres Konzept aus kurativer Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie (Lee, 2018, Schmidt et al., 2018). Dabei wird in vielen pädiatrischen Behandlungsschemata eine neoadjuvante Chemotherapie angewendet (Lewis and Benedetti, 1997, Fuchs, 2012, Schmidt et al., 2018). Zudem wurden in das multidisziplinäre Konzept weitere Therapiemodalitäten wie beispielsweise die Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Knochenmarktransplantation oder zielgerichtete Therapien (engl. *targeted therapies*) integriert (Fuchs, 2012). Insbesondere die Chirurgie hat in den letzten Jahrzehnten eine Reihe von Innovationen erfahren wie beispielsweise die nierenerhaltende Tumorsektion bei unilateralen Wilms-Tumoren oder die thorakoskopische Resektion von Lungenmetastasen mithilfe einer präoperativen CT-gestützten Markierung (Schmidt et al., 2018).

In den letzten Jahrzehnten erfolgte eine Verbesserung der Gesamtüberlebensrate in nahezu allen kindlichen soliden Tumorentitäten von 20 auf etwa 75 % (Schmidt et al., 2018, Hudson et al., 2014), sodass zu keinem anderem Zeitpunkt höhere Überlebensraten dokumentiert sind als heute (Marron et al., 2016, Smith et al., 2014, Deutsches Kinderkrebsregister, 2018). Trotzdem stellen Tumorerkrankungen eine der häufigsten Todesursachen im Kindesalter dar (Fuchs, 2012). Vor allem bei einem Tumorrezidiv oder fortgeschrittenen Tumorleiden ist die Prognose mit Mortalitätsraten von mindestens 75 % bislang immer noch infaust (Marron et al., 2016, Ferrari et al., 2015, Leary et al., 2013, Oberlin et al., 2008, Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology et al., 2006, Lee, 2018). Darüber hinaus ist die Therapie durch mutilierende Operationen sowie eminente Nebenwirkungen bei Radiatio- und Chemotherapie trotz steigender Überlebensraten mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität verbunden (Dantonello et al., 2009). Außerdem stellt die Behandlung von nicht unerheblichen Spätfolgen

durch die bisherigen Therapien eine zusätzliche Herausforderung dar (Schmidt et al., 2018).

Eine Etablierung neuer effektiver und gleichzeitig tolerabler Therapien ist daher von dringender Notwendigkeit. Dies setzt das tiefgehende Verständnis der Tumorbiologie voraus (Lee, 2018).

Aktuell sind Zielgene bzw. Zielproteine (sog. *Targets*) und Signalwege von Tumorzellen, welche kritische Funktionen wie eine Modifizierung von Zelltodmechanismen oder das signifikante Proliferations- und Metastasierungspotential beeinflussen, im Zentrum der medizinischen Forschung. Ein neuer ubiquitärer und spezifischer Ansatzpunkt ist der purinerge non-functional P2X₇ (nf-P2X₇) Rezeptor, welcher im Fokus dieser Forschungsarbeit steht (Barden et al., 2014).

1.2 Purinerge Rezeptoren

Bei Purinen (siehe Abb. 2) handelt es sich um organische, heterozyklische, aromatische Stoffe, welche aus einem Pyrimidin- und einem Imidazolring zusammengesetzt sind (Franzen and Tois, 2003).

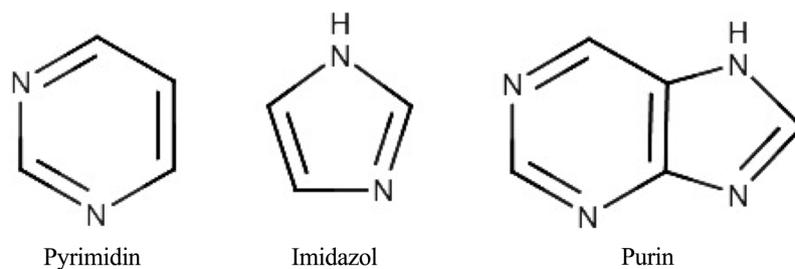


Abbildung 2: Chemische Strukturformel von Purin und seiner Bestandteile Pyrimidin und Imidazol (erstellt nach Franzen and Tois, 2003)

Purine und Pyrimidine sind als Grundkörper der organischen Basen der Nucleinsäuren fundamentale Bestandteile des lebenden Organismus. Zudem stellt Purin das Grundgerüst für das unentbehrliche Purinnucleotid Adenosin-5'-triphosphat (ATP) dar, welches aus einem Adeninrest, dem Zucker Ribose und drei Phosphaten besteht (siehe Abb. 3) (Agteresch et al., 1999).

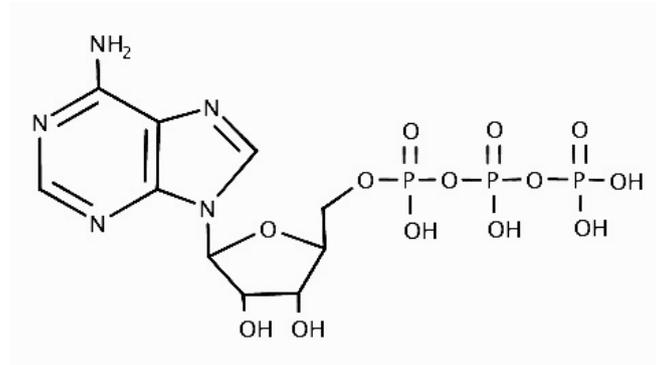


Abbildung 3: Chemische Strukturformel von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) (erstellt nach Agteresch et al., 1999)

Das ATP hat als universeller Energieträger eine essentielle Bedeutung für den intrazellulären Stoffwechsel und ermöglicht zudem als Signalmolekül eine interzelluläre Kommunikation. Es ist vorrangig intrazellulär, aber auch in geringen Konzentrationen extrazellulär vorhanden (Forrester, 1972, Johnsen, 2019, Allard et al., 2017, North, 2002). Dabei ist die nanomolekulare Konzentration an extrazellulären ATP in gesundem Gewebe niedrig und steigt z.B. bei Gewebeverletzung, Inflammation oder in der nächsten Umgebung von entartetem Gewebe auf ein Vielfaches mikromolekularer Konzentrationen an (Pellegatti et al., 2008, Eltzschig et al., 2012, Di Virgilio and Adinolfi, 2017, Di Virgilio et al., 2017, Morciano et al., 2017, Galluzzi et al., 2017, Gilbert et al., 2017, Gilbert et al., 2019, Di Virgilio et al., 2018, Lara et al., 2020).

Da es sich bei ATP um ein stark polares Molekül handelt, kann dieses die Lipiddoppelschicht der Zellmembran unter physiologischen Bedingungen nicht passieren (Johnsen, 2019). Für die Signalübertragung bindet ATP daher an membranständige Rezeptoren, welche als purinerge Rezeptoren bezeichnet werden (Burnstock, 1972, Burnstock, 2007).

Purinerge Rezeptoren lassen sich in P1 und P2 Rezeptoren unterteilen (Burnstock, 2007, Burnstock, 1978). Eine allgemeine Übersicht bietet Abbildung 4.

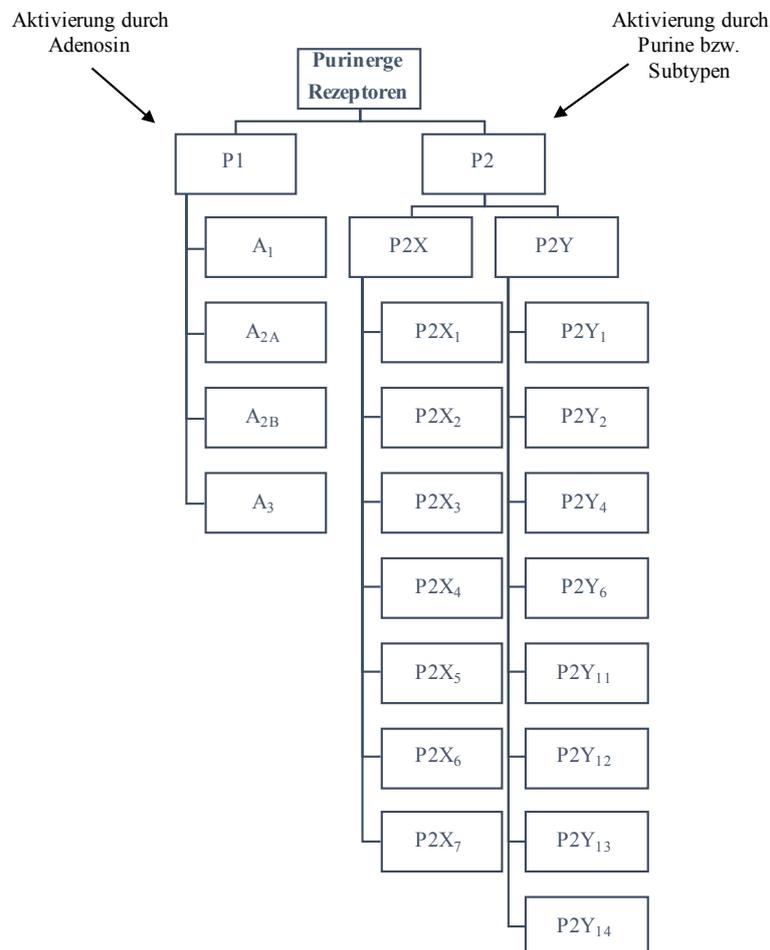


Abbildung 4: Einteilung purinergere Rezeptoren (erstellt nach Burnstock, 2007)

Wie in Abbildung 4 dargestellt, werden P1 Rezeptoren durch Adenosin, dem Spaltprodukt von ATP, aktiviert und unterteilen sich in vier Subtypen (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃). Die P2 Rezeptoren hingegen werden durch Purine oder deren Subtypen, wie beispielsweise Pyrimidin, aktiviert und differenzieren sich in P2X und P2Y Rezeptoren (siehe Abb. 4). Bei den P2Y Rezeptoren handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche wiederum 8 Subtypen beinhalten. Die P2X Rezeptoren sind Liganden-abhängige Ionenkanäle (sog. ionotrope Rezeptoren) und unterteilen sich in 7 Subtypen (Burnstock, 2007).

1.2.1 P2X Rezeptoren

P2X Rezeptoren sind membranständige, ATP-abhängige Ionenkanäle, welche bislang exklusiv in Eukaryoten gefunden wurden (North, 2002, Hattori and Gouaux, 2012, Kawate et al., 2009). Es gibt sieben Gene, welche die P2X Rezeptor Subtypen (siehe Abb.4 in 1.2) in Wirbeltieren kodieren. Diese zeigen die gleiche Struktur mit 11 bis 13 Exons und klaren Intron-Exon Grenzen (Valera et al., 1994, Brake et al., 1994, North, 2002). Generell zeigen P2X Rezeptoren in ihrer Sequenz keine Homologie mit anderen bekannten Liganden-abhängigen Ionenkanälen oder ATP-Bindungsproteinen (Kaczmarek-Hajek et al., 2012, Habermacher et al., 2016).

Die einzelnen P2X Subtypen differenzieren sich durch ihre Proteinuntereinheiten mit einer Länge von 384 bis 595 Aminosäuren (Roberts et al., 2006, Burnstock, 2007).

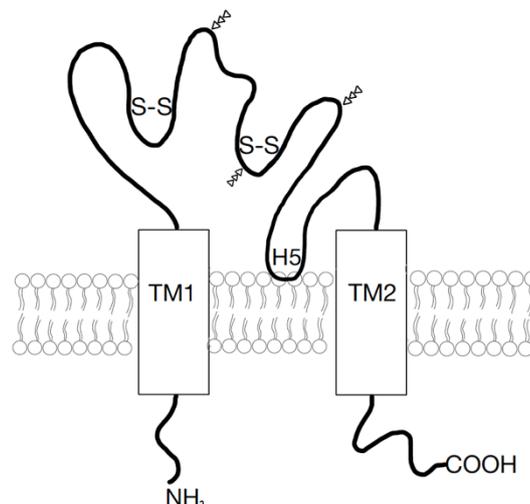


Abbildung 5: Aufbau einer P2X Untereinheit (erstellt nach Burnstock, 2007)

Alle P2X Proteinuntereinheiten besitzen, wie in Abbildung 5 dargestellt, einen intrazellulären Amino-Terminus (N-Terminus), einen intrazellulären Carboxy-Terminus (C-Terminus), zwei Transmembrandomänen (TM1 und TM2) und einen großen extrazellulär lokalisierten, glykosylierten Loop, welcher über Disulfidbrücken (S-S) verknüpft ist. Die TM1 beinhaltet die Kanalsteuerung, die TM2 bildet die Kanalpore des ionotropen Rezeptors, welche durch eine nahegelegene hydrophobe H5 Region moduliert wird (Burnstock, 2007,

Habermacher et al., 2016, Hattori and Gouaux, 2012, Valera et al., 1994, Brake et al., 1994). Die C-Termini der einzelnen P2X Subtypen unterscheiden sich in ihrer Länge zwischen 26 (P2X₆) und 239 (P2X₇) Aminosäuren, wobei lediglich die ersten 25 Aminosäuren ähnliche Sequenzen aufweisen. Die intrazellulären Domänen spielen eine wichtige Rolle in Bezug auf die Funktion und Eigenschaften spezifischer P2X Subtypen (Surprenant and North, 2009, Kaczmarek-Hajek et al., 2012, Habermacher et al., 2016, Allsopp and Evans, 2011, Allsopp et al., 2013, Boue-Grabot et al., 2000, Robinson and Murrell-Lagnado, 2013, Schwarz et al., 2012, Xu et al., 2012).

In der räumlichen Anordnung sind P2X Rezeptoren aus drei zusammengelagerten Untereinheiten aufgebaut (siehe Abb. 6A und 6B) und werden daher als trimere Rezeptoren bezeichnet. Dabei sind sowohl homotrimere als auch heterotrimere Komplexe beschrieben (Nicke et al., 1998, North, 2002, Nicke et al., 2003, Aschrafi et al., 2004, Barrera et al., 2005, Kawate et al., 2009, Hattori and Gouaux, 2012).

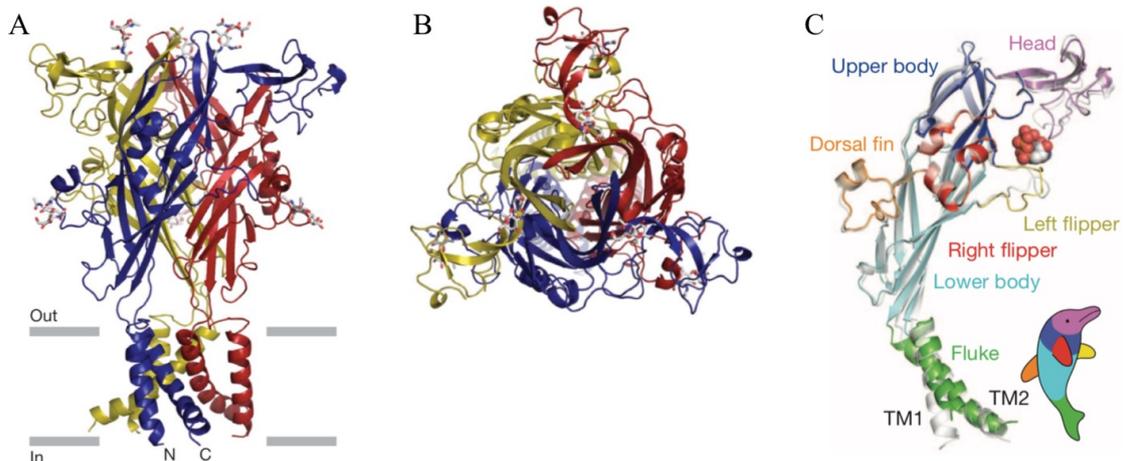


Abbildung 6: Räumliche Konfiguration der P2X Rezeptoren am Beispiel des Zebrafisch P2X₄ Rezeptors (Kawate et al., 2009, Hattori and Gouaux, 2012)

Räumliche Anordnung des Zebrafisch P2X₄ (zfP2X₄) Rezeptors. (A) Ansicht von lateral auf den trimeren zfP2X₄ Rezeptor in kelch-ähnlicher Form mit drei extrazellulären Domänen, sechs Transmembrandomänen sowie den intrazellulär lokalisierten N- und C-Termini. (B) Ansicht von kranial auf die drei extrazellulären Domänen, welche die Form eines Dreiecks bilden. (C) Konfiguration einer zfP2X₄ Untereinheit in delfin-ähnlicher Form.

In der lateralen Ansicht eines trimeren P2X Rezeptors (siehe Abb. 6A) zeigt sich eine kelch-ähnliche Form. Von oben betrachtet ergibt sich durch die drei rechts ineinander verdrehten extrazellulären Domänen die Form eines Dreiecks

(siehe Abb. 6B). Wie in Abbildung 6C dargestellt, wird die räumliche Konfiguration einer Untereinheit mit der Form eines Delfins mit Kopf, Körper, Rückenflosse, zwei Seitenflossen und einer Schwanzflosse verglichen. Der Kopf und Körper des Delfins stellen die große, stark verknüpfte extrazelluläre Domäne in β -Faltblatt-Struktur dar. Die Schwanzflosse symbolisiert die zwei antiparallel ausgerichteten Transmembrandomänen aus α -Helices (Habermacher et al., 2016, Kawate et al., 2009, Hattori and Gouaux, 2012). In der trimeren Rezeptor Konfiguration sind die sechs Transmembrandomänen (zwei pro Untereinheit) in Linksrichtung ineinander rotiert, wobei sich die TM2 im geschlossenen Zustand überkreuzen (Kawate et al., 2009, Hattori and Gouaux, 2012).

Abhängig von ihrer ATP Bindung, liegen P2X Rezeptoren in verschiedenen Konfigurationen vor (Browne et al., 2010, Giniatullin and Nistri, 2013, Jiang et al., 2013, Habermacher et al., 2016, Harkat et al., 2017, Peverini et al., 2018). Eine Übersicht hierzu bildet Abbildung 7.

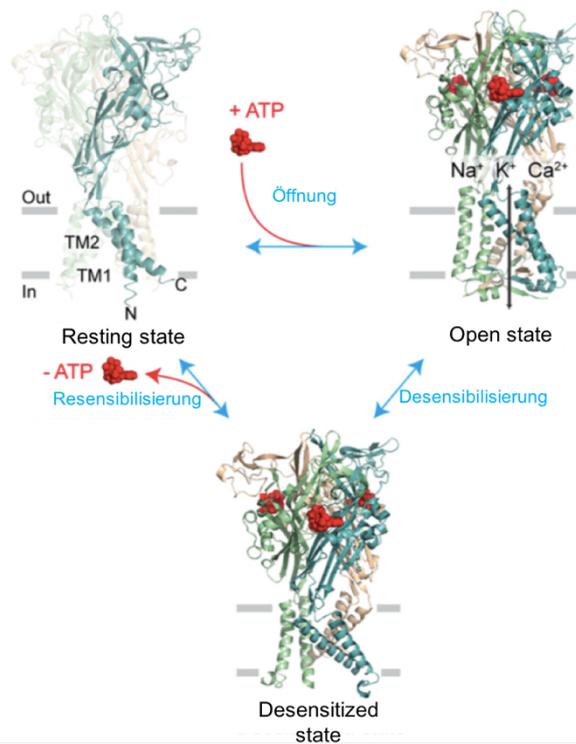


Abbildung 7: Konfigurationen des P2X Rezeptors (modifiziert nach Peverini et al., 2018)

Darstellung der P2X Rezeptor Konfigurationen (exemplarisch in Subtyp P2X₃) mit sog. *resting*, *open* und *desensitized state* aus lateraler Ansicht. Jede Untereinheit ist farblich markiert. Das ATP ist als rotes Molekül dargestellt und die grauen Balken symbolisieren die Lipiddoppelschicht der Membran.

Wie in Abbildung 7 gezeigt, befindet sich der P2X Rezeptor ohne ATP Bindung in einer geschlossenen, aktivierbaren Konfiguration, dem sogenannten *resting state*. Bei der Bindung von ATP geht der P2X Rezeptor in eine geöffnete Konfiguration (sog. *open state*) über (Mansoor et al., 2016, Peverini et al., 2018). Hierfür gibt es pro Rezeptor drei extrazelluläre, voneinander unabhängige ATP-Bindungsstellen, welche als Nukleotid Bindungstaschen in der Schnittstelle zwischen zwei benachbarten Untereinheiten lokalisiert sind (Hattori and Gouaux, 2012, Kawate et al., 2009, Schmid and Evans, 2019). Bei ATP Bindung erfährt der P2X Rezeptor innerhalb von Millisekunden eine Konformationsänderung und ermöglicht dadurch einen Fluss von Natrium-, Kalium- und Calciumionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten (Kawate et al., 2009, Hattori and Gouaux, 2012, Peverini et al., 2018, Habermacher et al., 2016, Browne et al., 2010, Khakh and North, 2012, Egan and Khakh, 2004, North, 2002). Dieser Vorgang wird als „*Gating*“ bezeichnet (Harkat et al., 2017, Peverini et al., 2018). Die Veränderung des

Ionengleichgewichts bedingt eine Initiierung von Signaltransduktionen, wodurch P2X Rezeptoren eine Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen beeinflussen (Harkat et al., 2017). Hierzu gehören exokrine und endokrine Sekretion, Immunmodulation, Modulation der Gewebekomöostase, Modulation von Neurotransmitterfreisetzung, Inflammation, Geschmack, Schmerzwahrnehmung, Wundheilung, Plättchenaggregation, Vasodilatation, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod (Burnstock, 2007, Burnstock and Knight, 2004, Burnstock, 2006, Abbracchio and Burnstock, 1998, Habermacher et al., 2016, Kinnamon and Finger, 2013, Lalo et al., 2012, Khakh and North, 2012, Di Virgilio and Adinolfi, 2017).

Eine verlängerte Applikation von ATP führt, abgesehen vom Subtyp P2X₇, zu einer Inaktivierung des P2X Rezeptors, bei welcher trotz gebundenem ATP kein Ionenfluss mehr stattfindet (North, 2002). Dieser Prozess wird als Desensibilisierung bezeichnet. Sobald die gebundenen ATP-Moleküle dissoziieren, geht der Rezeptor in den initial geschlossenen Zustand über (siehe Abb. 7). Dieser Prozess wird als Resensibilisierung bezeichnet. In der daraus resultierenden geschlossenen Konfiguration kann der Rezeptor erneut aktiviert werden (Habermacher et al., 2016, Peverini et al., 2018).

Die verschiedenen P2X Rezeptor Subtypen unterscheiden sich in ihrer ATP Sensibilität sowie ihrem zeitlichen Verlauf der desensibilisierten Konfiguration (Schmid and Evans, 2019). Im starken Gegensatz zu den anderen P2X Subtypen benötigt der P2X₇ Rezeptor zur Aktivierung hohe ATP-Konzentrationen, worunter er fortwährende Ströme mit geringer bis keiner Desensibilisierung aufweist (North, 2002, Habermacher et al., 2016, Kaczmarek-Hajek et al., 2012, Schmid and Evans, 2019, Karasawa and Kawate, 2016, Yan et al., 2010).

1.2.2 P2X₇ Rezeptor

Der P2X₇ Rezeptor nimmt in der Familie der P2X Rezeptoren aufgrund vieler spezifischer Eigenschaften eine Sonderrolle ein (Karasawa and Kawate, 2016). Gleichzeitig spielt er in einer Bandbreite verschiedener physiologischer und pathologischer Prozesse eine wichtige Rolle. Dazu gehören metabolische Ereignisse, Inflammation, Phagozytose, Zellproliferation und Zelltod (Sluyter, 2017, Karasawa et al., 2017, Di Virgilio et al., 2017, Sluyter and Stokes, 2011).

Das Gen des P2X₇ Rezeptors, bezeichnet als *P2RX7*, ist auf Chromosom 12 (12q24.31) lokalisiert und kodiert die 595 Aminosäuren (AS) lange Proteinuntereinheit, welche dem in Abschnitt 1.2.1 und Abbildung 5 beschriebenen Aufbau entspricht. Im Gegensatz zu anderen P2X Rezeptorsubtypen besitzt das P2X₇ Protein einen längeren intrazellulären C-Terminus (239 AS), welcher eine zusätzliche hydrophobe Domäne beinhaltet (North, 2002, Burnstock, 2007, Di Virgilio et al., 2018, Sluyter, 2017). Zudem ist die P2X₇ Untereinheit unfähig heterotrimere Komplexe mit anderen P2X Untereinheiten zu bilden, wodurch der P2X₇ Rezeptor in der räumlichen Konfiguration (siehe Abb. 6 in 1.2.1) lediglich als homotrimere Rezeptorform vorliegt (Boumechache et al., 2009, Torres et al., 1999, Kaczmarek-Hajek et al., 2012).

Besonders durch die Eigenschaft der Formung einer sogenannten Makropore, welche durch eine Membrandepolarisation letztlich Zelltod induziert, hebt sich der P2X₇ Rezeptor von anderen P2X Rezeptorsubtypen ab (Lara et al., 2020). Ursprünglich war der P2X₇ Rezeptor daher unter der Bezeichnung P_{2Z} Rezeptor bekannt, welcher als Eigenschaft eine große, nicht selektive Pore aufzeigte (Gordon, 1986, Burnstock, 1994). In intensiven Studien wurde gezeigt, dass der P_{2Z} Rezeptor durch die Permeation großer, organischer Moleküle in Makrophagen zur Zytolyse führt (Nuttall and Dubyak, 1994, Di Virgilio, 1995). Surprenant et al. (1996) zeigte eine starke Homologie der P_{2Z} Sequenz mit P2X Proteinen, sodass der P_{2Z} Rezeptor als P2X₇ Subtyp der P2X Rezeptorfamilie neu klassifiziert wurde (Surprenant et al., 1996). Heute sind weitere P2X

Subtypen (P2X₁, P2X₂, P2X₄, P2X_{2/3}, P2X_{2/5}) bekannt, welche die Permeation großer, organischer Moleküle ermöglichen (Compan et al., 2012, Evans et al., 1996, Schmid and Evans, 2019, Rokic and Stojilkovic, 2013, Wei et al., 2016, Khakh and Lester, 1999, Virginio et al., 1999). Unter diesen besitzt der P2X₇ Rezeptor den größten Durchmesser der Makropore (~ 8,5 Ångström) und ermöglicht dadurch zusätzlich zum Ionenfluss kleiner Kationen die höchste Flussgeschwindigkeit für große Moleküle bis zu ~ 900 Dalton (Steinberg et al., 1987, Nuttle and Dubyak, 1994, Di Virgilio, 1995, Surprenant et al., 1996, Yan et al., 2008, Alves et al., 2014, Karasawa and Kawate, 2016, Di Virgilio et al., 2018, Karasawa et al., 2017, Peverini et al., 2018, Riedel et al., 2007).

Bezüglich des Aufbaus sowie der Öffnung der P2X₇ Makropore stehen zwei Hypothesen im Zentrum intensiver Forschungen (Karasawa et al., 2017, Pelegrin, 2011, Peverini et al., 2018, Di Virgilio et al., 2018, Di Virgilio and Adinolfi, 2017, Roger et al., 2015):

(1) Permeation großer Moleküle direkt durch P2X₇

- Durch intrinsische Porendilatation formt der P2X₇ Rezeptor selbst bei verlängerter oder wiederholter ATP-Stimulation eine Membranpore für große organische Kationen

(2) Permeation großer Moleküle indirekt durch P2X₇

- Durch die Aktivierung von P2X₇ werden weitere für große organische Kationen permeable Kanalproteine (z.B. Pannexin-1 Hemikanäle) rekrutiert

Es gibt Studien für und gegen beide Hypothesen wie auch Annahmen, dass beide Hypothesen ko-existieren oder sogar fusionieren könnten (Peverini et al., 2018, Pelegrin, 2011). Laut aktueller Forschung wird mit starker Evidenz belegt, dass der P2X₇ Rezeptor selbst eine intrinsische Pore für die Permeation großer organischer Kationen formt. Dies wurde durch eine positive P2X₇ Aktivität ohne das Vorhandensein anderer zellulärer Komponenten in einer Rekonstruktion in Liposomen nachgewiesen (Karasawa et al., 2017). Die intrinsische große Pore entsteht allerdings nicht, wie ursprünglich beschrieben, durch Porendilatation,

sondern unmittelbar nach P2X₇ Aktivierung. Somit führt eine Aktivierung von P2X₇ zu einem gleichzeitigen Fluss von kleinen und großen organischen Kationen (Harkat et al., 2017, Peverini et al., 2018, Karasawa et al., 2017, Di Virgilio et al., 2018, Pippel et al., 2017). Nichtsdestotrotz, sind weitere durch P2X₇ initiierte Permeationswege möglich, deren Identität und physiologische Rolle bislang noch offen sind (Di Virgilio et al., 2018).

Die Permeation großer Moleküle bleibt eine sonderbare, aber wichtige Eigenschaft des P2X₇ Rezeptors, da diese für viele pathophysiologische Funktionen, wie zum Beispiel die Aktivierung des Zelltods, verantwortlich ist (Karasawa et al., 2017, Di Virgilio et al., 2018, Gilbert et al., 2019). Generell wird der P2X₇ Rezeptor auf verschiedensten Zelltypen wie Stammzellen, Immunzellen, Gliazellen und Zellen von Binde- und Stützgewebe exprimiert (Surprenant et al., 1996, Karasawa and Kawate, 2016, Collo et al., 1997, Sluyter, 2017, Karasawa et al., 2017). Dabei wird angenommen, dass der P2X₇ Rezeptor aufgrund der zur Aktivierung benötigten hohen ATP-Konzentration (siehe 1.2.1) unter physiologischen Bedingungen in geschlossener Konfiguration vorliegt. Die dagegen unter pathologischen Bedingungen erhöhte ATP-Konzentration (siehe 1.2) ist in der Lage den P2X₇ Rezeptor zu aktivieren (Di Virgilio et al., 2018). Dementsprechend verursacht der P2X₇ Rezeptor bei Inflammation eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Di Virgilio et al., 2017). Auch die erhöhte ATP-Konzentration im Tumormikromilieu führt zu einer Aktivierung von P2X₇ (Roger et al., 2015, Gilbert et al., 2017, Gilbert et al., 2019, Lara et al., 2020). Der P2X₇ Rezeptor wird daher neben seiner therapeutischen Rolle bei Inflammation, Schmerz und neurologischen Erkrankungen häufig als Ansatzpunkt in Bezug auf maligne Erkrankungen propagiert (Di Virgilio et al., 2009, Adinolfi et al., 2010, Adinolfi et al., 2012, Di Virgilio, 2012, Hausmann et al., 2015, Roger et al., 2015, Di Virgilio et al., 2018, Schmid and Evans, 2019).

1.2.2.1 Der P2X₇ Rezeptor in soliden Tumoren

Der P2X₇ Rezeptor zeigt eine weit verbreitete Expression in verschiedensten soliden Tumorentitäten (Lara et al., 2020). Dazu gehören u.a. Mamma-, Prostata-, Lungen-, Pankreas-, papilläres Schilddrüsen-, Kolorektales-, Endometrium- und Ovarialkarzinom sowie Neuroblastome, Haut- und Gehirntumoren (Roger et al., 2015, Gilbert et al., 2019). Die Überexpression des P2X₇ Rezeptors gilt dabei in vielen Tumorentitäten, wie z.B. papilläres Schilddrüsen- (Kwon et al., 2014), Prostatakarzinom (Ghalali et al., 2014) sowie Neuroblastom (Amoroso et al., 2015), als negativ prognostischer Faktor (Di Virgilio and Adinolfi, 2017).

Bezüglich der Rolle des P2X₇ Rezeptors existieren in der Tumorgenese auffallend unterschiedliche, teilweise sogar gegensätzliche Hypothesen. Zum einen ist eine pro-kanzerogene Aktivität beschrieben, wobei der P2X₇ Rezeptor Zellüberleben, Zellproliferation, Zellmigration und Tumorstadium unterstützt, pro-invasive Eigenschaften induziert und eine metabolische Adaptation an das entartete Gewebe ermöglicht (Adinolfi et al., 2005, Adinolfi et al., 2012, Di Virgilio and Adinolfi, 2017, Jelassi et al., 2011, Gilbert et al., 2019, Roger et al., 2015). Zum anderen ist dem P2X₇ Rezeptor eine anti-kanzerogene Aktivität postuliert, wobei die Aktivierung des P2X₇ Rezeptors Zelltod induziert, die Migration und Proliferation der Tumorzellen inhibiert und das Tumorstadium hemmt (Roger et al., 2015, Johnsen, 2019). Der P2X₇ Rezeptor spielt demnach als Trigger sowohl für Tumorstadium als auch für Tumorstadium eine komplizierte, ambivalente Rolle (Roger et al., 2015, Di Virgilio and Adinolfi, 2017, Johnsen, 2019).

In einer Untersuchung im Neuroblastom führte eine *in vitro* Aktivierung des P2X₇ Rezeptors zur Proliferation, nicht aber zum Zelltod der Tumorzellen. Dies wurde durch eine Entkopplung des P2X₇ Rezeptors von intrazellulären Zelltod-induzierenden Signalwegen erklärt (Raffaghello et al., 2006). Tatsächlich müssen viele Tumorzellen Mechanismen entwickelt haben, wodurch die trophischen Vorteile durch den P2X₇ Rezeptor gefördert, die

schädlichen Effekte aber minimiert werden. Dementsprechend wurden viele alternative Formen des P2X₇ Rezeptors beschrieben, welche nicht in der Lage sind durch die Permeation großer Moleküle einen Zelltod zu induzieren (Gilbert et al., 2017, Gilbert et al., 2019, Lara et al., 2020). Eine Übersicht über verschiedene molekulare Mechanismen und Modifikationen, welche eine fehlende oder beeinträchtigte Makroporenfunktion des P2X₇ Rezeptors bedingen, ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Molekulare Mechanismen und Modifikationen des P2X₇ Rezeptors mit fehlender oder beeinträchtigter Makroporenfunktion

Einzelnukleotid-Polymorphismus	(Gu et al., 2001, Worthington et al., 2002, Barden et al., 2003, Wiley et al., 2003, Shemon et al., 2006, Fuller et al., 2009, Roger et al., 2010, Sluyter and Stokes, 2011, Burnstock and Di Virgilio, 2013, Sluyter, 2017)
Splicevarianten	(Adinolfi et al., 2005, Cheewatrakoolpong et al., 2005, Feng et al., 2006, Adinolfi et al., 2010, Sluyter and Stokes, 2011, Giuliani et al., 2014, Roger et al., 2015, Sluyter, 2017, Di Virgilio and Adinolfi, 2017, Di Virgilio et al., 2018, Peverini et al., 2018, Schmid and Evans, 2019)
Posttranslationale Modifikation: - N-Glykosylierung - Proteolytische Spaltung - ADP-Ribosylierung	(Lenertz et al., 2010, Wickert et al., 2013) (Young et al., 2018) (Adriouch et al., 2008)
Intrazelluläre Bindungspartner	(Barden et al., 2003, Guo et al., 2007, Gu et al., 2009, Barden et al., 2014, Sluyter, 2017)
Interaktion mit anderen P2X Subtypen	(Guo et al., 2007, Biosceptre International Limited, 2017, Gilbert et al., 2019)
Lipidzusammensetzung der Zellmembran	(Robinson et al., 2014, Karasawa et al., 2017)

Bei der Untersuchung dieser alternativen P2X₇ Rezeptorformen wurde ein Epitop namens E200, welches mit nicht funktionellen Formen des P2X₇ Rezeptors assoziiert ist, identifiziert. Dementsprechend werden P2X₇ Rezeptoren, welche das Epitop E200 exponieren, als non-functional P2X₇ Rezeptoren bezeichnet (Gidley-Baird A, 2003, Barden et al., 2003, Gilbert et al., 2017).

1.2.3 Non-functional P2X₇ Rezeptor

Der non-functional P2X₇ (nf-P2X₇) Rezeptor ist somit eine Variante des P2X₇ Rezeptors, welcher im Gegensatz zum Wildtyp P2X₇ keine Makroporenfunktion aufweist und daher keinen Zelltod induzieren kann (Gilbert et al., 2019, Barden et al., 2016, Barden et al., 2014, Barden et al., 2003, Worthington et al., 2002). Trotzdem ermöglicht der nf-P2X₇ Rezeptor nachweislich einen Fluss von Calciumionen und liegt deshalb höchstwahrscheinlich ebenfalls in der räumlichen Anordnung als Trimer vor (Gilbert et al., 2019).

Es wird angenommen, dass es sich unabhängig vom zugrunde liegenden Mechanismus (siehe Tab. 1 in 1.2.2.1) bei nf-P2X₇ um eine fehlgefaltete Form des Wildtyps P2X₇ handelt, welche intrazellulär sequestriert und bei Stimulation (zum Beispiel durch ATP) in die Zellmembran eingebaut wird (Gilbert et al., 2019, Lara et al., 2020). Ein ähnlicher Mechanismus ist beispielsweise für den mutierten CFTR (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) Kanal bei der zystischen Fibrose (Mukoviszidose) beschrieben (Robert et al., 2008, Gilbert et al., 2019).

Durch diese Konformationsänderung exponiert der nf-P2X₇ Rezeptor das beschriebene Epitop E200. Dieses ist sowohl im intrazellulären als auch extrazellulären nf-P2X₇ Rezeptor vorhanden und nahe der ATP-Bindungsstelle lokalisiert (siehe Abb. 8) (Barden et al., 2003, Gidley-Baird A, 2003, Barden et al., 2014, Barden et al., 2016, Gilbert et al., 2017, Gilbert et al., 2019).

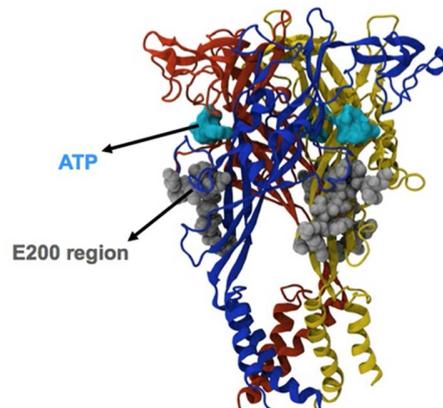


Abbildung 8: nf-P2X₇ Rezeptor mit ATP-Bindungsstellen und extrazellulär lokalisiertem Epitop E200 (Biosceptre International Limited, 2017)

Das Epitop E200 stellt ein selektives, spezifisches Target des nf-P2X₇ Rezeptors dar und ist im Wildtyp P2X₇ nicht exponiert (Barden et al., 2003, Gidley-Baird A, 2003, Barden et al., 2014, Barden et al., 2016, Gilbert et al., 2017, Gilbert et al., 2019). Es wird durch die Exons 6 und 7 kodiert und enthält in der spezifischen AS-Sequenz (200 - 216) im Gegensatz zum Wildtyp P2X₇ an der Stelle 210 die Aminosäure Prolin in *cis*-Konfiguration (Worthington et al., 2002, Barden et al., 2003, Barden and Gidley Baird, 2008, Barden and Gidley-Baird, 2010b, Barden and Gidley-Baird, 2010a, Barden et al., 2015).

Es wurden spezifische Antikörper gegen das Epitop E200 entwickelt (siehe 2.2.2), welche eine Differenzierung zwischen dem Wildtyp P2X₇ und dem nf-P2X₇ Rezeptor ermöglichen (Barden et al., 2003, Gilbert et al., 2019). Durch Verwendung dieser Antikörper wurde die starke nf-P2X₇ Expression auf einer Bandbreite verschiedener Tumorentitäten von Erwachsenen nachgewiesen (Gilbert et al., 2019). Eine Übersicht hierzu bietet Tabelle 2.

Tabelle 2: Übersicht der nf-P2X₇ Rezeptor Expression in Tumorentitäten von Erwachsenen

Epitheliale Tumoren	Plattenepithelkarzinome der Haut (Basalzellkarzinom und Spinaliom)	(Gilbert et al., 2017, Gilbert et al., 2019, Barden et al., 2016)
	Ösophaguskarzinom	(Barden et al., 2014)
	Magenkarzinom	(Barden et al., 2014, Gilbert et al., 2019)
	Kolorektales Karzinom	(Gilbert et al., 2019, Barden et al., 2014)
	Hepatozelluläres Karzinom	(Barden et al., 2014)
	Pankreaskarzinom	(Kunzli et al., 2007, Barden et al., 2016, Barden et al., 2014)
	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	(Gilbert et al., 2019)
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	(Barden et al., 2014)
	Hypophysenkarzinom	
	Kopf-Hals-Karzinom	(Barden et al., 2014)
	Invasives Mammakarzinom	(Gilbert et al., 2019, Gilbert et al., 2017, Slater et al., 2004b, Barden et al., 2014)
	Seröses Ovarialkarzinom	(Gilbert et al., 2019, Barden et al., 2014)
	Endometriumkarzinom	(Barden et al., 2014)
	Zervixkarzinom	
	Prostatakarzinom	(Barden et al., 2016, Gilbert et al., 2017, Slater et al., 2004a, Barden et al., 2014)
	Blasenkarzinom	(Gilbert et al., 2019, Barden et al., 2014)
Mesenchymale Tumoren	Sarkome - Fibrosarkom - Ewing-Sarkom	(Gilbert et al., 2019, Biosceptre International Limited, 2017, Barden et al., 2014)
	Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	(Barden et al., 2014)
	Endometrialer Stromatumor	
	Mesotheliom	

Sonderform mesenchymaler Tumoren	Hodgkin Lymphom Mantelzelllymphom Chronisch lymphatische Leukämie (CLL) Akute lymphatische Leukämie (ALL)	(Barden et al., 2014) (Barden et al., 2003, Barden et al., 2016) (Barden et al., 2016)
Neuroektodermale Tumoren	Gliome - Oligodendrogliom - Astrozytom - Glioblastom	(Barden et al., 2014, Barden et al., 2016)
	Malignes Melanom	(Barden et al., 2016, Gilbert et al., 2017, Gilbert et al., 2019, Barden et al., 2014)
Neuroendokrine Tumoren	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	(Gilbert et al., 2019, Barden et al., 2014)
Keimzelltumoren	Seminom	(Barden et al., 2014)
	Trophoblasttumor	
Embryonale Tumoren	Neuroblastom	(Biosceptre International Limited, 2017, Raffaghello et al., 2006, Amoroso et al., 2015)

Wie in Tabelle 2 dargestellt, zeigt der nf-P2X₇ Rezeptor eine weit verbreitete Expression auf verschiedensten Tumorentitäten. Es ist zu betonen, dass im Gegensatz dazu auf gesundem Gewebe kein nf-P2X₇ Rezeptor exprimiert wird (Gilbert et al., 2019, Slater et al., 2004a, Slater et al., 2004b, Barden et al., 2014, Gilbert et al., 2017, Barden et al., 2016).

Durch Imitation der hohen ATP-Konzentration in der nächsten Umgebung von entartetem Gewebe wurde von Gilbert et al. (2019) eine erhöhte nf-P2X₇ Expression und eine herunterregulierte Wildtyp P2X₇ Expression induziert. Dies unterstützt den in Abbildung 9 veranschaulichten Mechanismus, mit welchem Tumorzellen Überlebensvorteile durch die nf-P2X₇ Expression aufrechterhalten und gleichzeitig eine Zelltod-Initiierung durch die große Porenfunktion des P2X₇ Rezeptors umgehen (Gilbert et al., 2019).

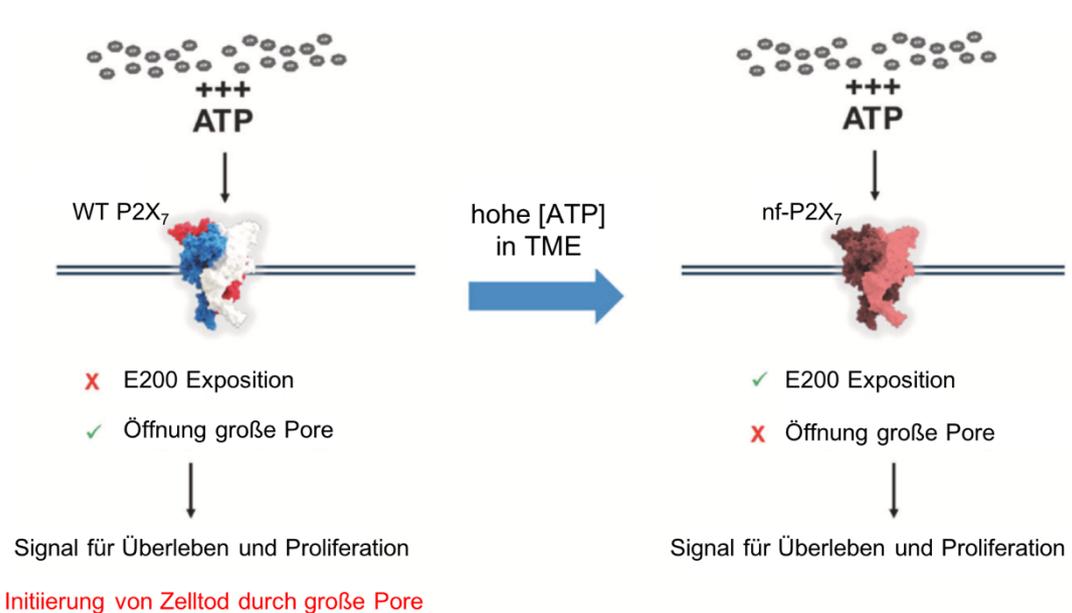


Abbildung 9: Mechanismus der Tumorzellen durch Aufrechterhaltung der Überlebensvorteile und Umgehung der Initiierung von Zelltod durch Expression von nf-P2X₇ bei erhöhter ATP-Konzentration im Tumormikromilieu (kurz TME von engl. tumour microenvironment) (modifiziert nach Gilbert et al., 2019)

Der in Abbildung 9 dargestellte Switch vom funktionellen Wildtyp P2X₇ zum nf-P2X₇ Rezeptor durch hohe ATP-Konzentrationen ist durch eine schnelle Herunterregulation des Wildtyp P2X₇ und einen langsamen Anstieg der nf-P2X₇ Expression auf der Oberfläche der Tumorzellen definiert. Es handelt sich hierbei um einen aktiven Mechanismus mit neuer Proteinsynthese von nf-P2X₇. Außerdem erfolgt in Anwesenheit von P2X₇ Inhibitoren kein Switch zu nf-P2X₇ (Gilbert et al., 2019).

Die nf-P2X₇ Expression ist nachweislich essentiell für das Überleben von Tumorzellen. Dies wurde in Tumorzelllinien mit einer hohen nf-P2X₇ und niedrigen Wildtyp P2X₇ Expression mithilfe der Verwendung von siRNA (engl. *small interfering RNA*) untersucht. Dabei wurde durch den Verlust von nf-P2X₇ die Caspase 3/7 Aktivität erhöht und Apoptose induziert. Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass die Wildtyp P2X₇ Form für das Überleben der Tumorzellen nicht relevant ist (Gilbert et al., 2019). Neben seinen essentiellen Eigenschaften für das Überleben von Tumorzellen, unterstützt der nf-P2X₇ Rezeptor deren trophische Aktivität vermutlich über seine erhaltene Ionenkanal-Funktion (Gilbert et al., 2019, Barden et al., 2014, Jelassi et al., 2011). Auch das

Metastasierungspotential wird wahrscheinlich über den nf-P2X₇ Rezeptor gefördert (Barden et al., 2014).

Durch die Verwendung von nf-P2X₇ Antikörpern wurde in immunhistochemischen Färbungen sowohl das diagnostische Potential als auch mithilfe von *in vitro* und *in vivo* Studien mit ersten Hinweisen auf klinische Wirksamkeit das therapeutische Potential der Ansteuerung des nf-P2X₇ Rezeptors in erwachsenen Tumorentitäten verdeutlicht (Gilbert et al., 2017, Barden et al., 2009, Barden et al., 2016, Barden et al., 2014, Slater et al., 2004a, Slater et al., 2004b, Slater et al., 2003). Der nf-P2X₇ Rezeptor stellt daher ein neues auf Tumoren ubiquitäres und vielversprechendes Zielprotein dar.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Bis heute stellen Tumorerkrankungen eine der häufigsten Todesursachen im Kindesalter dar (Fuchs, 2012). Insbesondere bei fortgeschrittenem Tumorleiden oder Tumorrezidiv ist die Prognose mit Mortalitätsraten von mindestens 75 % bislang immer noch infaust (Marron et al., 2016, Ferrari et al., 2015, Leary et al., 2013, Oberlin et al., 2008, Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology et al., 2006, Lee, 2018). Auch die Lebensqualität ist durch mutilierende Operationen sowie schwere Nebenwirkungen bei Radio- und Chemotherapie stark eingeschränkt (Dantonello et al., 2009). Zudem entstehen durch bisherige Therapien erhebliche Spätfolgen (Schmidt et al., 2018). Daher ist die Etablierung neuer Therapieverfahren dringend notwendig. Ein mögliches *Target* hierfür ist der purinerge P2X₇ Rezeptor, welcher verschiedene Zellfunktionen, darunter auch den Zelltod, reguliert. Dieser ist auf einer Bandbreite von erwachsenen Tumorentitäten in einer nicht funktionellen Konformation, genannt non-functional P2X₇ Rezeptor, exprimiert. Auf gesundem Gewebe zeigt sich keine Expression des nf-P2X₇ Rezeptors. Der nf-P2X₇ Rezeptor ermöglicht somit eine Differenzierung zwischen normalen und maligne transformierten Zellen und bietet daher sowohl neue diagnostische Möglichkeiten als auch einen neuen Ansatzpunkt in der zielgerichteten Therapie

(engl. *target therapy*) (Barden et al., 2016, Barden et al., 2014). In adulten Tumorentitäten gibt es bereits erste Hinweise auf eine klinische Wirksamkeit von nf-P2X₇ Rezeptor gerichteten Antikörpern (Gilbert et al., 2017, Barden et al., 2009, Barden et al., 2016).

Das Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit ist es, den nf-P2X₇ Rezeptor erstmalig auf kindlichen, extrakraniellen soliden Tumoren zu untersuchen. Dabei soll die ubiquitäre Expression des nf-P2X₇ Rezeptors auf der Oberfläche von pädiatrischen soliden Tumorzellen bestätigt und sein Potential als neues, weitreichendes diagnostisches und therapeutisches Target hinsichtlich pädiatrisch solider Tumoren nachgewiesen werden. Zudem sollen funktionelle Assays die klinische Wirksamkeit einer Antikörper Applikation gegen den nf-P2X₇ Rezeptor prüfen.

Schlussendlich sollen die Ergebnisse dieser Arbeit als Grundlage für eine neue diagnostische und therapeutische Option bei der Behandlung von kindlichen soliden Tumoren dienen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

Alle allgemein verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im Folgenden aufgeführt. Speziell verwendete Materialien sind in der entsprechenden Methode vermerkt. Abgesehen von explizit erwähnten Ländern, liegt der Firmensitz in Deutschland.

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Cellstar® Polyporpylene Tube, conical bottom with support kit, 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar® Polyporpylene Tube, conical bottom, 15ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Desinfektionsspray Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld
Einwegpinzetten, steril	Servoprax GmbH, Wesel
Entsorgungsbeutel, PP autoklavierbar	BRAND GmbH und Co KG, Wertheim
Handschuhe nitrile, powder-free	Abena GmbH, Zörbig
Handschuhe Peha-soft nitrile GUARD	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Multimark 1513 permanent Stift	Faber Castell, Stein
Pasteur Capillary Pipettes (long size, 230mm)	Wilhelm Ulbrich GdbR, Mainz
Pipetten (Falcon Serologische Pipette) (2, 5, 10, 25ml)	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitze (200µl)	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen (0,5 – 20 µl, Kristall E)	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitzen (100-1000 µl) Item Nr: 686290	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Deutschland GmbH, Mainz
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 0,5ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 1,5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturflaschen (cellstar® cell culture flasks 75cm ² , 125cm ² , 175cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 25cm ²	Corning incorporated, New York, USA
Zellkulturplatte (6-, 24 -, 96-Well, TC-Treated)	Corning Incorporated, New York, USA
Zellkulturschale (TC-Schale 100, Cell+)	Sarstedt, Nürmbrecht

2.1.2 Geräte

Biofuge 15R	Heraeus Instruments GmbH , Hanau
Brutschrank BBD 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Durchflusszytometer FACS Canto II (3 Laser: blau=488nm, rot=633nm und violett=405nm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine	Scotsman, Ipswich, Großbritannien
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Logic Shaker	NeoLab, Heidelberg
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Leica DMI1	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
MilliQ-Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Molsheim, Frankreich
Odyssey Fc Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
pH-Meter Lab850	SI Analytics GmbH, Mainz
Photometer (BioPhotometer D30)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu Integra	Bioscience AG, Chur, Schweiz
Plattenspektralphotometer EL x 800	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach
Spiegelreflex Kamera Canon EOS 550D	Canon GmbH, Krefeld
Sterilbank (Msc-Advantage)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Stickstofftank CryoSystem 4000 Chart	MVE BioMedical, Ball Ground, USA
Stoppuhr TachoSil	Inspirion GmbH, Bremen
Taschenrechner (Sharp EL-243S)	Sharp Devices Europe GmbH, München
Tischabzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
Vakuumpumpe EcoVac	Schuett-biotec GmbH, Göttingen
Vortex-Schüttler VF2	Janke & Kunkel, Labortechnik, Staufen
Wasserbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus Instruments GmbH , Hanau
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus Instruments GmbH , Hanau

2.1.3 Kulturmedien und Reagenzien

DMEM-Medium:

88 % DMEM Dulbecco's Modified Eagl Medium-high glucose	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
10 % FCS (fetales Kalbsserum)	Biochrom GmbH, Berlin
1 % L-Glutamin (200 mM)	Biochrom GmbH, Berlin
1 % Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin

DMEM-Medium ohne FCS

98 % DMEM Dulbecco's Modified Eagl Medium-high glucose	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
1 % L-Glutamin (200 mM)	Biochrom GmbH, Berlin
1 % Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin

RPMI-Medium

89% RPMI-1640 Medium (mit L-Glutamin und Natrium, Bikarbonat)	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
10% FCS (fetales Kalbsserum)	Biochrom GmbH, Berlin
1% Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin

Reagenzien

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺) 1x-PBS	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
Trypsin (Trypsin/EDTA, 0,05 %, Gibco)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

2.1.4 Programme

FACS Canto II System Software	Becton Dickinson, Heidelberg
BD FACS Diva Software Version 8.0.1.	Becton Dickinson, Heidelberg
EndNote X8.2 (Bld 13302)	Clarivate Analytics, Boston (USA)
EOS Utility Ver.2	Canon GmbH, Krefeld
Fluorescence Spectra Analyzer (https://www.biolegend.com/spectraanalyzer)	BioLegend®, San Diego (USA)
GraphPad Prism Version 8.2.1	GraphPad Software, La Jolla (USA)
ImageJ	Wayne Rasband, Bethesda, National Institute of Health (USA)
LI-COR Image Studio Software	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
MarvinSketch	ChemAxon Ltd., Budapest (Ungarn)
Microsoft 365 Education Plus	Microsoft, Unterschleißheim
Picasa Version 3.9.141	Google Inc., Mountain View (USA)
SAP R/3 Software	SAP SE, Walldorf

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien

Im Nachfolgenden sind alle in der Arbeit verwendeten Zelllinien sowie das verwendete Medium aufgelistet.

Tabelle 3: Zelllinien

Zelllinie	Entität	Herkunft	Medium
A204	maligner Rhabdoid Tumor (mRT)	ATCC, Manassas (USA)	DMEM
A673	Ewing-Sarkom	ATCC, Manassas (USA)	DMEM
AFW-1	Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie, isoliert und etabliert von AG Fuchs	DMEM
Fibroblasten	benigne Zellen	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim	DMEM
HepG2	HCC	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig	DMEM
HepT1	Hepatoblastom	Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Bonn (Pietsch et al., 1996)	DMEM
HuH6	Hepatoblastom	JCRB Cell Bank (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank), Osaka (Japan)	DMEM
HuH7	HCC	JCRB Cell Bank (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank), Osaka (Japan)	DMEM
IMR32	Neuroblastom	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig	RPMI
LAN1	Neuroblastom	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig	RPMI

LS	Neuroblastom	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie / Onkologie, isoliert und etabliert von Prof. Dr. Handgretinger	RPMI
Makrophagen	benigne Zellen	Gesunde Spender	RPMI (speziell)
PBMCs	benigne Zellen	Gesunde Spender	RPMI
RD	embryonales Rhabdomyosarkom (RME)	ATCC, Manassas (USA)	DMEM
RD-ES	Ewing-Sarkom	ATCC, Manassas (USA)	DMEM
RH30	alveoläres Rhabdomyosarkom (RMA)	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig	DMEM
RMS33-2	RME	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie, isoliert und etabliert von AG Fuchs	DMEM
RUCH3	RME	Swiss Federal Institute of Technology, Zürich (Schweiz)	DMEM
SaOS	Osteosarkom	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig	RPMI
SH-SY5Y	Neuroblastom	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig	RPMI
SKMC	benigne Skelettmuskulatur	PromoCell GmbH, Heidelberg	DMEM
SKNBE	Neuroblastom	ATCC, Manassas (USA)	RPMI
SRH	RME	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie / Onkologie, isoliert und etabliert von Dr. Schleicher aus AG Handgretinger	DMEM
U2OS	Osteosarkom	ATCC, Manassas (USA)	DMEM

Die Zelllinien RD und RH30 wurden außerdem in funktionellen Assays untersucht, weswegen sie im Folgenden näher beschrieben werden.

RD

Die humane RD-Tumorzelllinie wurde aus einem siebenjährigen kaukasischen Mädchen mit einem pelvinen Rhabdomyosarkom-Rezidiv etabliert. Das Rhabdomyosarkom wurde vor der Biopsie mit Cyclophosphamid und perkutaner Radiatio behandelt (McAllister et al., 1969). Bei der RD-Tumorzelllinie handelt es sich histologisch um ein embryonales Rhabdomyosarkom (Kang et al., 2011). Die Zellen weisen eine ausgeprägte Polyploidie mit 51-Hyperdiploid Chromosomen auf. Molekulargenetisch liegt das *n-myc* Onkogen sowie die Q61H Mutation von *NRAS* und homozygote Mutation von *TP53* vor (Hinson et al., 2013).

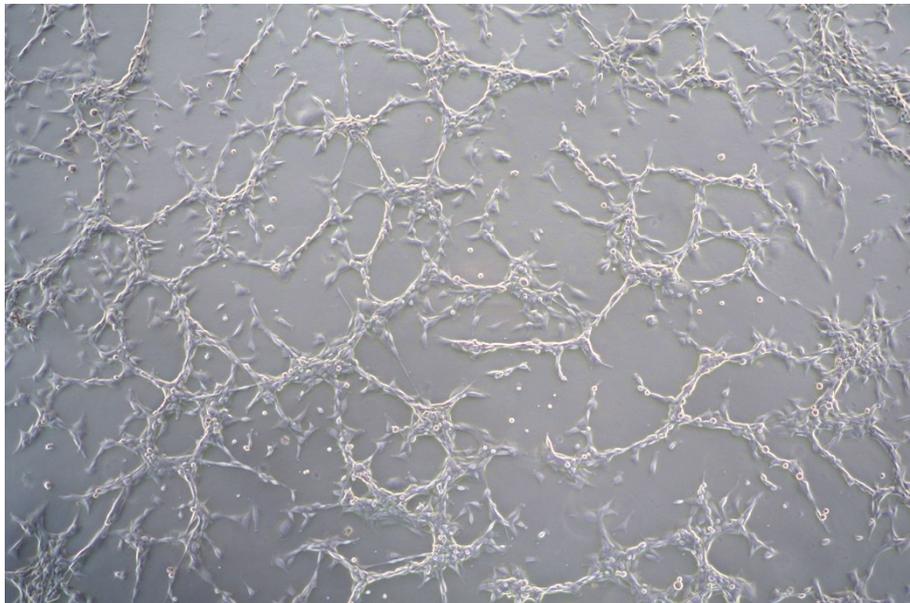


Abbildung 10: Wachstumsmuster der Zelllinie RD

Tumorzelllinie RD eines embryonalen Rhabdomyosarkoms, exemplarisch fotografiert in Passage 29, mit typisch adhärentem Wachstum als Monolayer. Morphologisch zeigen sich spindelförmige Zellen. 5x Vergrößerung.

RH30

Die RH30-Tumorzelllinie wurde von einem unbehandelten sechszehnjährigen Jungen mit metastasiertem alveolärem Rhabdomyosarkom etabliert. Die Zellen stammen hierbei aus einer Kultur über Nacht (ü.N.) aus dem Knochenmark. Im Karyogramm zeigt sich eine *t(2;13)* Translokation und eine *near-Triploidie* zwischen den Chromosomen 51 und 87. Im Gegensatz zum Xenograft, welcher

den Wildtyp des Tumorsuppressorgens TP53 exprimiert, besitzt die Zelllinie zu 60 % die heterozygote Mutation. Außerdem zeigt sich eine Amplifikation der 12q13-q15 Region, welche das Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4) Gen beinhaltet. Zudem sind hohe Expressionslevel der muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren Myogenin und MyoD1 vorhanden, welche die Differenzierung zwischen Myoblasten und Fibroblasten ermöglichen (Hinson et al., 2013, Rodriguez-Perales et al., 2004, Taylor et al., 2000).

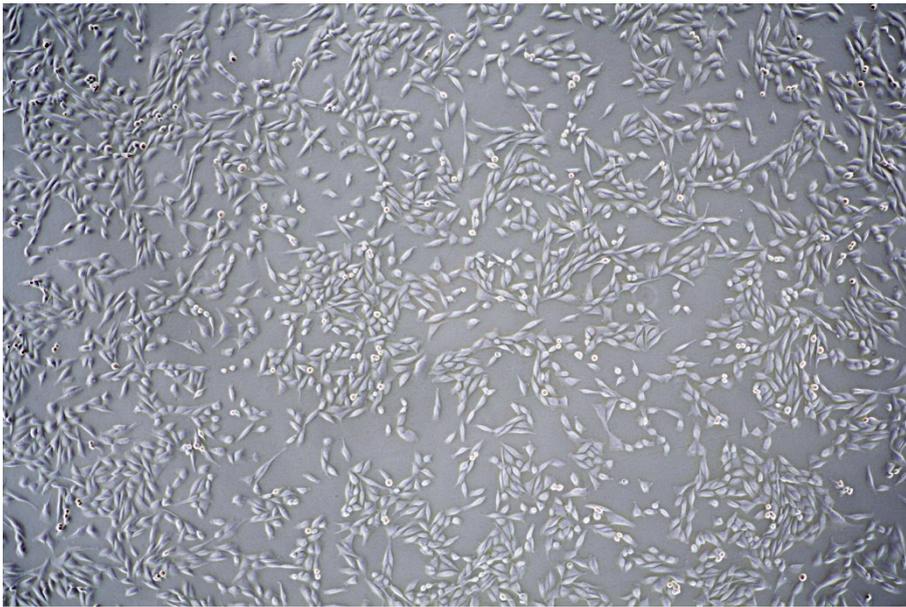


Abbildung 11: Wachstumsmuster der Zelllinie RH30
Tumorzelllinie RH30 eines alveolären Rhabdomyosarkoms, fotografiert in Passage 17, mit typischem adhärentem Wachstum als Monolayer. 5x Vergrößerung.

2.2.1.2 Arbeiten in der Zellkultur

In der Zellkultur wurde stets steril gearbeitet, um das Risiko einer Kontamination der Zellen so gering wie möglich zu halten. Hierzu wurden alle Arbeitsschritte unter einer Laminar-Flow-Sterilbank (siehe 2.1.2) durchgeführt, welche vor und nach Benutzung mit Descosept (siehe 2.1.1) desinfiziert wurde. Ebenso sind alle verwendeten Materialien steril verpackt, autoklaviert oder wurden zuvor gründlich desinfiziert. Auch wurde stets mit desinfizierten Handschuhen (siehe 2.1.1) gearbeitet.

Alle Zelllinien wurden zum Wachstum im Brutschrank (siehe 2.1.2) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen (siehe 2.1.1) kultiviert.

Die benötigten Nährstoffe erhalten die Zellen hierbei durch das verwendete Medium sowie durch dessen Zusätze aus fetalem Kalbsserum (FCS) und L-Glutamin (siehe 2.1.3). Das Medium variiert abhängig von der verwendeten Zelllinie (siehe Tab. 3 in 2.2.1.1) und wurde, wie in Kapitel 2.1.3 aufgeführt, vor erstmaligem Gebrauch mit weiteren Zusätzen, wie dem fetalen Kalbsserum (FCS), Penicillin und Streptomycin sowie L-Glutamin ergänzt.

Abhängig von der benötigten Zellzahl sowie dem Wachstumsverhalten der Zelllinie wurde mit verschiedenen Zellkulturflaschen gearbeitet, welche unterschiedliche Volumina benötigen. Die verwendeten Volumina an Medium und Zellkulturflaschen können aus Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Volumen des Zellkulturmediums in entsprechenden Zellkulturflaschen

Bezeichnung	Größe der Zellkulturflasche	Volumen des Mediums
T25	25 cm ³	5 ml
T75	75 cm ³	12 ml
T175	175 cm ³	25 ml

2.2.1.3 Passagieren

Täglich wurde das Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop (siehe 2.1.2) beurteilt, um ein rechtzeitiges Passagieren der Zellen zu gewährleisten und einen zu dichten Zellrasen, welcher eine Kontakthemmung der Zellen bedingt, zu vermeiden. Bei einer Konfluenz von etwa 80 % wurden die Zellen abhängig von ihrem individuellen Wachstum im Verhältnis von 1:2 bis 1:20 gesplittet.

Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Phosphate Buffered Saline (PBS) (siehe 2.1.3) gewaschen, um entstandene Zelltrümmer und tote Zellen zu entfernen. Anschließend wurde die Zelladhärenz mittels kurzer Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung (siehe 2.1.3) im Brutschrank gelöst. Zum Stoppen der Reaktion wurde kurz nach dem Lösen der Zellen das entsprechende Medium (siehe 2.1.3) hinzugegeben und resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspensionslösung wurde in die Zellkulturflasche zurückpipettiert, die übrigen Zellen verworfen oder für weitere Experimente verwendet. Die Zellkulturflasche wurde mit der entsprechenden Menge Medium aufgefüllt

(siehe Tab. 4) und mit dem Namen der Zelllinie, Datum, Passagier-Verhältnis und mit der Nummer der Passage beschriftet.

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Um Versuche miteinander vergleichen zu können, müssen diese mit derselben Zellzahl durchgeführt werden. Hierzu wurden die Zellen vor Beginn des Versuches gezählt. Es wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau resuspendiert und 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Trypanblau ist ein Farbstoff, welcher tote Zellen aufgrund ihrer durchlässigen Membran tiefblau färbt. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran nehmen den Farbstoff nicht auf und heben sich daher hell hervor. Die vitalen Zellen können somit in 10-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop gezählt werden. Während des Zählens wurde die restliche Zellsuspension 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (1500 rounds per minute (rpm)).

Neubauer-Zählkammer DHC-N01 (C-Chip)

NanoEnTek Inc., Seoul, Korea

Trypanblau (0,4%)

Lonza Group AG, Basel, Schweiz

In der Zählkammer wurden alle vier Quadrate ausgezählt und die Zellzahl mithilfe folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{S \cdot V \cdot 10^4}{4}$$

Dabei ist:

S = Zellzahl aus 4 Großquadraten der Neubauer-Zählkammer

V = Verdünnungsfaktor (= 2)

10⁴ = Kammerfaktor der Neubauer-Zählkammer

4 = Anzahl der Großquadrate

Der Überstand wurde abgesaugt und mit dem entsprechenden Volumen Medium resuspendiert, sodass eine Zellsuspension mit 1 x 10⁶ Zellen pro Milliliter vorliegt. Mit dieser genormten Zellsuspension konnten nun alle

Versuche mit derselben Zellzahl angesetzt werden. Die verwendeten Zellzahlen sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Zellzahlen der einzelnen Tumorzelllinien in den jeweiligen Versuchen
1) alle verwendeten Zelllinien, 2) RD-Zelllinie, 3) RH30-Zelllinie

Versuch	Zellzahl
FACS Messung	2 x 10 ⁶ Zellen / Dish ¹⁾
Transwell Migration Assay	15 x 10 ⁴ Zellen / Well ²⁾ 5 x 10 ⁴ Zellen / Well ³⁾
Colony Forming Assay	7,5 x 10 ² Zellen / Well ²⁾³⁾

2.2.1.5 Kryokonservierung und Auftauen

Alle Zelllinien wurden langfristig in einem Einfriermedium bei -196 °C in Kryoröhrchen in einem Stickstofftank (siehe 2.1.2) gelagert. Um die Zellen einzufrieren, wurden diese wie in Punkt 2.2.1.4 gezählt und in einer definierten Verdünnung (1,5 - 2 x 10⁶ Zellen / Kryoröhrchen) im Einfriermedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen mit einem Endvolumen von 1,5 ml aliquotiert und mittels Kryo-Gefrierbehälter in Isopropanol über 24 Stunden (h) um circa (ca.) -1 °C/min auf - 80 °C gekühlt und anschließend im Stickstofftank gelagert.

Für das erneute Auftauen der Zellen wurden diese im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Um eine Zerstörung der Zellen durch Dimethylsulfoxid (DMSO) zu verhindern, wurden die Zellen unverzüglich mit 10 ml des entsprechenden warmen Mediums vorsichtig resuspendiert. Daraufhin wurde die Suspension für fünf Minuten zentrifugiert (1500rpm / RT) und der Überstand abgesaugt. Das resultierende Pellet wurde abhängig von der benötigten Zellkulturflasche mit der entsprechenden Menge Medium (siehe Tab. 4) resuspendiert und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Die Adhärenz der Zellen wurde nach ca. 24 h kontrolliert und der erste Mediumwechsel inklusive Waschen mit PBS vorgenommen. Nach etwa zwei bis drei Passagen waren die Zellen für die darauffolgenden Experimente einsetzbar.

Einfrüermedium	
90 % FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom GmbH, Berlin
10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kryoröhrchen Cryo's	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gefrierbehälter (5100 Cryo „Mr.Frosty“)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

2.2.1.6 Isolation von PBMCs

Bei PBMCs (von engl. *peripheral blood mononuclear cells*) handelt es sich um eine Mischpopulation aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes. Hierzu zählen B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen sowie Monozyten. Die Gewinnung von PBMCs erfolgte aus den Buffy-Coats von gesunden Spendern, welche vom Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin zur Verfügung gestellt wurden. Für die Isolation der PBMCs wird am häufigsten die Dichtegradientenzentrifugation verwendet, bei welcher die PBMCs mithilfe eines ungeladenen Sukrose-Polymers (Biocoll) anhand ihrer Dichte von anderen Blutbestandteilen getrennt werden. Nach erfolgter Zentrifugation liegen Erythrozyten sowie tote Zellen aufgrund ihrer geringen Größe in der unteren Phase des Biocolls, während sich Granulozyten in der Biocoll-Phase befinden und das Blutplasma oberhalb des Biocolls. Die PBMCs sind aufgrund ihrer Dichte von 1,077 g/ml in der Interphase zwischen Plasma und Biocoll lokalisiert und können hierdurch abgenommen werden.

Durchführung:

Für die Isolation wurden die Buffy-Coats zu Beginn in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit derselben Menge PBS verdünnt und gemischt. Zudem wurde in einem weiteren 50 ml Zentrifugenröhrchen 20 ml Biocoll vorgelegt. Daraufhin wurde die Zellsuspension langsam auf das Biocoll aufgeschichtet und bei RT und einer Radialbeschleunigung von 760 x g (g: Erdbeschleunigung) für 20 Minuten zentrifugiert (siehe 2.1.2). Hierbei wurde bei der ersten Zentrifugation die Zentrifugenbremse ausgeschaltet, um den Zellgradienten nicht zu zerstören. Nach erfolgter Zentrifugation wurde die Interphase mit den

enthaltenen PBMCs entnommen, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und vier Mal mit 20 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die PBMCs wie in 2.2.1.4 gezählt und bis zur Verwendung in RPMI Medium inkubiert.

BIOCOLL (1,077 g/ml, isotonisch)

Biochrom GmbH, Berlin

2.2.1.7 Differenzierung von Makrophagen

Die in dieser Forschungsarbeit verwendeten Makrophagen wurden *in vitro* aus isolierten Monozyten von PBMCs (siehe 2.2.1.6) differenziert.

Durchführung:

Es wurden 1×10^7 PBMCs in sechs Wells einer 6-Well Platte vorgelegt und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Adhäsion folgten zwei Waschschrte mit jeweils 2 ml PBS. Daraufhin wurden 3 ml Differenzierungsmedium hinzugegeben und für sieben Tage im Brutschrank inkubiert, wobei an Tag drei und sechs ein Mediumwechsel erfolgte. Anschließend wurden die erhaltenen Makrophagen wie in 2.2.1.4 gezählt und dem Experiment entsprechend angelegt.

Differenzierungsmedium für Makrophagen

88 % RPMI

Biochrom GmbH, Berlin

10 % FCS (fetales Kalbsserum)

Biochrom GmbH, Berlin

1 % L-Glutamin (200 mM)

Biochrom GmbH, Berlin

1 % Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin
(10.000 µg/ml)

Biochrom GmbH, Berlin

1 x Natriumpyruvat; Gibco

Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

1 x MEM Non-essential Amino Acids; Gibco

Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

100 ng/ml rh-M-CSF

Immuno Tools GmbH, Friesoythe

2.2.2 Antikörper gegen den nf-P2X₇ Rezeptor

Die Firma Biosceptre mit ihrem Hauptsitz in Sydney (Australien) entwickelte eine Bandbreite an verschiedenen onkologischen Immuntherapeutika gegen den non-functional P2X₇ Rezeptor (nf-P2X₇ Rezeptor) (siehe 1.2.3) (Biosceptre international Limited, 2019c). In dieser Arbeit wurden die nf-P2X₇ Antikörper BIL03s und BPM09 verwendet. Diese wurden durch eine Immunisierung mit

dem Epitop E200 (siehe 1.2.3) entwickelt und zeigen eine spezifische Bindung an den nf-P2X₇ Rezeptor (Gilbert et al., 2019, Biosceptre International Limited, 2017, Barden and Gidley-Baird, 2010b).

2.2.2.1 BIL03s Antikörper

Der BIL03s ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den nf-P2X₇ Rezeptor (Gilbert et al., 2019). In Gilbert et al. (2019) wurde gezeigt, dass die Bindung von BIL03s durch zusätzliche Verwendung des Epitops E200 kompetitiv gehemmt wird. Daraus lässt sich schließen, dass BIL03s über seine komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) an den nf-P2X₇ Rezeptor bindet (Gilbert et al., 2019).

Der BIL03s Antikörper findet *in vitro* Anwendung in soliden und hämatologischen Tumoren. Eine Inkubation mit BIL03s verursacht in vielen Tumorzelllinien ein inhibiertes Wachstum (Barden et al., 2009). Der Antikörper zeigt in toxikologischen und präklinischen Studien ein gutes Sicherheitsprofil sowie in Mäusen bereits Hinweise auf eine klinische Wirksamkeit (Biosceptre International Limited, 2017, Biosceptre International Limited, 2019a). Der BIL03s Antikörper wurde mit dem Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) für durchflusszytometrische Messungen markiert.

BIL dAB 2-2-1hFC 20140228, Dispensed: 07102014, 11.5 mg/ml	Biosceptre (Aust) PTY LTD, Sydney (Australien)
BIL03s FITC (SMG0117) – 2mg/ml – 26,6µM	Biosceptre (Aust) PTY LTD, Sydney (Australien)
E200 Peptide (2575406) – 5mg/ml – 2,7mM	Biosceptre (Aust) PTY LTD, Sydney (Australien)

2.2.2.2 BPM09 Antikörper

Der Antikörper BPM09 ist ein mittels Hybridom-Technik synthetisierter, monoklonaler IgG2aλ Maus-Antikörper (Gilbert et al., 2019, Barden et al., 2014, Biosceptre International Limited, 2017). Er stammt von der Hybridomzelllinie Cellosaurus AB253, welche in der European Collection of Cell Cultures (ECACC) unter der Nummer 06080101 hinterlegt ist (Barden and Gidley-Baird,

2010b). Die Hybridom-Technik ist ein Verfahren, bei dem Hybrid-Zellen, welche durch Fusion aus malignen Myelomzellen und B-Lymphozyten entstehen, monoklonale Antikörper produzieren (Winter and Milstein, 1991, Griffiths and Milstein, 1985). Monoklonale Antikörper entstammen einer Population aus wesentlich homogenen Antikörpern, welche abgesehen von kleinen natürlich auftretenden Mutationen identisch und dadurch hoch spezifisch sind (Barden and Gidley-Baird, 2010b).

Der BPM09 Antikörper wurde als diagnostischer Antikörper entwickelt. In immunhistochemischen Färbungen zeigt er eine starke Färbung von Tumorgewebe und eine nur minimale Färbung von Normalgewebe (Slater et al., 2004a, Slater et al., 2004b, Barden and Gidley-Baird, 2010b, Barden and Gidley-Baird, 2010a, Barden et al., 2014, Barden et al., 2016, Gilbert et al., 2019).

Anti-nfP2X ₇ antibody BPM09. 1FSM, Host: mouse 7,6 mg /ml, Stock: 100 µg/ml	Biosceptre (Aust) PTY LTD, Sydney (Australien)
---	---

2.2.2.3 Übersicht über verwendete nf-P2X₇ Antikörper

Eine Übersicht über die verwendeten nf-P2X₇ Antikörper in den nachfolgenden Methoden bietet Tabelle 6.

Tabelle 6: Übersicht über verwendete nf-P2X₇ Antikörper

Methode	Antikörper	Herkunft
Durchflusszytometrie	BIL03s FITC	Biosceptre (Aust) PTY LTD, Sydney (Australien)
Immunhistochemie	BPM09	
Calcium-Messung	BIL03s	
Transwell Migration Assay	BIL03s	
Colony Forming Assay	BIL03s	

2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur gleichzeitigen phänotypischen, molekularen und funktionalen Charakterisierung von einzelnen Zellen in einer Suspension. Die Methode selbst beruht auf der Messung optischer

Eigenschaften von Zellen durch die Bestrahlung mit Licht. Durch die hohe Messrate kann hierbei eine schnelle und repräsentative Stichprobe einer Zellpopulation erfasst werden (Hawley and Hawley, 2004, Sack et al., 2007).

Für eine akkurate Messung wird jede Zelle einzeln mit der gleichen Menge Licht eines fokussierten Lasers bestrahlt. Durch Unterdruck wird die Zellsuspension aus dem Proberöhrchen in eine dünne Kapillare gesaugt und mithilfe einer hydrodynamischen Fokussierungstechnik bis auf einen Mikrometer genau positioniert. Hierbei werden die Zellen in einer Fluss-Kammer von einer laminaren Strömung aus Hüllflüssigkeit umspült und aufgrund eines geringer werdenden Durchmessers beschleunigt. Die Zellen passieren somit einzeln den Messpunkt, in welchem der fokussierte Laserstrahl auf die Zelle trifft (siehe Abbildung 12A) (Cossarizza et al., 2017, Sack et al., 2007).

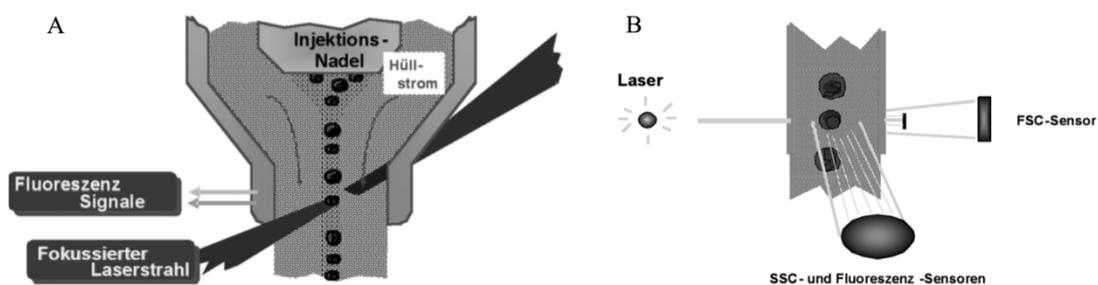


Abbildung 12: Prinzip der durchflusszytometrischen Messung (A) und Geometrie der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenz (B) (Sack et al., 2007)

Einfach betrachtet ist das Durchflusszytometer ein Licht-Detektions-Gerät, welches nachdem die Zellen mit Licht bestrahlt wurden, Photonen unterschiedlicher Wellenlänge detektiert (siehe Abb. 12B). Hierzu sammeln Linsen das emittierte Licht der Zellen und parallelisieren es in Richtung des spektral breitbandigen Detektors, welcher durch optische Filter und dichroitische Spiegel spezifiziert wird (Cossarizza et al., 2017).

Das zu detektierende Streulicht einer Zelle wird durch strukturelle Membraneigenschaften, intrazelluläre Bestandteile und die Zellgröße bestimmt. Das Vorwärtsstreulicht (kurz FSC von engl. *forward side scatter*), welches den größten Teil des Streulichts darstellt, ist ein Maß für die Größe der Zellen (siehe Abb. 12B). Einen kleineren Teil des Streulichts macht das im rechten Winkel

gestreute Seitwärtslicht (kurz SSC von engl. *sideward light scatter*) aus, welches mit der Granularität der Zellen korreliert (siehe Abb. 12B). Durch die Detektion von FSC und SSC können die Zellen somit phänotypisch unterschieden werden (Sack et al., 2007, Cossarizza et al., 2017).

Zusätzlich zur Detektion des Streulichts wurden die von der Zelle ausgehenden Fluoreszenzsignale gemessen. Diese entstehen durch an spezifische monoklonale Antikörper gekoppelte fluoreszierende Farbstoffe (Fluorochrome). Durch die Absorption der Lichtenergie geht das Fluorochrom in einen energetisch höheren Zustand über und emittiert bei Rückkehr in den Grundzustand Licht einer definierten Wellenlänge, welches über die Detektoren gemessen wird. Die gemessenen Fluoreszenzsignale entsprechen dabei beispielsweise der Menge an gebundenen Antikörpern (Sack et al., 2007).

Darüber hinaus wurden die Zellen mit dem Farbstoff 7-Amino-Actinomycin D (7AAD) gefärbt, welcher an die Desoxyribonucleinsäure (DNS) toter Zellen bindet und eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen in der Auswertung ermöglicht. Am Beispiel der Kombination der beiden Farbstoffe FITC und 7AAD wird deutlich, dass Fluorochrome mit ähnlicher Wellenlänge angeregt werden und trotzdem gleichzeitig durch unterschiedliche Emissionsspektren gemessen und differenziert werden können (siehe Abb. 13).

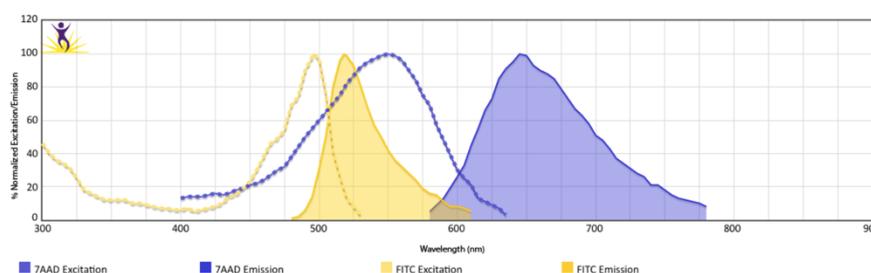


Abbildung 13: Exzitations- & Emissionsspektren von 7AAD und FITC
Erstellt mit Fluorescence Spectra Analyzer von BioLegend (siehe 2.1.4)

2.2.3.1 Durchführung der Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Messung wurden die zu untersuchenden Zellen am Vortag in Zellkulturschalen angelegt und im Brutschrank bei 37 °C für 24 h inkubiert. Die verwendeten Zellzahlen sind Tabelle 5 (siehe 2.2.1.4) zu

entnehmen. Am Versuchstag wurden die Zellen zu Beginn mit 5 ml PBS gewaschen und zur Lösung der Zelladhäsion 5 - 30 Minuten (je nach Zelllinie) mit 2 ml Cell Dissociation Buffer im Brutschrank inkubiert. Dabei gewährleistet die Verwendung des enzymfreien Cell Dissociation Buffers durch eine langsame Dissoziation der Zellen intakte Zelloberflächenproteine. Die dissoziierten Zellen wurden anschließend mit dem entsprechenden Medium verdünnt, wie in Punkt 2.2.1.4 gezählt und mit eisgekühltem FACS-Puffer auf 1×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt.

Für die verschiedenen Behandlungsansätze wurden pro Zelllinie drei FACS-Röhrchen mit 1×10^5 Zellen verwendet. Jedes FACS Röhrchen wurde mit 3 ml FACS-Puffer bei 1500 rpm für 5 Minuten bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Antikörper BIL03s für eine Stunde bei 4 °C im Dunkeln. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers BIL03s nachzuweisen, wurde bei jeder Messung eine Kontrolle verwendet, welche zusätzlich mit dem Epitop E200 (siehe 2.2.2.1) behandelt wurde. Dieser Nachweis beruht auf Gilbert et al. (2019), welcher bei Verwendung des Epitops E200 die kompetitive Hemmung der Bindung des Antikörpers BIL03s zeigte (Gilbert et al., 2019). Für die initiale Einstellung der Achsenparameter der Dot-Plots (Gating) (siehe 2.2.3.2) anhand unbehandelter Zellen wurde ein Behandlungsansatz lediglich mit FACS-Puffer inkubiert. Die verschiedenen Behandlungsansätze sind Abbildung 14 zu entnehmen.

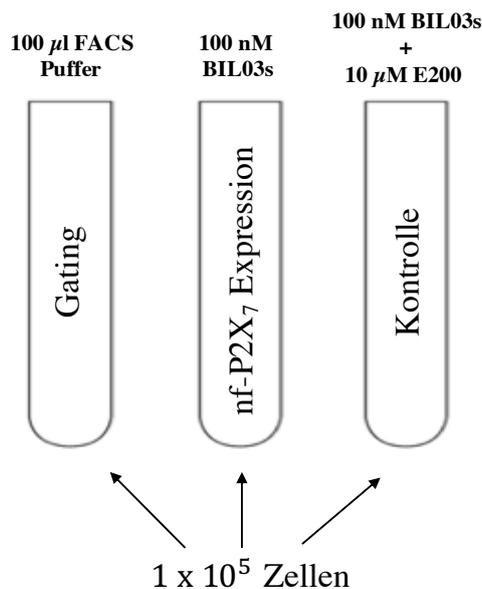


Abbildung 14: Behandlungsansätze für durchflusszytometrische Messung

Nach erfolgter Inkubation wurde erneut drei Mal mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die FACS Röhrrchen geratscht, mit jeweils 2,5 µl 7AAD gefärbt und daraufhin sofort die durchflusszytometrische Messung gestartet. Währenddessen wurden die FACS Röhrrchen auf Eis im Dunkeln zwischengelagert.

Cell Dissociation Buffer	Life technologies™, Carlsbad, USA
FACS-Puffer	
- 98% Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺) 1x-PBS	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
- 2% FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom GmbH, Berlin
7-AAD Viability Staining Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Sample Prep ready 40-tube rack	Becton Dickinson, Heidelberg
Cell WASH solution	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrrchen (5 ml Rundboden)	Corning Incorporated, New York, USA
FACS-Safe	Becton Dickinson, Heidelberg

2.2.3.2 Auswertung der Durchflusszytometrie

Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mit der BD FACS Diva Software Version 8.0.1.

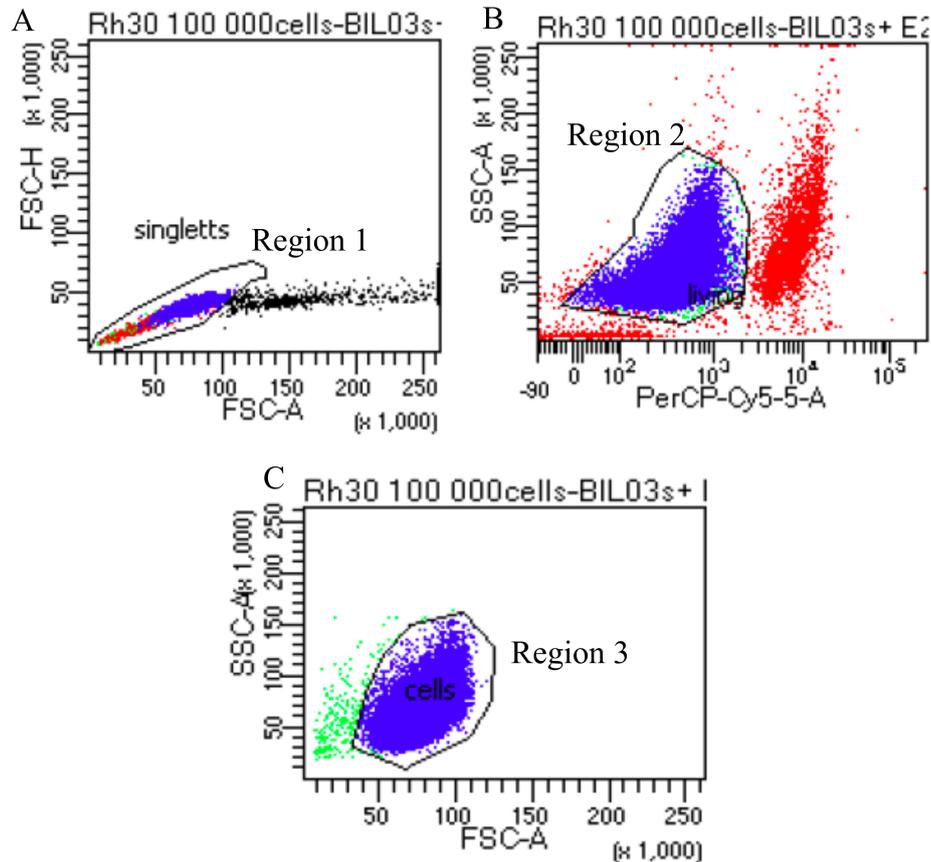


Abbildung 15: Exemplarische Dot-Plots einer durchflusszytometrischen Messung der BIL03s FITC und 7AAD (PerCP-Cy5-5-A) Färbung der RMA-Zelllinie RH30

Es sind zwei-dimensionale Dot-Plot Analysen dargestellt, welche jeweils aufeinander aufbauen. (A) Dot-Plot mit den Kanälen FSC-H (height) und FSC-A (area). Mit Region 1 werden einzelne Zellen identifiziert. Die außerhalb der Region 1 liegenden Zellen haben, verglichen zu der Höhe (FSC-H) und Fläche (FSC-A) einer einzelnen Zelle, eine größere Fläche (FSC-A) und entsprechen somit Dubletten oder Artefakten. (B) Der Dot-Plot stellt die definierten einzelnen Zellen aus Region 1 mit den Kanälen SSC-A und PerCP-Cy5-5-A dar. In der hinzugefügten Region 2 werden vitale Zellen definiert. (C) Der Dot-Plot stellt die aus Region 2 definierten einzelnen, vitalen Zellen mit den Kanälen SSC-A und FSC-A dar. Region 3 definiert die gemessenen Zellen nach Zellgröße und Granularität.

Durch die in Abbildung 15 gezeigte Gating-Strategie konnte die vitale Population, welche in Einzelzellen vorlag, herausgefiltert werden. Anschließend erfolgte das Gating sowie die Auswertung auf FITC-positive bzw. -negative Fluoreszenzsignale (siehe Abb. 16).

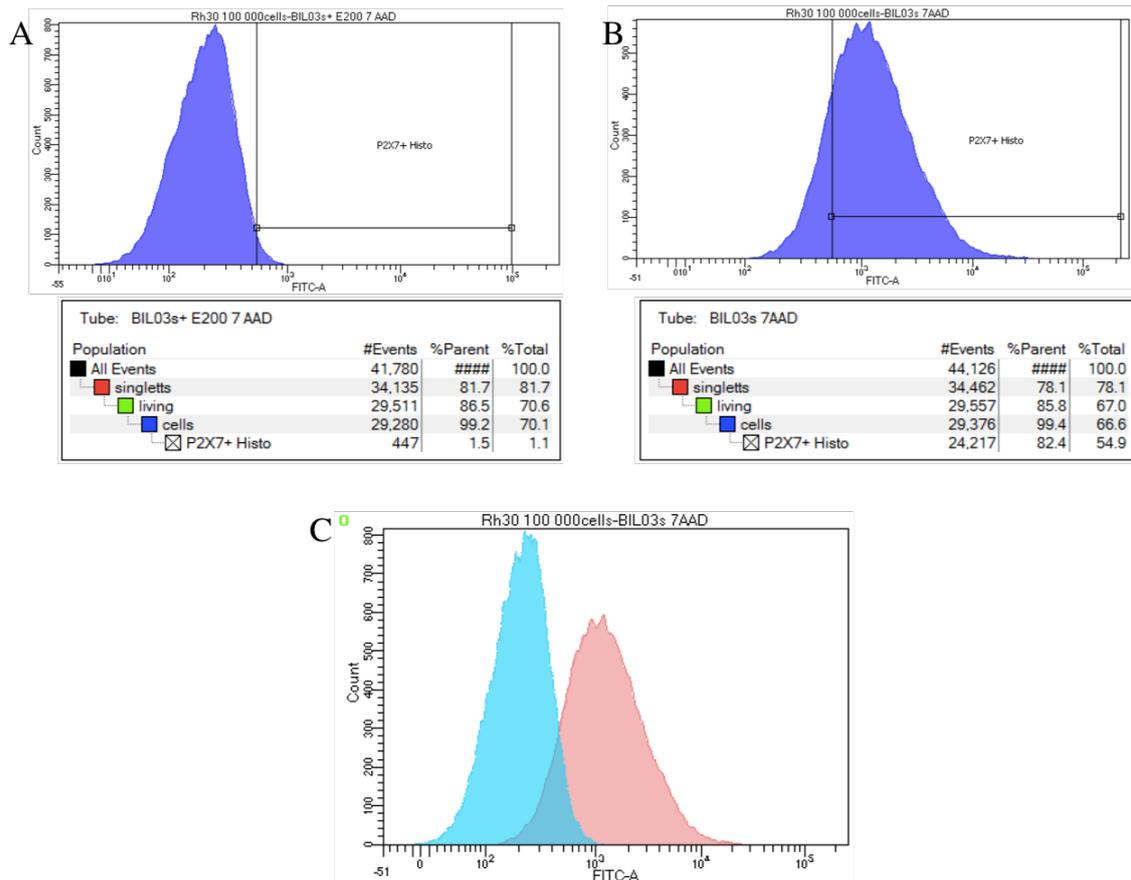


Abbildung 16: Histogramme und Overlay einer exemplarischen durchflusszytometrischen Messung der RMA-Zelllinie RH30

Es wurden Histogramme der Zellen aus Region 3 mithilfe der in Abbildung 15 dargestellten Gating-Strategie zur Auswertung der FITC-Fluoreszenzsignale erstellt. (A) zeigt das Histogramm einer durchflusszytometrischen Messung der RH30 Kontrolle mit BIL03s FITC und E200. Die nf-P2X₇ positiven Zellen wurden auf 1,5 % definiert. (B) zeigt das Histogramm einer durchflusszytometrischen Messung der RH30 Zellen mit BIL03s FITC Behandlung. Mit demselben Gate wie in (A) sind 82,4 % nf-P2X₇ positiv. (C) zeigt das Overlay der Histogramme aus (A) und (B).

Für die Detektion unspezifischer Bindungen des Antikörpers BIL03s wurde bei jeder Messung eine Kontrolle verwendet, welche zusätzlich mit dem Epitop E200 (siehe 2.2.2.1) behandelt wurde. Dieser Nachweis beruht auf Gilbert et al. (2019), welcher anhand des Epitops E200 die kompetitive Hemmung der Bindung des Antikörpers BIL03s zeigte (Gilbert et al., 2019).

In Abbildung 16A ist das Histogramm einer Messung von RH30 Zellen dargestellt, welche als Kontrolle mit BIL03s und E200 behandelt wurden. Die Zellen wurden wie in Abbildung 15 und 16 beschrieben gated. Das Gate der gemessenen FITC Fluoreszenz wurde im Histogramm auf 1,5 % festgelegt und die mit BIL03s inkubierten Zellen mit demselben Gate berechnet (siehe Abb.

16B). Mit dieser Methode wurden die nf-P2X₇ positiven Zellen in Prozent ermittelt. Ein Overlay beider Histogramme ist in Abbildung 16C dargestellt.

Für die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in jeder Messung der Median der gesamten Zellpopulation ermittelt. Anschließend wurde der MFI der BIL03s Behandlung in Bezug auf die entsprechende Kontrolle wie folgt berechnet:

$$\frac{MFI (BIL03s)}{MFI (BIL03s + E200)}$$

2.2.4 Immunhistochemie (IHC)

Für eine primäre Beurteilung des Tumorgewebes wurden die Tumorschnitte vorab mit einer Hämatoxylin–Eosin-Färbung (H&E) gefärbt. Anschließend erfolgte eine immunhistochemische Färbung, mit welcher Zell- oder Gewebestrukturen durch Verwendung von spezifischen Antikörpern morphologisch charakterisiert werden können. Grundsätzlich werden die direkte und indirekte Färbemethode unterschieden. Im Gegensatz zur direkten Färbung, bei welcher der primäre Antikörper mit einem Marker gekoppelt ist, enthält bei der hier verwendeten indirekten Färbung der sekundäre Antikörper einen gekoppelten Marker (hier Biotin). Der sekundäre Antikörper bindet dabei an die Fc-Region des primären Antikörpers (siehe Abb. 17 in 2.2.4.4).

2.2.4.1 *Schneiden der Schnitte*

Mit einem Mikrotom wurden die ausgewählten Paraffinblöcke 4 µm dick geschnitten und im Streckbad bei 45 °C aufgezogen und auf Objektträger aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte auf einer 45 °C warmen Heizplatte über Nacht getrocknet.

Mikrotom Leica RM 2155	Leica, Wetzlar
Paraffinstreckbad HI1210	Leica, Wetzlar
Objektträger-Strecktisch HI1220	Leica, Wetzlar
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen

2.2.4.2 Entparaffinierung der Schnitte

Für die Entparaffinierung wurden die Paraffinschnitte in Roti-Histol zwei Mal für 10 Minuten inkubiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe und Aqua bidest hydrophilisiert (jeweils 3 Minuten in Ethanol 100% → 90% → 80% → 70%). Ab diesem Zeitpunkt kann eine Färbung der Schnitte in wässrigen Lösungen unter der Beachtung erfolgen, dass die Schnitte nun nicht mehr austrocknen dürfen.

Roti® -Histol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethanol 99% vollständig vergällt mit MEK (Bitrex)	SAV Liquid production GMBH, Flintsbach am Inn
„Assistent“ – Färbetrog	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v.d.Röhn

2.2.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E)

Zu Beginn wurden die benötigten Hämalan und Eosin Lösungen vorbereitet. Eine detaillierte Beschreibung ist in den folgenden Tabellen 7 und 8 dargestellt. Beide Lösungen sollten nach Gebrauch in ca. 1 - 2 Wochen erneuert werden.

Tabelle 7: Herstellung einer Häkalaun Lösung

Reihenfolge	Reagenz	Menge	Anmerkung
1	Hämatoxilin	1,0 g	Hämatoxilin in Aqua dest. lösen
2	Aqua dest.	600 ml	
3	Natriumjodat	0,2 g	zugeben
4	Aluminiumkaliumsulfat	91,8 g	zugeben, löst sich evtl. nicht ganz auf
5	Chloralhydrat	50 g	zugeben, es erfolgt ein blau-violetter Farbumschlag
6	Zitronensäure	1,0 g	zugeben
7	Mit Aqua dest.	auf 1000 ml auffüllen	

Tabelle 8: Herstellung einer 1 % wässrigen Eosin Vorratslösung

Reihenfolge	Reagenz	Menge	Anmerkung
1	Eosin	10 g	Eosin in Aqua dest. lösen
2	Aqua dest	1000 ml	

Für die Herstellung der Eosin-Gebrauchslösung wurde die in Tabelle 8 dargestellte Eosin-Vorratslösung im Verhältnis 1:10 verdünnt. Hierzu wurden 20 ml Eosin Vorratslösung, 180 ml Wasser (H₂O) und 3 Tropfen hundertprozentige Essigsäure gemischt. Die Essigsäure diente hierbei zur Intensivierung der Färbung.

Hämatoxilin, A3865	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumjodat, Nr. 1,06525	Merck, Darmstadt
Aluminiumkaliumsulfat, Nr. 1,04936	Merck, Darmstadt
Chloralhydrat, Nr. 1,02425	Merck, Darmstadt
Citronensäure, Nr.1,00244,	Merck, Darmstadt
Eosin, Nr. 7089.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
100 % Essigsäure, Nr. UN2789	VWR, Radnor (USA)

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) wurden die entparaffinierten Schnitte 4 Minuten in der Häkalaun-Lösung gefärbt und anschließend über 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach einer kurzen Spülung mit Aqua dest. folgte die Färbung mit Eosin für 2 Minuten. Danach erfolgte eine kurze Inkubation in 70 % Alkohol, anschließend mit 96 % Alkohol und daraufhin eine zweimalige Inkubation mit 100 % Alkohol für jeweils 1 Minute. Zum Schluss

wurden die Schnitte zwei Mal für jeweils 1 Minute in Xylol inkubiert und anschließend eingedeckt.

2.2.4.4 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Färbung wurden entparaffinierte Schnitte verwendet. Die durch die Paraffineinbettung maskierten Antigene wurden zu Beginn demaskiert, sodass eine Bindung von Antikörpern möglich ist. Hierzu wurden die Schnitte in einem Citratpuffer (Working Solution, siehe Tab. 9) auf 100 °C für 20 Minuten aufgekocht, auf RT abgekühlt und anschließend für drei Minuten in Aqua bidest gewaschen.

Tabelle 9: Herstellung eines Citratpuffers

Stock A	Stock B	Working Solution
4,2 g Zitronensäure	14,7 g Natrium-Dihydrat	9 ml Stock A
200 ml Aqua dest.	500 ml Aqua dest.	41 ml Stock B
		450 ml Aqua dest.

Zitronensäure Monohydrat	Merck, Darmstadt
tri-Natrium-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Manueller Kleinautoklav ohne Heizung, 12l	A. Wolf SANOclav, Bad Überkingen-Hausen
Siebkorb für 12l Autoklav	A. Wolf SANOclav, Bad Überkingen-Hausen
Heizplatte für KL	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase Aktivität wurden die Schnitte in frisch angesetztem 0,3 % Peroxid in Aqua dest. in Färbetrögen für 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei RT in TRIS 1x Waschpuffer (siehe Tab. 10) unter ständiger Bewegung auf dem Logic Shaker gewaschen.

Tabelle 10: TRIS Waschpuffer

TRIS 10x (pH = 7,44)	TRIS 1x
12 g Trizma ® Base	100 ml TRIS 10x
162 g NaCl	900 ml Aqua bidest.
ad Aqua dest. 2 l	

Die Schnitte wurden anschließend mit einem Fettstift umrandet und in 3 % Ziegen Serum (*goat serum*) (verdünnt mit TRIS 1x) für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert, um mögliche unspezifische Bindungsstellen

zu blockieren. Danach wurde erneut mit TRIS 1x für 5 Minuten bei RT gewaschen.

Hydrogen peroxide 30 % (Perhydrol)	Merck, Darmstadt
Trizma® base	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH,
NaCl	Steinheim
Färbetrog, Hellendahl mit Erweiterung PMP, glasklar	Carls Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Goat Serum (Normal)	Brand, Darmstadt
Inkubationskammer für Objektträger	Dako, Glostrup, Dänemark
Dako Pen, Code 2002 (Fettstift)	Weckert Labortechnik, Kitzingen
	Dako, Glostrup, Dänemark

Als primärer Antikörper wurde der nf-P2X₇ Antikörper BPM09 (siehe 2.2.2.2) verwendet. Nach einer zu Beginn der Arbeit durchgeführten Verdünnungsreihe wurden die in Tabelle 11 dargestellten Konzentrationen verwendet.

Tabelle 11: Verwendete Antikörper Konzentrationen in der IHC

	nf-P2X₇ IHC
Primärer Antikörper	1:166,67 in TRIS 1x
Sekundärer Antikörper	1:500 in TRIS 1x (Anti-Maus)

Der primäre Antikörper wurde nach dem Waschen auf die Schnitte aufgetragen und bei 4 °C ü.N. in einer feuchten Kammer inkubiert. Für die Kontrollen wurde TRIS 1x verwendet. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zwei Mal für 5 Minuten in TRIS 1x bei RT gewaschen und der sekundäre Antikörper aufgetragen, welcher an die Fc-Region des primären Antikörper bindet. Dieser wurde für 45 Minuten bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit TRIS 1x zwei Mal für 5 Minuten gewaschen.

Der sekundäre Antikörper ist zusätzlich an Biotin gekoppelt. Dieses Biotin bildet im nächsten Schritt mit Avidin ein Avidin-Biotin-Enzym-Komplex, wodurch eine Signalverstärkung erzielt wird (siehe Abb. 17). Hierzu wurde ein ABC Kit verwendet, welches 30 Minuten zuvor nach Herstellerangaben gemischt und im Dunkeln bei RT inkubiert wurde. Nach 30 Minuten Inkubationszeit in der feuchten Kammer bei RT wurde das ABC Kit abgetropft und die Schnitte drei Mal für 5 Minuten mit TRIS 1x gewaschen. Der Avidin-Biotin-Enzym-Komplex

kann im nächsten Schritt mithilfe einer Peroxidase Reaktion und der daraus resultierenden Braunfärbung detektiert werden.

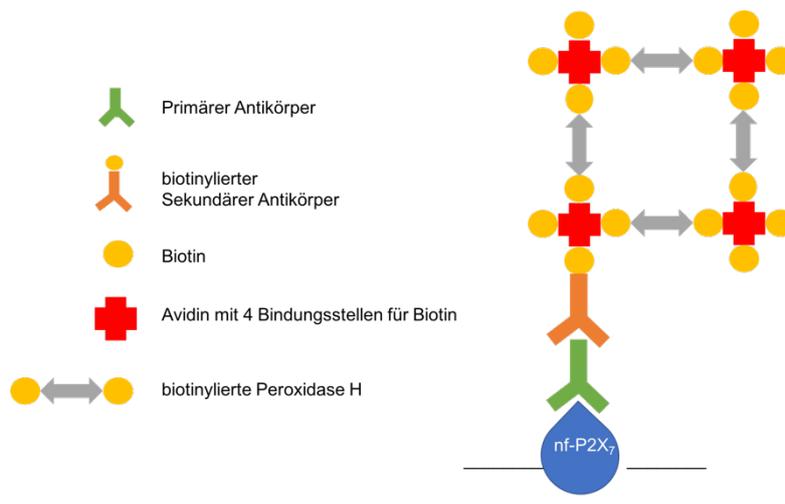


Abbildung 17: Indirekte immunhistochemische Färbung unter Verwendung der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode

Im ersten Schritt der indirekten Färbung reagiert der primäre Antikörper mit dem zu detektierenden Antigen, in diesem Fall das Epitop E200 des nf-P2X₇ Rezeptors. Anschließend bindet ein sekundärer Antikörper an die Fc-Region des Antigen-Antikörper-Komplexes. Der sekundäre Antikörper ist hierbei selbst an Biotin gekoppelt. Durch Verwendung der ABC-Methode erhält die im Anschluss verwendete Peroxidase Reaktion eine Vervielfachung der Angriffsfläche, wodurch eine starke Farbreaktion und somit Detektion des gesuchten Epitops ermöglicht wird.

Für die Peroxidase Reaktion wurde ein Peroxidase Substrat Kit verwendet, welches für etwa 5 - 10 Minuten auf die Schnitte aufgetragen wurde. Sobald eine Braunfärbung der Kontrolle sichtbar war, wurde die Reaktion abgebrochen und die Objektträger in Aqua bidest überführt.

Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment	Jackson-Immuno-Research
Donkey Anti-Mouse-IgG (H+L)	Laboratories, Inc., West Grove, USA
Vecatstain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Inc. ; Burlingame (USA)
DAB Peroxidase Substrate KIT SK-4100	Vector Laboratories, Inc. ; Burlingame (USA)

Anschließend wurden die Schnitte für etwa 30 Sekunden in Mayers Hämalaunlösung gegengefärbt und für 10 Minuten in einer Glasschale unter fließendem Leitungswasser gebläut. Daraufhin wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (identisch zu der des Vortags) gearbeitet und abschließend die Schnitte für 10 Minuten in Roti Histol inkubiert. Das Gewebe wurde am Ende mithilfe von Pertex eingebettet und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

MAYERS-Hämalaunlösung für die Mikroskopie	Merck, Darmstadt
Roti ® -Histol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Pertex ® Synthetisches Eindeckmittel	medite GmbH, Burgdorf
Deckgläser 24x60mm, Glasdicke 0,13-0,16	R. Langenbrinck GmbH, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen

2.2.4.5 Auswertung der Immunhistochemie

Zur Auswertung der IHC wurden Tumorproben von Patienten mit Rhabdomyosarkom (Anzahl n = 16), Neuroblastom (n = 9), Wilms Tumor (n = 5), Hepatoblastom (n = 4) und hepatozellulärem Karzinom (HCC) (n = 8) untersucht. Ein entsprechendes Ethikvotum wurde von einer unabhängigen Ethik-Kommission bewilligt und ist unter der Projektnummer 354/2018A hinterlegt.

Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung wurde durch das Pathologische Institut Tübingen eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) der jeweiligen Tumorprobe angefertigt und der Anteil vitaler zu nekrotischer Tumoreareale ermittelt. Anschließend wurden nur Tumorschnitte mit einer Vitalität > 50 % immunhistochemisch gefärbt. Auch die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte gemeinsam mit dem Pathologischen Institut Tübingen.

Wie in Gilbert et al. (2019) beschrieben, wurden die immunhistochemischen Färbungen anhand ihrer nf-P2X₇ Expressionsstärke in Stadien eingeteilt (Gilbert et al., 2019). Dabei beschreibt Stadium 0 keine Expression, Stadium 1 eine geringe Expression, Stadium 2 eine mäßige Expression und Stadium 3 eine starke Expression des nf-P2X₇ Rezeptors (siehe Abb. 18).

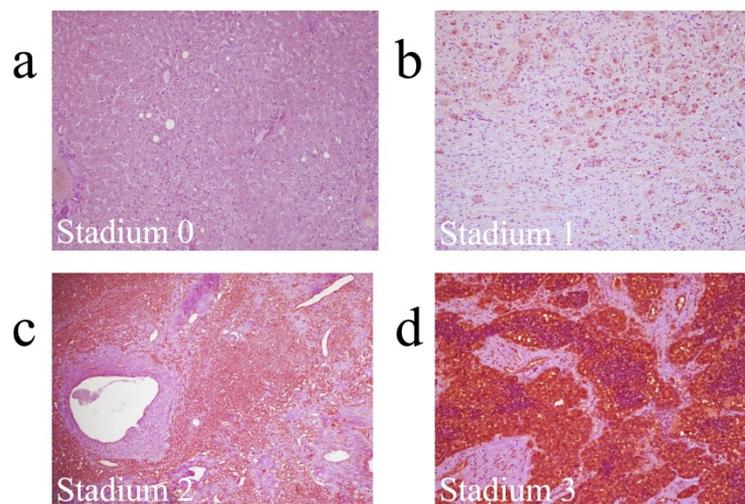


Abbildung 18: Einteilung der nf-P2X₇ Expressionsstärke anhand der Stadien 0 bis 3

Immunohistochemische Färbungen mit dem Antikörper BPM09 gegen den nf-P2X₇ Rezeptor. Stadieneinteilung der nf-P2X₇ Expressionsstärke mit Stadium 0 (keine Expression), Stadium 1 (geringe Expression), Stadium 2 (mäßige Expression) und Stadium 3 (starke Expression). (a) Stadium 0 (gesunde Leber), (b) Stadium 1 (Neuroblastom), (c) Stadium 2 (HCC), (d) Stadium 3 (alveoläres Rhabdomyosarkom).

Außerdem wurde die spezifische Bindung des Antikörpers BPM09 analysiert, indem nicht-tumoröse Areale (Gefäße, Bindegewebe, Muskulatur, Nekrose) sowie gesundes Gewebe auf die Expression des nf-P2X₇ Rezeptors untersucht wurden.

2.2.5 Analyse von Patientencharakteristika von Patienten mit extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren

Es wurden Patientencharakteristika von Patienten mit Rhabdomyosarkom (n = 17), Neuroblastom (n = 9), Wilms Tumor (n = 5) und Lebertumoren (n = 9) analysiert. Ein entsprechendes Ethikvotum wurde von einer unabhängigen Ethik-Kommission bewilligt und ist unter der Projektnummer 354/2018A hinterlegt. Alle untersuchten Patientendaten befinden sich in digitalisierter Form in der vom Universitätsklinikum Tübingen verwendeten SAP R/3 Software (siehe 2.1.4) und wurden mittels Excel tabellarisch pseudonymisiert aufgetragen und ausgewertet. Bei Differenz der Summe zu n erfolgte keine klinische Angabe. Alle erhobenen Parameter beziehen sich auf den Zeitraum bis September 2019.

Bei allen Tumorentitäten wurden die Kategorien Geschlecht und Alter bei Erstdiagnose (ED) analysiert. Weitere analysierte Parameter sowie analysierte Mutationen der einzelnen Tumorentitäten sind in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12: Übersicht über weitere analysierte Patientencharakteristika von kindlich soliden Tumorentitäten

Tumorentität	Analysierte Parameter
Rhabdomyosarkom	FOXO1-Bruch, PAX1-FOXO1 Genfusion, PAX7-FOXO1 Genfusion
Hepatoblastom und HCC	Alpha-Fetoprotein (AFP), Metastasen, präoperative Chemotherapie, positives Überleben
Neuroblastom	Tumorstadium, Stadium nach Hughes, Differenzierungsgrad, Regressionsgrad, Metastasen, n-myc Status, Chromosom 1(p36) Abberation, Anaplastische Lymphomkinase (ALK), meta-Iodobenzylguanidin (mIBG) Status, präoperative Chemotherapie, NB2004 Studienprotokoll, positives Überleben
Wilms Tumor	Tumorstadium (nach SIOP), Metastasen, präoperative Chemotherapie, positives Überleben

2.2.6 Calcium-Messung

Als Grundlage für funktionelle Assays wurde mithilfe von Calcium-Messungen der ATP-induzierte Calciumhaushalt in den RMS-Zelllinien RD (RME) und RH30 (RMA) untersucht. Hierfür wurden die Zellen im ersten Schritt mit 3 Millimol (mM) BzATP behandelt. In der darauf folgenden Untersuchung erfolgte eine zusätzlich Inkubation mit dem nicht kompetitiven P2X₇ Antagonisten KN62 (10 µM) und dem nf-P2X₇ Rezeptor Antikörper BIL03s (0,5 µM) (siehe 2.2.2.1) (Brandao-Burch et al., 2012).

Die intrazelluläre Konzentration von Calciumionen (Ca²⁺) wurde mithilfe des inversen Phasen-Kontrast Mikroskops gemessen. Mittels eines dichromatischen Spiegels des Mikroskops wurde die dabei entstandene Fluoreszenzintensität bei etwa 505 nm entweder in ein Objektiv oder in eine Kamera abgelenkt. Die Datenerfassung erfolgte dabei alle 6 bis 10 Sekunden unter Verwendung der Metafluor Computer Software. Die ermittelten Werte wurden in Excel übertragen. Für die Ermittlung der Veränderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration wurde sowohl der Anstieg, als auch die höchste Ca²⁺-Konzentration durch das Verhältnis 340 / 380 nm für jede Zelle und jedes

Experiment analysiert. Die Differenz zwischen dem niedrigsten und höchsten Punkt der Zunahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (delta Ratio) wurde dabei als „*peak*“ bezeichnet und die maximale Ca^{2+} -Einstromgeschwindigkeit („*slope*“) als delta Ratio pro Sekunde berechnet.

2'(3`)-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt KN-62,4-[(2S)-2-[(5- isoquinolinylsulfonyl)methylamino]-3-oxo-3-(4- phenyl-1-piperazinyloxy)propyl] phenyl isoquinolinesulfonic acid ester	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Kamera Proxitronic	Proxitronic, Bensheim
Zentrifuge Rotifix 32	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Discofix Stopcock für Infusionstherapie	B. Braun, Melsungen
Filter Set für FURA-2	AHF Analysetechnik AG, Tübingen
Filterspitzen 10, 100, 1000 ul	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Filterrad	Sutter Instrument Firma, Novato
Infusionsregulator Dosi-Flow 10	Dahlhausen, Köln / Sürth
Lambda 10-2	Sutter Instrument Firma, Novato
Lamp XBO 75	Leistungselektronik Jena GmbH, Jena
Metafluor Software	Universal Imaging, Downingtown, USA
Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Deckgläser (rund) 30mm Durchmesser, 0.13-0.16 mm	Karl Hecht KG, Sondheim
Neutral density Filter	AHF Analysetechnik AG, Tübingen
Objective fluar 40x/1.3 Öl	Carl Zeiss, Oberkochen
Spritzen 10 ml, Luer-Lok Tip	Becton Dickison Labware, Franklin Lakes, USA
Spritzen BD Perfusion 50 ml	Becton Dickison Labware, Franklin Lakes, USA
Gewebekulturplatten 35x10 mm	Becton Dickison Labware, Franklin Lakes, USA
Winged Needle Infusion Set Butterfly-21	Hospira Venisystems, Donegal Town, Irland
Zellkulturwasser (EP-Grade)	PAA, Cölble
Fura-2-AM	Invitrogen, Karlsruhe
Immersol 518F	Carl Zeiss, Oberkochen
Ionomycin	Sigma, Taufkirchen
N-methyl-D-glucamine (NMDG)	Sigma, Taufkirchen
Poly-L-Lysine	Sigma, Taufkirchen
Silicone grease	Carl Roth, Karlsruhe
Thapsigargin	Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe

2.2.7 Transwell Migration Assay

Der Transwell Migration Assay, nach seinem Entwickler Boyden auch Boyden Chamber Assay genannt, ist eine gängige Methode für die Untersuchung der Zellmigration. Hierbei werden Zellen in eine obere Kammer gesetzt, welche durch eine mikroporöse Membran von einer unteren Kammer getrennt ist (siehe Abb. 19). Diese enthält einen chemotaktischen Wirkstoff. Nach entsprechender Inkubationszeit wird die Membran entnommen und fixiert, wodurch die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran gezählt werden können (Chen, 2005).

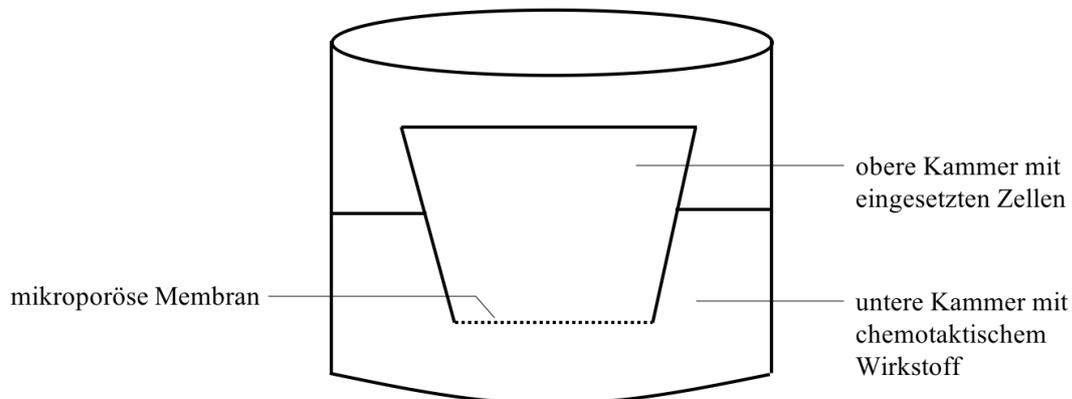


Abbildung 19: Aufbau des Transwell Migration Assays

Durchführung:

Zu Beginn wurden die Zellen wie in Punkt 2.2.1.4 gezählt. Anschließend wurde mit PBS gewaschen, um Überreste des FCS zu entfernen, welches im Versuch als chemotaktischer Wirkstoff für die Zellen dient. Daraufhin wurden die Zellen mit DMEM ohne FCS auf 1×10^6 Zellen pro Milliliter verdünnt.

In eine 24-Well Platte wurde anschließend als chemotaktischer Wirkstoff 750 μ l DMEM Medium mit FCS pro Well pipettiert, was der unteren Kammer im Versuchsaufbau (siehe Abb. 19) entspricht. Um den Einfluss der Schwerkraft auf die nach unten migrierenden Zellen zu berücksichtigen, wurde die untere Kammer einer zweiten Kontrolle mit DMEM Medium ohne FCS Zusatz gefüllt. Danach wurden die Transwells eingesetzt, wobei auf ein blasenfreies Medium unter der Membran zu achten ist.

Im Anschluss wurden die Zellen mit entsprechender Behandlung in Eppendorfreaktionsgefäßen vorbereitet. Die verwendeten Zellzahlen sind Tabelle 5 (siehe 2.2.1.4) zu entnehmen. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 0,5 μ M Antikörper BIL03s (siehe 2.2.2.1), sowie mit 0,2 mM BzATP und der Kombination aus beidem. Die Behandlungen wurden entsprechend mit DMEM Medium ohne FCS Zusatz verdünnt. Der unbehandelten Kontrolle wurde DMEM Medium ohne FCS Zusatz zugegeben. Die resuspendierten Behandlungsansätze mit einem Endvolumen von 500 μ l wurden anschließend in die Transwells pipettiert und für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Anschließend erfolgte die Färbung der migrierten Zellen durch die mikroporöse Membran. Hierfür wurden in einer 24-Well Platte 600 μ l siebzigprozentiges Ethanol pro Behandlung vorgelegt und die mit einer Pinzette vorsichtig herausgenommenen Transwells mit der Membranseite nach unten gerichtet 15 Minuten bei RT fixiert. Nachfolgend wurden die Einsätze entnommen und erneut 15 Minuten bei RT getrocknet. In dieser Zeit wurde 600 μ l 0,2 % Kristallviolett Färbelösung pro Well vorgelegt und die Transwell Einsätze nach abgeschlossener Trocknung für 10 Minuten bei RT gefärbt. Daraufhin wurden die Transwells entnommen, in destilliertem Wasser gewaschen und die nicht migrierten Zellen auf der Innenseite der Membran mit einem Wattestäbchen entfernt. Nach Trocknung der Einsätze wurde die Membran vorsichtig mit einem Skalpell entfernt und mithilfe von Pertex auf Objektträgern eingedeckt.

Die gefärbten Membranen wurden fotografiert und die migrierten Zellen mithilfe des Programms ImageJ (siehe 2.1.4) gezählt. Die gezählten Zellen wurden in einer Excel Tabelle jeweils prozentual im Vergleich zur Kontrolle ausgewertet.

Cell Culture Insert, Transparent PET Membrane, 24 Well 8.0µm pore size	Corning Incorporated, New York, USA
2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis (USA)
5'-triphosphate triethylammonium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol 99% vollständig vergällt mit MEK (Bitrex)	SAV Liquid production GMBH, Flintsbach am Inn
1% Kristallviolett-Lösung:	
- 1g Kristallviolettpulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- mit bidest. H ₂ O auf 100ml auffüllen	
Surgical Disposable Scalpels	Braun Aesculap AG, Tuttlingen
Pertex ® Synthetisches Eindeckmittel	medite GmbH, Burgdorf
SuperFrost ® Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
Deckgläser 24x60mm, Glasdicke 0,13-0,16	R. Langenbrinck GmbH, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen

2.2.8 Colony Forming Assay (CFA)

Der Colony Forming Assay ist die Methode der Wahl für die Untersuchung der Kolonienbildung von Zellen nach einer Behandlung mit ionisierender Strahlung oder anderen zytotoxischen Reagenzien. Hierbei werden Zellen vor oder nach Behandlung ausgesät und nach entsprechender Inkubationszeit (1 - 3 Wochen) fixiert, gefärbt und gezählt. Eine gebildete Kolonie besteht definitionsgemäß aus mindestens 50 Zellen. Ist diese Kolonienbildung vermindert und dabei eine einzelne Zelle nicht in der Lage sich unbegrenzt zu teilen, so wird dies reproduktiver Zelltod genannt (Franken et al., 2006, Watanabe and Okada, 1967).

Durchführung:

Zu Beginn wurden die Tumorzellen in einer definierten Zelldichte (siehe Tabelle 5 in 2.2.1.4) in einer 6-Well Platte angelegt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Behandlung mit dem Antikörper in aufsteigender Konzentration (0,1; 0,5; 1 und 2 µM), sowie nachfolgend mit 0,5 µM Antikörper und 0,2 mM BzATP in Kombination. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit

1x PBS gewaschen und frisches Medium in jedes Well pipettiert. Daraufhin wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert und die Kolonienbildung regelmäßig kontrolliert. Nach entsprechender Inkubationszeit (10 – 14 Tage) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde zur Fixierung 2 ml Methanol pro Well hinzugefügt und auf dem Shaker 5 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden die Kolonien nach Wiederholung dieser Fixierung mit 1 ml 1 % Kristallviolett-Lösung pro Well gefärbt und diese Lösung für 90 Minuten auf dem Shaker inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgesaugt und die Platten in einer Wanne mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) von der überschüssigen Färbung gereinigt. Nach Trocknung der Platten über Nacht konnten die Kolonien gezählt und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen werden. Die prozentuale Berechnung und Auswertung erfolgte mit Excel.

2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis (USA)
5'-triphosphate triethylammonium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt
1% Kristallviolett-Lösung:	
- 1g Kristallviolettpulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- mit bidest. H ₂ O auf 100ml auffüllen	

2.2.9 Statistische Auswertung

Die tabellarische Auftragung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel. Die statistische Auswertung der Daten sowie die Erstellung der Graphen und Abbildungen erfolgte mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 8.2.1. Die statistische Prüfung der Hypothese wurde mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) geprüft, wobei als Testverfahren in der Regel der Dunnett- oder Sidak-Test eingesetzt wurde. Alle Versuche wurden in mindestens drei unabhängigen Einzelversuchen durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte wurden in den Graphen jeweils mit entsprechender Standardabweichung angegeben. Als Signifikanzniveau wurde ein 95 % Konfidenzintervall festgelegt, sodass alle p-Werte < 0,05 als signifikant gewertet

wurden. Für die Graphen gilt dabei * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$.

Die Verfassung der vorliegenden Dissertationsschrift erfolgte mit Microsoft Word. Das Literaturverzeichnis wurde mithilfe von EndNote X8.2 angelegt und verwaltet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Das Expressionsmuster des nf-P2X₇ Rezeptors in extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren

Das Expressionsmuster von nf-P2X₇ ist in einer Vielzahl diverser Tumorentitäten bei Erwachsenen bekannt (siehe Tab. 2 in 1.2.3) (Barden et al., 2009, Barden et al., 2016, Gilbert et al., 2017, Gilbert et al., 2019). Jedoch wurden noch keine Untersuchungen zu kindlichen soliden Tumoren in Hinblick auf den nf-P2X₇ Rezeptor durchgeführt.

Daher ist Gegenstand dieser Arbeit ein Expressionsprofil des nf-P2X₇ Rezeptors in extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren zu erarbeiten.

3.1.1 Durchflusszytometrische Analyse des Expressionsmusters des Membranrezeptors nf-P2X₇ in kindlichen soliden Tumoren

Es wurden Zelllinien verschiedener, kindlich solider Tumorentitäten untersucht: alveoläres Rhabdomyosarkom (RMA), embryonales Rhabdomyosarkom (RME), maligner Rhabdoid Tumor (mRT), hepatozelluläres Karzinom (HCC), Hepatoblastom (HB), Neuroblastom (NB), Ewing-Sarkom und Osteosarkom. Als benigner Vergleich wurden Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und die benigne Skelettmuskelzelllinie SKMC untersucht.

3.1.1.1 Die nf-P2X₇ Expression bei Zelllinien des Rhabdomyosarkoms und des malignen Rhabdoid Tumors

Anhand durchflusszytometrischer Messungen mit dem nf-P2X₇ Antikörper BIL03s wurden embryonale (RD, SRH, RUCH3, RMS33-2) und alveoläre (RH30) Rhabdomyosarkom-Zelllinien sowie die maligne Rhabdoid Tumorzelllinie (mRT) A204 auf die Expression des nf-P2X₇ Rezeptors untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 20 dargestellt.

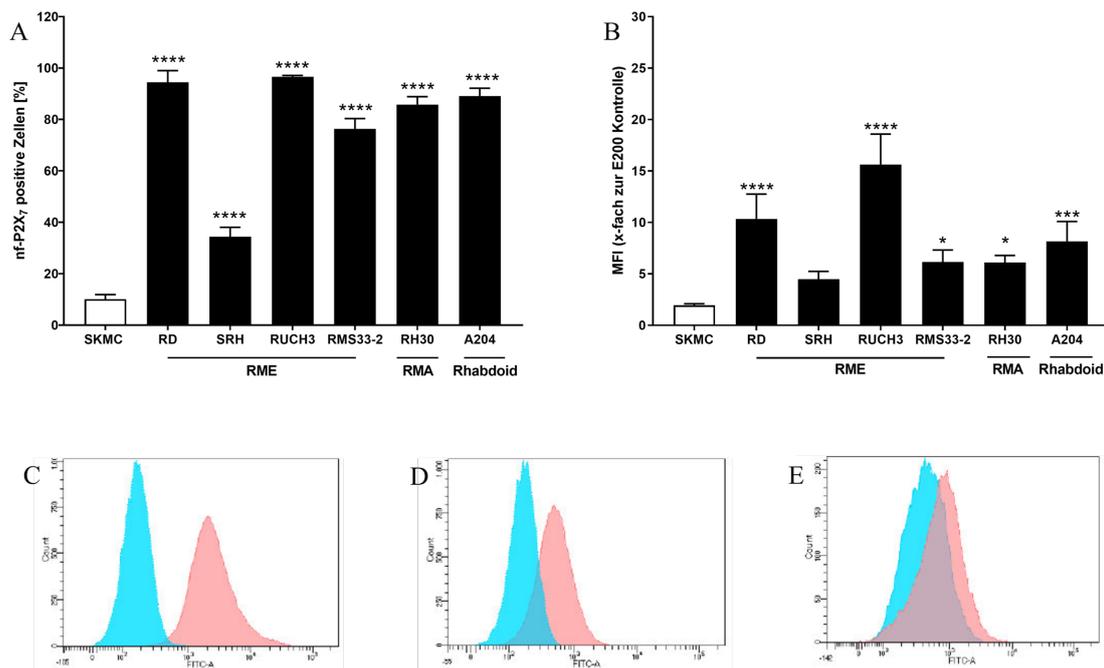


Abbildung 20: Expressionsanalyse des nf-P2X₇ Rezeptors auf kindlichen soliden Tumorzelllinien des Rhabdomyosarkoms und des malignen Rhabdoid Tumors

Färbung mit dem Antikörper BIL03s gegen den nf-P2X₇ Rezeptor der RME-Zelllinien (RD, SRH, RUCH3, RMS33-2), der RMA-Zelllinie (RH30) und der mRT-Zelllinie (A204) mit anschließender durchflusszytometrischer Messung. Als interne Kontrolle für jede Zelllinie wurde zusätzlich zum nf-P2X₇ Antikörper mit dem Epitop E200 inkubiert. Als beniger Vergleich diente die Skelettmuskelzelllinie SKMC. (A) zeigt die nf-P2X₇ positiven Zellen in Prozent. (B) zeigt die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) in x-facher Relation zur E200 Kontrolle.

Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler aus mind. 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Dunnett-Test), *p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001. P-Werte zeigen die statistische Signifikanz zu der Zelllinie SKMC. Histogramme durchflusszytometrischer Messungen am Beispiel einer (C) RME-Zelllinie RD, (D) RMA-Zelllinie RH30 und (E) Skelettmuskelzelllinie SKMC. nf-P2X₇ negative Zellen = blau. nf-P2X₇ positive Zellen = rot.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass alle untersuchten malignen Zelllinien des alveolären und embryonalen Rhabdomyosarkoms sowie des malignen Rhabdoid Tumors im Vergleich zur benignen Referenzzelllinie der quergestreiften Skelettmuskulatur (SKMC) eine signifikant höhere Expression des nf-P2X₇ Rezeptors aufweisen (siehe Abb. 20A).

Wie in Abbildung 20B dargestellt, zeigen alle untersuchten malignen Zelllinien eine höhere mediane Fluoreszenzintensität (MFI) als die gesunde Kontrolle SKMC, wobei die Zelllinie RUCH3 den höchsten MFI aufweist.

3.1.1.2 *nf-P2X₇* Expressionsanalyse auf Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms und Hepatoblastoms

Im Folgenden (Abb. 21) sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen zur Analyse der *nf-P2X₇* Expression in kindlichen soliden Tumorzelllinien des hepatozellulären Karzinoms (HCC) sowie des Hepatoblastoms (HB) dargestellt.

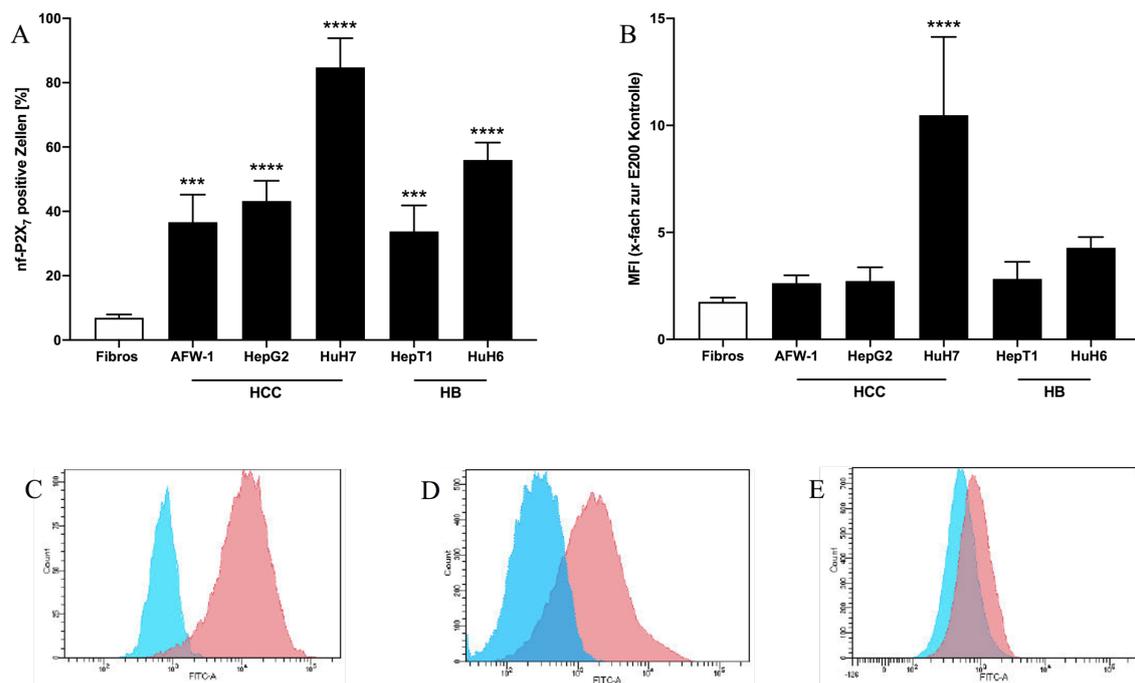


Abbildung 21: Expressionsanalyse des *nf-P2X₇* Rezeptors auf kindlichen soliden Tumorzelllinien des hepatozellulären Karzinoms (HCC) und Hepatoblastoms (HB)

Färbung mit dem Antikörper BIL03s gegen den *nf-P2X₇* Rezeptor der HCC-Zelllinien (AFW-1, HepG2, HuH7) und der Hepatoblastom-Zelllinien (HepT1, HuH6) mit anschließender durchflusszytometrischer Messung. Als interne Kontrolle für jede Zelllinie wurde zusätzlich zum *nf-P2X₇* Antikörper mit dem Epitop E200 inkubiert. Als beniger Vergleich dienten Fibroblasten.

(A) zeigt die *nf-P2X₇* positiven Zellen in Prozent. (B) zeigt die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) in x-facher Relation zur E200 Kontrolle. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler aus mind. 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, Dunnett-Test), *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. P-Werte zeigen die statistische Signifikanz zu der Zelllinie Fibroblasten.

Histogramme durchflusszytometrischer Messungen am Beispiel einer (C) HCC-Zelllinie (HuH7), (D) HB-Zelllinie (HuH6) und (E) benignen Fibroblasten. *nf-P2X₇* negative Zellen = blau. *nf-P2X₇* positive Zellen = rot.

Die untersuchten malignen Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms (AFW-1, HepG2, HuH7) und des Hepatoblastoms (HepT1, HuH6) zeigen eine signifikant erhöhte Expression des *nf-P2X₇* Rezeptors im Vergleich zu den Fibroblasten.

Auffallend ist zudem die signifikant hohe Expression und MFI bei der Zelllinie HuH7 (siehe Abb. 21A, B, C).

3.1.1.3 Die *nf-P2X₇* Expression auf Tumorzelllinien des Neuroblastoms

In durchflusszytometrischen Messungen wurden diverse kindliche solide Tumorzelllinien des Neuroblastoms (LS, LAN1, IMR32, SH-SY5Y, SKNBE) anhand ihrer Expression des *nf-P2X₇* Rezeptors analysiert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 22 veranschaulicht.

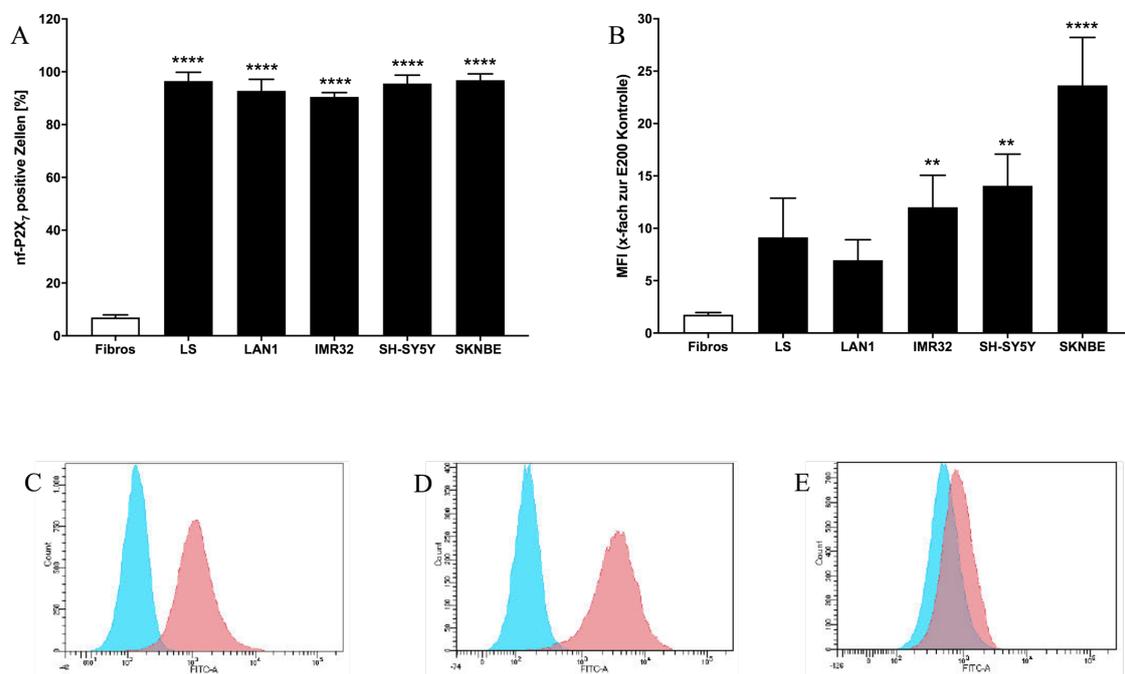


Abbildung 22: Expressionsanalyse des *nf-P2X₇* Rezeptors in kindlichen soliden Tumorzelllinien des Neuroblastoms

Färbung mit dem Antikörper BIL03s gegen den *nf-P2X₇* Rezeptor der Neuroblastom-Zelllinien (LS, LAN1, IMR32, SH-SY5Y, SKNBE) mit anschließender durchflusszytometrischer Messung. Als interne Kontrolle für jede Zelllinie wurde zusätzlich zum *nf-P2X₇* Antikörper mit dem Epitop E200 inkubiert. Als benigner Vergleich dienten Fibroblasten.

(A) zeigt die *nf-P2X₇* positiven Zellen in Prozent. (B) zeigt die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) in x-facher Relation zur E200 Kontrolle. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler aus mind. 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, Dunnett-Test), ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. P-Werte zeigen die statistische Signifikanz zu der Zelllinie Fibroblasten.

Histogramme durchflusszytometrischer Messungen am Beispiel einer NB-Zelllinie LS (C), SKNBE (D) und benigner Fibroblasten (E). *nf-P2X₇* negative Zellen = blau. *nf-P2X₇* positive Zellen = rot.

Wie in Abbildung 22A dargestellt, zeigen alle untersuchten Neuroblastom-Zelllinien eine mit über 90 % hohe Expressionsstärke des *nf-P2X₇* Rezeptors. Hingegen ist der MFI nur bei den Zelllinien IMR32,

SH-SY5Y und SKNBE signifikant gegenüber den Fibroblasten erhöht. Dabei weist die SKNBE Zelllinie mit einem MFI von 23,64 den höchsten MFI Wert auf (siehe Abbildung 22B).

3.1.1.4 Die *nf-P2X₇* Expression auf Zelllinien des Ewing-Sarkoms und Osteosarkoms

Die kindlichen soliden Tumorzelllinien des Ewing-Sarkoms (A673, RD-ES) sowie des Osteosarkoms (U2OS, SaOS) wurden in der Durchflusszytometrie auf ihre *nf-P2X₇* Expression untersucht (siehe Abb. 23)

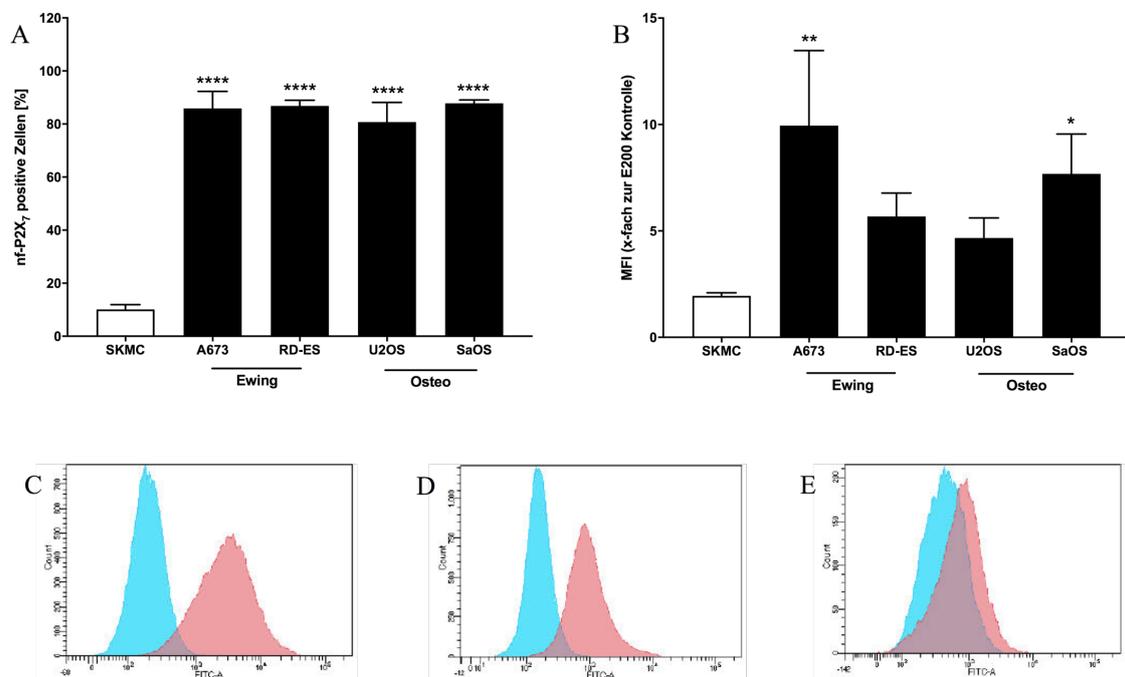


Abbildung 23: Expressionsanalyse des *nf-P2X₇* Rezeptors auf kindlichen soliden Tumorzelllinien des Ewing-Sarkoms und Osteosarkoms

Färbung mit dem Antikörper BIL03s gegen den *nf-P2X₇* Rezeptor der Zelllinien des Ewing-Sarkoms (A673, RD-ES) und Osteosarkoms (U2OS, SaOS) mit anschließender durchflusszytometrischer Messung. Als interne Kontrolle für jede Zelllinie wurde zusätzlich zum *nf-P2X₇* Antikörper mit dem Epitop E200 inkubiert. Als benigner Vergleich diente die Skelettmuskelzelllinie SKMC.

(A) zeigt die *nf-P2X₇* positiven Zellen in Prozent. (B) zeigt die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) in x-facher Relation zur E200 Kontrolle. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, Dunnett-Test), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. P-Werte zeigen die statistische Signifikanz zu der Zelllinie SKMC.

Histogramme durchflusszytometrischer Messungen am Beispiel einer (C) Ewing-Sarkom-Zelllinie A673, (D) Osteosarkom-Zelllinie SaOS und (E) Skelettmuskelzelllinie SKMC. *nf-P2X₇* negative Zellen = blau. *nf-P2X₇* positive Zellen = rot.

Die durchflusszytometrische Analyse der Ewing-Sarkom und Osteosarkom-Zelllinien zeigt mit über 80 % eine signifikant höhere Expression

des nf-P2X₇ Rezeptors gegenüber der benignen SKMC Zelllinie auf (siehe Abb. 23A). Auch der MFI ist insbesondere bei den Zelllinien A673 und SaOS signifikant im Vergleich zur benignen Skelettmuskelzelllinie SKMC erhöht (siehe Abb. 23B).

3.1.1.5 Die nf-P2X₇ Expression auf benignen Zellen

Für den Vergleich zwischen malignen und benignen Zellen wurde von diversen benignen Zellen, darunter Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten sowie Skelettmuskelzellen, mithilfe durchflusszytometrischer Messungen eine nf-P2X₇ Expressionsanalyse durchgeführt (siehe Abb. 24)

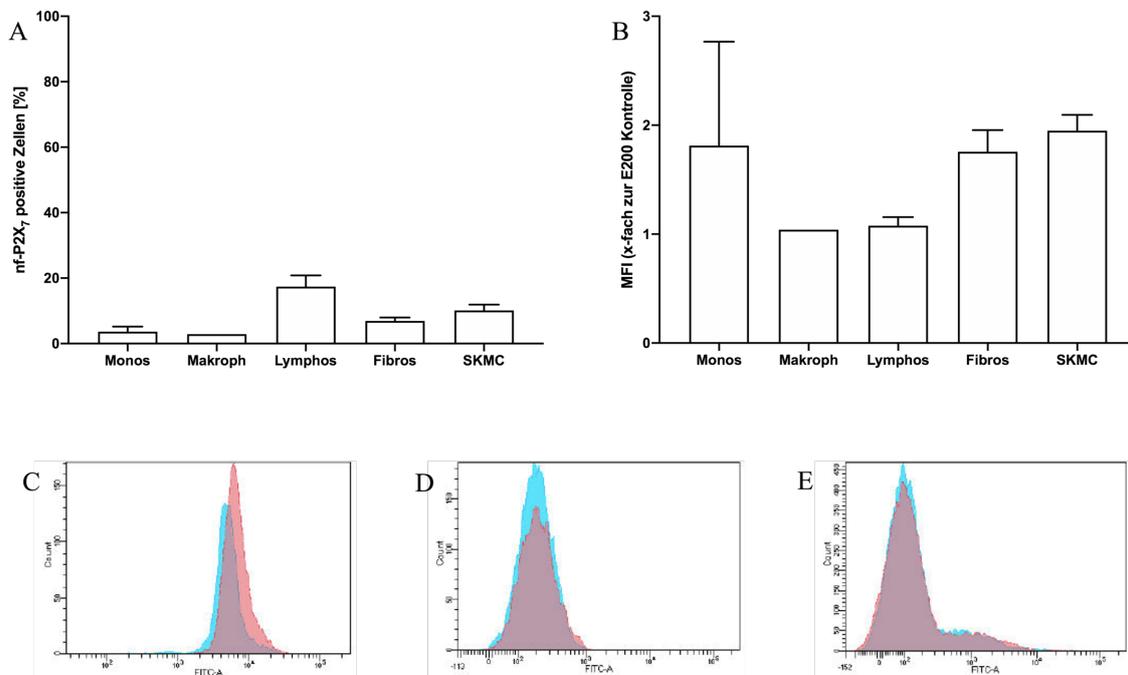


Abbildung 24: Expressionsanalyse des nf-P2X₇ Rezeptors in benignen Zellen

Färbung mit dem Antikörper BIL03s gegen den nf-P2X₇ Rezeptor auf Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und der Skelettmuskelzelllinie SKMC mit anschließender durchflusszytometrischer Messung. Als interne Kontrolle für jede Zelllinie wurde zusätzlich zum nf-P2X₇ Antikörper mit dem Epitop E200 inkubiert.

(A) zeigt die nf-P2X₇ positiven Zellen in Prozent. (B) zeigt die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) in x-facher Relation zur E200 Kontrolle. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler aus 3 Einzelversuchen (außer Makrophagen n=1).

Histogramme durchflusszytometrischer Messungen am Beispiel von (C) Monozyten, (D) Makrophagen und (E) Lymphozyten. nf-P2X₇ negative Zellen = blau. nf-P2X₇ positive Zellen = rot.

Wie in Abbildung 24A gezeigt, exprimieren ca. 8,2 % aller untersuchten benignen Zellen (Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und Skelettmuskelzellen SKMC) den nf-P2X₇ Rezeptor. Auch der MFI, wie in

Abbildung 24B gezeigt, ist insbesondere in Makrophagen und Lymphozyten sehr gering ausgeprägt.

3.1.1.6 Zusammenfassung der nf-P2X₇ Expression in kindlich soliden Tumorzelllinien

Abschließend wurde die durchschnittliche nf-P2X₇ Expression und mediane Fluoreszenzintensität aller durchflusszytometrisch untersuchten kindlichen soliden Tumorzelllinien (siehe 3.1.1.1 - 3.1.1.4) sowie der analysierten benignen Zellen aus 3.1.1.5 berechnet. Die errechneten Mittelwerte sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Durchschnittliche Expression und mediane Fluoreszenzintensität (MFI) des nf-P2X₇ Rezeptors auf benignen Zellen und kindlichen soliden Tumorentitäten

Tumorentität	nf-P2X₇ positive Zellen [%]	MFI [x-fach zur E200 Kontrolle]
Benigne	8,2	1,53
Neuroblastom	94,79	13,16
RMA	85,83	6,11
RME	75,42	9,16
Rhabdoid	89,13	8,16
Ewing-Sarkom	86,37	7,81
Osteosarkom	84,27	6,17
HCC	55,35	5,28
Hepatoblastom	45,83	3,55

Die in Tabelle 13 dargestellten Mittelwerte der nf-P2X₇ Expression und medianen Fluoreszenzintensität sind in der folgenden Abbildung 25 zusammenfassend abgebildet.

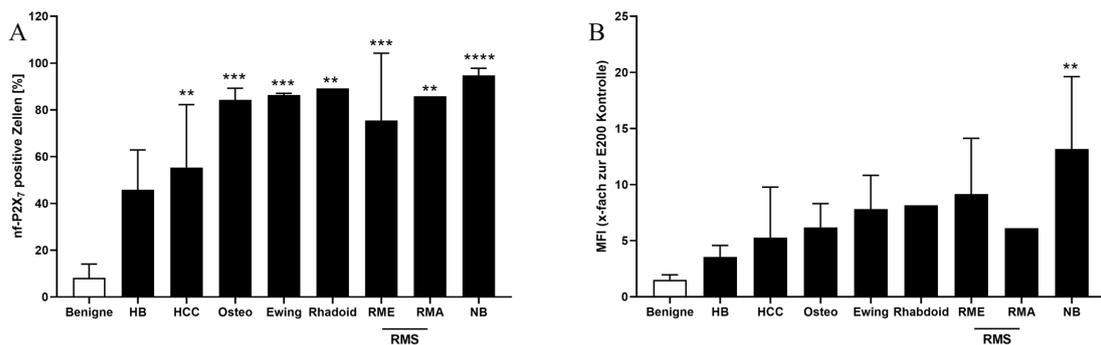


Abbildung 25: Expressionsanalyse des nf-P2X₇ Rezeptors auf kindlichen soliden Tumorentitäten

Die Abbildung 25 zeigt die durchschnittlich berechnete nf-P2X₇ Expression und mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von benignen Zellen (Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten, Skelettmuskelzellen SKMC) und den Tumorentitäten Hepatoblastom, hepatozelluläres Karzinom, Osteosarkom, Ewing-Sarkom, maligner Rhabdoid Tumor, embryonales Rhabdomyosarkom, alveoläres Rhabdomyosarkom und Neuroblastom. (A) Durchschnitt der nf-P2X₇ positiven Zellen aller durchflusszytometrisch untersuchten benignen Zellen und Tumorentitäten. (B) Durchschnittlicher MFI in x-facher Relation zur E200 Kontrolle. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler aus den Einzelversuchen der untersuchten Zelllinien aus 3.1.1.1 - 3.1.1.5., die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Dunnett-Test), **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. P-Werte zeigen die statistische Signifikanz zu der durchschnittlichen Expression bzw. MFI der benignen Zellen.

Im Vergleich zur durchschnittlichen nf-P2X₇ Expression (s. Tab. 13, Abb. 25A) stellen die Neuroblastom-Zelllinien mit 94,79 % die am stärksten exprimierende Tumorentität dar. Die Hepatoblastom-Zelllinien zeigen im Gegensatz hierzu mit 45,83 % nf-P2X₇ positiven Zellen die geringste Expression.

Wie in Abbildung 25B und Tabelle 13 dargestellt, weisen die Neuroblastom-Zelllinien die höchsten MFI-Werte auf und korrelieren somit mit der hohen nf-P2X₇ Expressionsstärke. Ebenso zeigen auch die Hepatoblastom-Zelllinien bei geringster Expressionsstärke den geringsten MFI-Wert.

Zusammengefasst ist die Expression sowie der MFI des nf-P2X₇ Rezeptors in allen untersuchten malignen Zelllinien um ein Vielfaches im Gegensatz zu benignen Zellen erhöht. Insgesamt wurde eine geringe membranäre Expression des nf-P2X₇ in benignen Zellen nachgewiesen.

3.1.2 Immunhistochemische Analyse des Expressionsmusters des nf-P2X₇ Rezeptors in kindlichen soliden Tumoren

Mithilfe von immunhistochemischen Färbungen mit dem nf-P2X₇ Antikörper BPM09 zeigte Slater et al. (2004) zum ersten Mal die Expression des nf-P2X₇ Rezeptors in verschiedenen Stadien des Prostata Karzinoms (Slater et al., 2004a).

Für die erstmalige Untersuchung von kindlichen soliden Tumorentitäten auf die nf-P2X₇ Rezeptorexpression wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit Paraffin-Gewebe von Patienten mit Rhabdomyosarkom, Neuroblastom, Wilms-Tumor, Hepatoblastom und hepatozellulärem Karzinom verwendet. Als benigne Kontrollen wurde Skelettmuskulatur und Lebergewebe herangezogen.

3.1.2.1 Die *nf-P2X₇* Expression in Gewebeproben des Rhabdomyosarkoms und gesunder Skelettmuskulatur

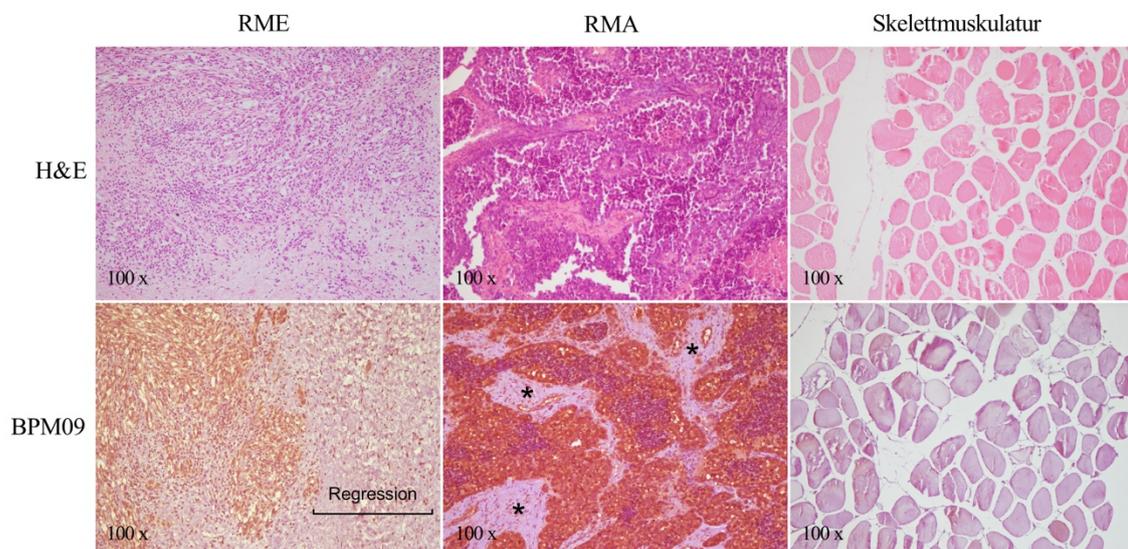


Abbildung 26: Immunhistochemische Färbungen auf den *nf-P2X₇* Rezeptor im embryonalen (links) und alveolären Rhabdomyosarkom (mittig) sowie in gesunder Skelettmuskulatur ohne Farbreaktion (rechts)

Exemplarische Bilder der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper BPM09 im embryonalen (links) und alveolären Rhabdomyosarkom (mittig). Die gesunde Skelettmuskulatur (rechts) zeigt durch fehlende Farbreaktion keine Expression des *nf-P2X₇* Rezeptors. Auch nekrotische Areale (*) werden nicht angefärbt, wodurch eine spezifische Bindung des Antikörpers gegeben ist. Zusätzlich wurden entsprechende H&E-Färbungen zur Charakterisierung des Gewebes angefertigt. Angabe der Vergrößerung links unten.

Die Abbildung 26 zeigt exemplarisch eine immunhistochemische Färbung auf den *nf-P2X₇* Rezeptor im embryonalen und alveolären Rhabdomyosarkom. Die braun gefärbten Zellen repräsentieren hierbei die *nf-P2X₇* positiven Zellen. Beide RMS Tumoren in Abbildung 26 exprimieren den *nf-P2X₇* Rezeptor. Die gesunde Skelettmuskulatur ist *nf-P2X₇* negativ.

Bei dem embryonalen Rhabdomyosarkom handelt es sich um einen nach dem CWS-Guidance-Protokoll vortherapierten Tumor mit ausgeprägter Regressionszone (siehe Markierung Abb. 26 links), welche *nf-P2X₇* negativ ist (Sparber-Sauer et al., 2017). In der Tumorzone zeigt sich eine Expression des *nf-P2X₇* Rezeptors auf der Zellmembran und im Zytoplasma. Auch das alveoläre Rhabdomyosarkom (RMA) zeigt mit 50 % vitalen Anteilen eine starke Plasmaexpression des *nf-P2X₇* Rezeptors. Im Gegensatz zu den *nf-P2X₇* exprimierenden malignen Geweben zeigt die untersuchte gesunde Skelettmuskulatur keine Expression des *nf-P2X₇* Rezeptors.

3.1.2.2 Die *nf-P2X₇* Expression in Gewebeproben des hepatozellulären Karzinoms, Hepatoblastoms und gesunder Leber

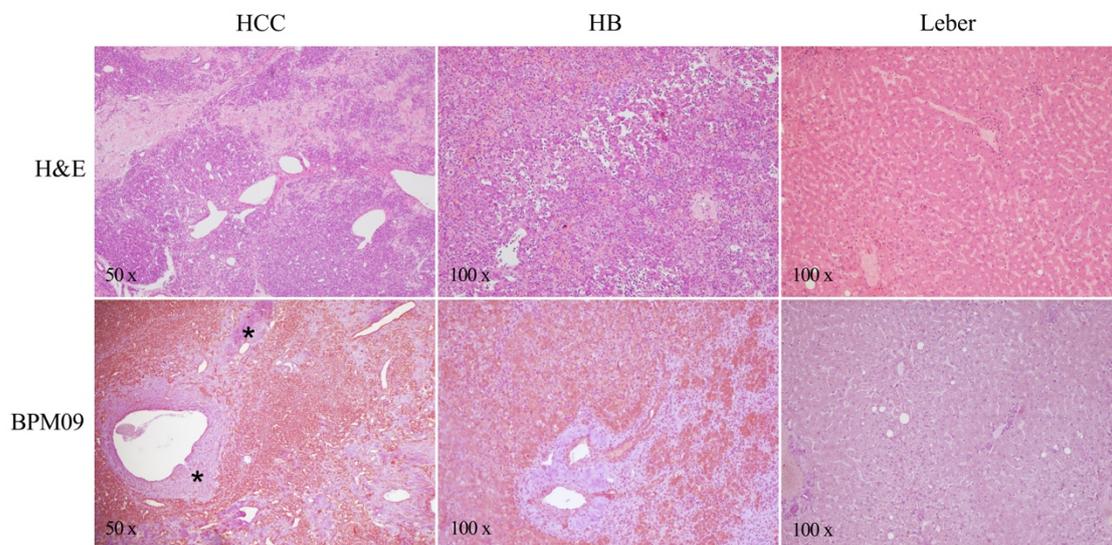


Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung auf den *nf-P2X₇* Rezeptor im hepatozellulären Karzinom (links), Hepatoblastom (mittig) und gesunder Leber ohne Farbreaktion (rechts)
Exemplarische Bilder der immunhistochemischen, zytoplasmatischen Färbung mit dem Antikörper BPM09 im hepatozellulären Karzinom (links) und Hepatoblastom (mittig). Das Gewebe einer gesunden Leber (rechts) zeigt keine Farbreaktion und ist daher *nf-P2X₇* negativ. Auch vernarbte Areale (*) zeigen keine Farbreaktion, wodurch eine spezifische Bindung des Antikörpers gegeben ist. Zur Charakterisierung des Gewebes wurden entsprechende H&E-Färbungen angefertigt. Angabe der Vergrößerung links unten.

Die Abbildung 27 zeigt die immunhistochemische Färbung auf den *nf-P2X₇* Rezeptor im hepatozellulären Karzinom (HCC) und Hepatoblastom (HB), wobei beide malignen Tumoren eine starke zytoplasmatische Expression des *nf-P2X₇* Rezeptors aufweisen. Im Gegensatz hierzu ist die immunhistochemische Färbung der Gewebeprobe der gesunden Leber in Abbildung 27 (rechts) *nf-P2X₇* negativ. Bei dem HCC in Abbildung 27 (links) handelt es sich um ein Karzinom eines 10-jährigen Mädchens ohne neoadjuvante Chemotherapie. Es ist ein vitaler Tumor abgebildet, welcher eine deutliche Expression von *nf-P2X₇* zeigt. Angrenzende narbige Areale (*) sind ohne Reaktionsprodukt. Das Hepatoblastom in Abbildung 27 (mittig) zeigt den Tumor eines 16 Monate alten Jungen, welcher mit Cisplatin und Adriamycin präoperativ behandelt wurde. In der Histologie zeigt sich ein vitaler Tumor mit einer starken zytoplasmatischen Expression des *nf-P2X₇* Rezeptors.

3.1.2.3 Die *nf-P2X₇* Expression in Gewebeproben des Neuroblastoms

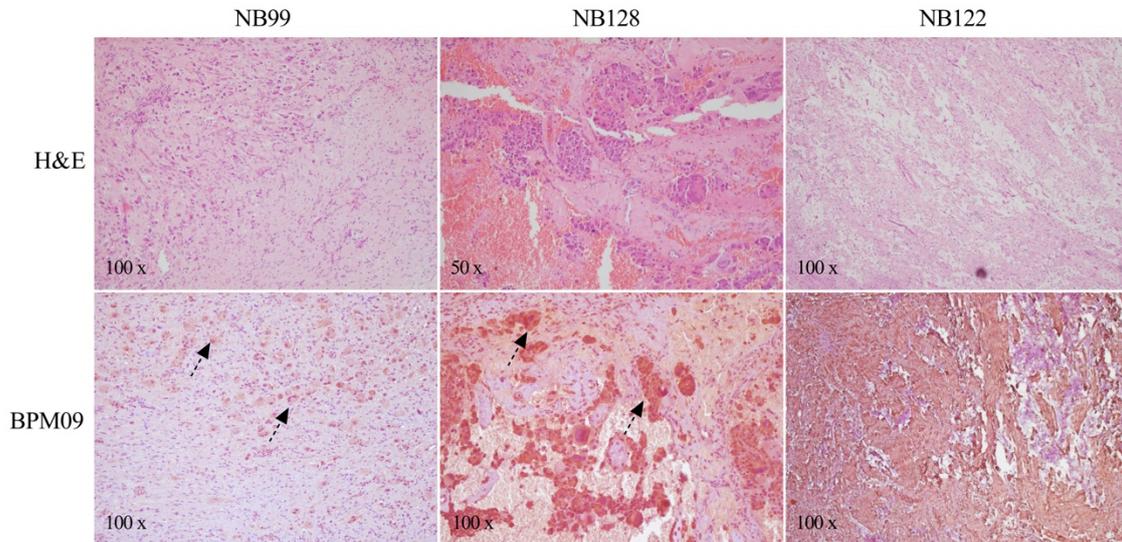


Abbildung 28: *nf-P2X₇* Immunhistochemie und vergleichende H&E-Färbung in verschiedenen Neuroblastomen

Exemplarische Bilder der immunhistochemischen, zytoplasmatischen Färbung mit dem Antikörper BPM09 im Neuroblastom unterschiedlicher Reifungen mit entsprechender H&E-Färbung zur Charakterisierung des Gewebes. Schwarzer Pfeil = Ganglienzelle. Angabe der Vergrößerung links unten.

In Abbildung 28 sind immunhistochemische Färbungen des *nf-P2X₇* Rezeptors in verschiedenen Neuroblastomen dargestellt. Alle drei Gewebeschnitte weisen eine *nf-P2X₇* Expression auf, welche durch die starke zytoplasmatische Farbreaktion zu erkennen ist. Insbesondere das NB128 (Abb. 28 Mitte) zeigt eine starke Expression des *nf-P2X₇* Rezeptors. Im Folgenden werden die verschiedenen Fälle näher erläutert.

NB99 (Abb. 28 links): Im kleinen Becken lokalisiertes Neuroblastom eines 2-jährigen Jungen im Stadium III. Die Behandlung erfolgte nach dem NB2004 Studienprotokoll (Observation group) (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2004). Präoperativ fand dementsprechend eine Chemotherapie statt. In der Histologie zeigt sich ein vitaler Tumor mit einer Reifung zu Ganglienzellen (schwarze Pfeile). Diese zeigen eine schwache zytoplasmatische Expression des *nf-P2X₇* Rezeptors.

NB128 (Abb. 28 Mitte): 9 Monate altes Mädchen mit im linken Abdomen lokalisiertem Neuroblastom im Stadium III. Es wurde nach dem NB2004 Studienprotokoll behandelt, neoadjuvant chemotherapiert und ist im Gegensatz

zu NB99 und NB122 n-myc positiv. Histologisch zeigt sich in dem vitalen Tumor eine Reifung zu Ganglienzellen (schwarze Pfeile), welche eine starke zytoplasmatische nf-P2X₇ Expression aufweisen. In den nekrotischen Arealen wird hingegen kein nf-P2X₇ Rezeptor exprimiert.

NB122 (Abb. 28 rechts): Atypisches noduläres Ganglioneuroblastom im Stadium IV eines 10-jährigen Mädchens. Die Behandlung wurde nach dem NB2004 Studienprotokoll in der High Risk Group durchgeführt. Entsprechend erfolgte eine präoperative Chemotherapie. In der Histologie zeigt sich eine Reifung zu Nervenfasern, welche in der immunhistochemischen Färbung nf-P2X₇ positiv sind.

3.1.2.4 Die nf-P2X₇ Expression in Gewebeproben eines Wilms-Tumors

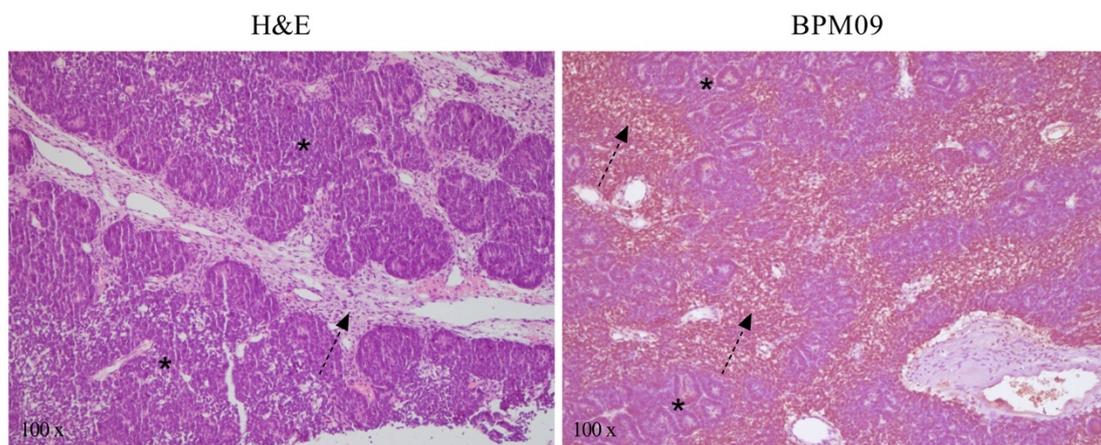


Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung auf den nf-P2X₇ Rezeptor im Wilms-Tumor mit vergleichender H&E-Färbung

Exemplarische Bilder der immunhistochemischen, zytoplasmatischen Färbung mit dem Antikörper BPM09 (rechts) im Wilms-Tumor mit entsprechender H&E-Färbung (links) zur Charakterisierung des Gewebes. Pfeil = Stroma, * = tubuläre Differenzierung. Angabe der Vergrößerung links unten.

In Abbildung 29 ist die immunhistochemische, zytoplasmatische Färbung des nf-P2X₇ Rezeptors eines Wilms-Tumors im Stadium I (nach SIOP) dargestellt. Er stammt von einem neun Monate alten Jungen und wurde nach SIOP 2001 neoadjuvant chemotherapeutisch vorbehandelt (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2007). In der H&E-Färbung wurde vollständig vitales Tumorgewebe ohne Nekrosen festgestellt, welches sowohl embryonal als auch tubulär differenzierte Anteile aufweist. In der Abbildung 29 sind gereifte

tubulär differenzierte (*) und nicht gereifte Anteile zu sehen, wobei ausschließlich die nicht gereiften Tumorareale eine starke zytoplasmatische nf-P2X₇ Expression aufweisen.

3.1.2.5 Zusammenfassung der nf-P2X₇ Expression in kindlichen soliden Tumorproben

Insgesamt wurden 42 Tumorproben von Patienten mit embryonalem Rhabdomyosarkom (n=9), alveolärem Rhabdomyosarkom (n=7), Neuroblastom (n=9), Wilms-Tumor (n=5), Hepatoblastom (n=4) und hepatozellulärem Karzinom (n=8) mithilfe immunhistochemischer Färbungen mit dem nf-P2X₇ Antikörper BPM09 auf die nf-P2X₇ Rezeptor Expression untersucht.

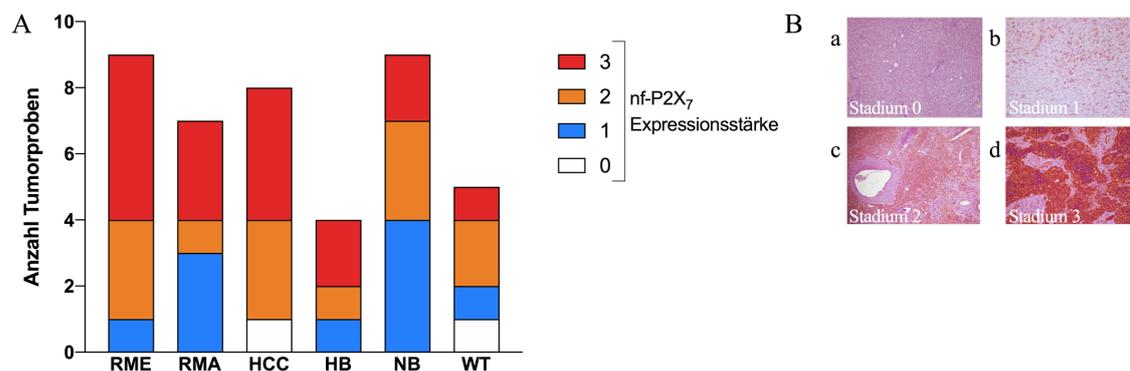


Abbildung 30: Stadien der nf-P2X₇ Expressionsstärke in kindlichen soliden Tumorproben
 Immunhistochemische Färbung mit dem nf-P2X₇ Antikörper BPM09 von kindlichen soliden Tumoren: RME (n=9), RMA (n=7), HCC (n=8), HB (n=4), NB (n=9) und WT (n=5). Die Expressionsstärke des nf-P2X₇ Rezeptors wurde in die Stadien 0 = keine Expression (weiß), 1 = geringe Expression (blau), 2 = mäßige Expression (orange) und 3 = starke Expression (rot) eingeteilt. (A) Verteilung der Stadien der nf-P2X₇ Expressionsstärke in kindlichen soliden Tumorproben. (B) Exemplarische Immunhistochemiefärbungen zur Unterscheidung der nf-P2X₇ Expressionsstärke: (a) Stadium 0 (gesunde Leber), (b) Stadium 1 (NB), (c) Stadium 2 (HCC), (d) Stadium 3 (RMA).

In Abbildung 30A ist die Verteilung der verschiedenen Stadien der nf-P2X₇ Expressionsstärke in den immunhistochemisch untersuchten Tumorentitäten embryonales Rhabdomyosarkom, alveoläres Rhabdomyosarkom, hepatozelluläres Karzinom, Hepatoblastom, Neuroblastom und Wilms-Tumor dargestellt. Alle untersuchten Tumorentitäten exprimieren in der Mehrzahl den nf-P2X₇ Rezeptor. Lediglich eine Tumorprobe des HCC und Wilms-Tumors weisen keine nf-P2X₇ Expression auf. Abgesehen der Expressionsstärke Stadium 1 (blau) im HCC, sind alle Stadien der Rezeptorexpressionsstärke in

den verschiedenen Tumorentitäten vertreten. Das embryonale Rhabdomyosarkom hat dabei die höchste Anzahl an stark exprimierenden nf-P2X₇ Tumorproben (Stadium 3). Die Abbildung 30B zeigt exemplarische Bilder für die Stadien Einteilung 0 bis 3 der nf-P2X₇ Expressionsstärke (für eine detailliertere Darstellung siehe Abb. 18 in 2.2.4.5).

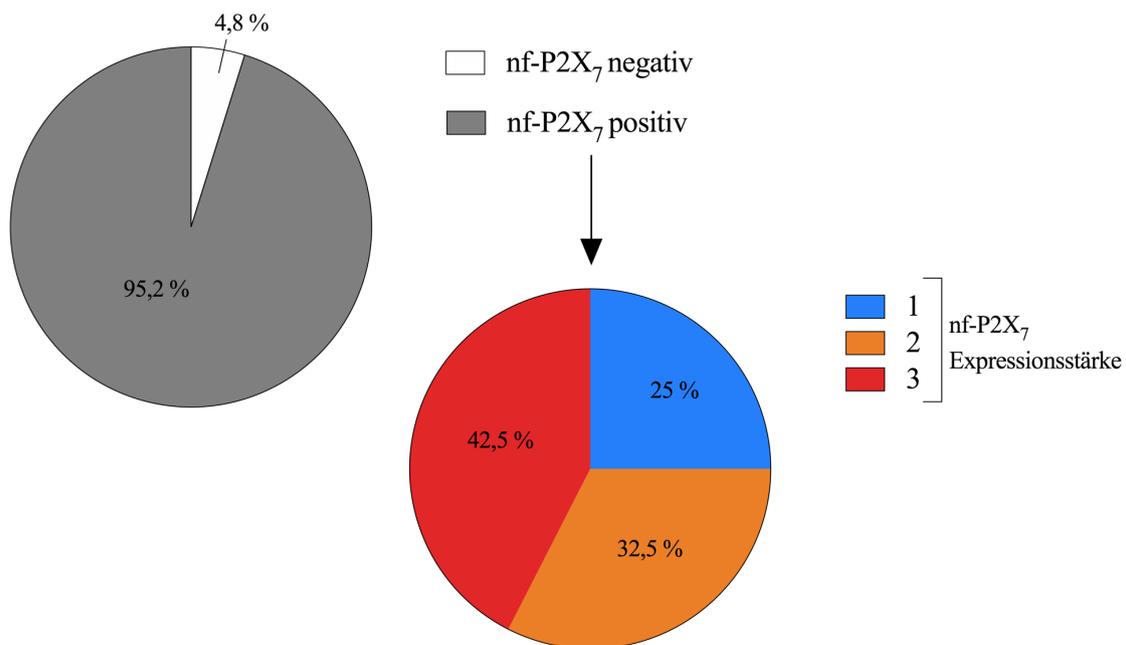


Abbildung 31: nf-P2X₇ Expression in immunhistochemisch untersuchten kindlichen soliden Tumoren

Kreisdiagramme mit prozentualer Berechnung der in Abbildung 30A dargestellten Daten. Es wurden insgesamt 42 Tumorproben mit dem nf-P2X₇ Antikörper BPM09 immunhistochemisch untersucht. RME (n=9), RMA (n=7), HCC (n=8), HB (n=4), NB (n=9) und WT (n=5). Die Expressionsstärke des nf-P2X₇ Rezeptors wurde in die Stadien 0 = keine Expression (weiß), 1 = geringe Expression (blau), 2 = mäßige Expression (orange) und 3 = starke Expression (rot) eingeteilt.

Insgesamt sind 95,2 % der 42 untersuchten Tumorproben nf-P2X₇ positiv (siehe Abb. 31). Davon haben 25 % Stadium 1, 32,5 % Stadium 2 und 42,5 % das Stadium 3 der Expressionsstärke des nf-P2X₇ Rezeptors. Lediglich 4,8 % der untersuchten Tumorproben zeigen keine nf-P2X₇ Expression.

3.2 Analyse von Patientencharakteristika von Patienten mit extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren

Es wurden Patientencharakteristika der Tumorentitäten embryonales Rhabdomyosarkom, alveoläres Rhabdomyosarkom, Neuroblastom,

Wilms-Tumor, Hepatoblastom und hepatozelluläres Karzinom analysiert. Im Folgenden sind diese aufgeführt.

3.2.1 Patientencharakteristika bei Patienten mit Rhabdomyosarkom

In Tabelle 14 sind diverse Patientencharakteristika der Tumorentitäten alveoläres und embryonales Rhabdomyosarkom dargestellt.

Tabelle 14: Auflistung der Patientencharakteristika bei Patienten mit alveolärem (links) und embryonalem Rhabdomyosarkom (rechts)

Charakteristika	Patienten-Anzahl n=8*	Charakteristika	Patienten-Anzahl n=9
Alter bei ED (Monate)		Alter bei ED (Monate)	
Ø 106,5 (range 24 - 204)		Ø 59,4 (range 12 - 144)	
Geschlecht		Geschlecht	
Männlich	4	Männlich	5
Weiblich	4	Weiblich	4
FOXO1 Bruch			
positiv	3		
negativ	1		
PAX3-FOXO1 Genfusion			
negativ	3		
positiv	1		
PAX7-FOXO1 Genfusion			
ja	1		
nein	1		

*bei Differenz der Summe: keine klinische Angabe

1) ED = Erstdiagnose

Die Tabelle 14 zeigt in beiden Rhabdomyosarkom Tumorentitäten eine ausgewogene Verteilung der Geschlechter sowie ein im Durchschnitt jüngeres Alter der Patienten mit embryonalem Rhabdomyosarkom bei Erstdiagnose. Zudem zeigten einige Patienten die mit dem alveolären Rhabdomyosarkom assoziierten Translokationen, welche zur PAX-FOXO1 (von engl. *forkhead box O1*) Genfusion führen (Schlag et al., 2011, Ramadan et al., 2020).

3.2.2 Patientencharakteristika bei Patienten mit Lebertumoren

Die Tabelle 15 gibt eine Übersicht über verschiedene Patientencharakteristika bei Patienten mit Hepatoblastom (HB) oder hepatozellulärem Karzinom (HCC).

Tabelle 15: Auflistung der Patientencharakteristika bei Patienten mit Lebertumoren im Vergleich: Hepatozelluläres Karzinom (links) und Hepatoblastom (rechts)

Charakteristika	Patienten-Anzahl n=5*	Charakteristika	Patienten-Anzahl n=4*
Alter bei ED (Monate)		Alter bei ED (Monate)	
Ø 159 (range 83 - 212)		Ø 27,3 (range 5 - 61)	
Geschlecht		Geschlecht	
Männlich	2	Männlich	3
Weiblich	3	Weiblich	1
AFP		AFP	
normal	2	normal	0
erhöht	2	erhöht	3
Metastasen		Metastasen	
negativ	1	negativ	2
positiv	3	positiv	2
präop. Chemotherapie		präop. Chemotherapie	
ja	3	ja	2
nein	2	nein	1
Überleben		Überleben	
positiv	4	positiv	3
negativ	1	negativ	0

*bei Differenz der Summe: keine klinische Angabe

1) ED = Erstdiagnose

2) AFP = Alpha-Fetoprotein

Wie in Tabelle 15 dargestellt, lag in der Mehrzahl der Fälle eine Erhöhung des Alpha-Fetoproteins (AFP) vor. Außerdem zeigten fünf von neun Patienten Metastasen. Lediglich ein Patient verstarb aufgrund des Tumorleidens.

3.2.3 Patientencharakteristika bei Patienten mit Neuroblastom

Es wurden verschieden Patientencharakteristika von Patienten mit Neuroblastom analysiert. Diese sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Auflistung der Patientencharakteristika bei Patienten mit Neuroblastom

Charakteristika	Patienten-Anzahl n=9*	Charakteristika	Patienten-Anzahl n=9*
Alter bei ED (Monate)			
Ø 43,8 (range 9 - 127)			
Geschlecht		n-myc Status	
Männlich	4	negativ	8
Weiblich	5	positiv	1
Stadium		Chromosom 1 (p36)	
I	0	negativ	4
II	0	positiv	1
III	3	ALK¹⁾	
IV	5	negativ	0
Stadium (Hughes)		positiv	3
Ia	2	mIBG²⁾	
Ib	4	negativ	0
II	1	positiv	4
III	0	Chemotherapie	
IV	0	nein	2
Differenzierungsgrad		ja	7
1	0	NB2004 Studienprotokoll	
2	0	High Risk	4
3	5	Intermediate	1
4	3	Observation	2
Regressionsgrad		Überleben	
1	0	positiv	7
2	0	negativ	2
3	0		
4	8		
Metastasen			
negativ	0		
positiv	9		

*bei Differenz der Summe: keine klinische Angabe

1) ED = Erstdiagnose

2) ALK = Anaplastische Lymphomkinase

3) mIBG= meta-Iodobenzylguanidine positives Tumorgewebe

Die Tabelle 16 zeigt eine Übersicht über die Patientencharakteristika der neun analysierten Neuroblastome, wobei alle Tumoren ein höheres Stadium III oder IV aufwiesen. Ebenso sind hohe Differenzierungs- und Regressionsgrade auffällig. Lediglich ein untersuchtes Neuroblastom war n-myc positiv. Die Mehrzahl der Fälle wurde nach dem NB2004 Studienprotokoll behandelt. Sieben untersuchte Patienten zeigten ein positives Überleben.

3.2.4 Patientencharakteristika bei Patienten mit Wilms-Tumor

Die Tabelle 17 zeigt eine Übersicht über analysierte Patientencharakteristika von Patienten mit Wilms-Tumor.

Tabelle 17: Auflistung der Patientencharakteristika bei Patienten mit Wilms-Tumor

Charakteristika	Patienten-Anzahl n=5*
Alter bei ED (Monate)	
Ø 13 (range 9 – 23)	
Geschlecht	
Männlich	3
Weiblich	2
Stadium (nach SIOP)	
I	4
II	0
III	0
IV	1
V	0
Metastasen	
negativ	4
positiv	1
präop. Chemotherapie	
ja	5
nein	0
Überleben	
positiv	5
negativ	0

*bei Differenz der Summe: keine klinische Angabe

1) ED = Erstdiagnose

Wie Tabelle 17 darstellt, wiesen alle fünf analysierten Wilms-Tumore bei präoperativer Chemotherapie ein positives Überleben auf. Gleichzeitig lagen die

Tumoren vorwiegend in Stadium I nach SIOP vor. Lediglich ein Tumor metastasierte.

3.3 Analyse des Effektes von Antikörpern gegen den nf-P2X₇ Rezeptor

Die Firma Biosceptre mit ihrem Hauptsitz in Sydney (Australien) untersuchte erste klinische Effekte einer Antikörper Applikation gegen den nf-P2X₇ Rezeptor. Dabei konnten Gilbert et al. (2017) in einer klinischen Phase I Studie durch topische Gabe des nf-P2X₇ Antikörpers BIL010t beim Basalzellkarzinom (BZK) eine Reduktion der BZK Läsionsgröße und eine histologisch bestätigte partielle, teilweise komplette, Regression und somit erste Hinweise für eine klinische Wirksamkeit feststellen (Gilbert et al., 2017).

Um diese ersten Hinweise auf eine klinische Wirksamkeit der Antikörper Applikation gegen den nf-P2X₇ Rezeptor genauer zu prüfen, wurden in dieser Forschungsarbeit funktionelle Assays durchgeführt. Hierzu wurden exemplarisch die RMS-Zelllinien RD (RME) und RH30 (RMA) verwendet. Wie in 3.1.1.1 dargestellt, zeigen beide RMS-Zelllinien eine signifikant erhöhte Expression des nf-P2X₇ Rezeptors (siehe Abb. 20A) und sind somit für funktionelle Assays des nf-P2X₇ Rezeptors geeignet.

3.3.1 Calcium-Messung

Wie in 1.2.2 dargestellt handelt es sich beim P2X₇ Rezeptor um einen Liganden-abhängigen Ionenkanal, welcher durch die Bindung von ATP aktiviert wird. Bei Bindung von ATP geht der Rezeptor in einen offenen Zustand über, in welchem unter anderem ein Ionenfluss von Calcium stattfindet (Egan and Khakh, 2004, Habermacher et al., 2016). Für die Untersuchung des ATP-induzierten intrazellulären Calciumhaushaltes in Hinblick auf den nf-P2X₇ Rezeptor wurden die Tumorzelllinien RD und RH30 untersucht. Hierfür wurde Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP), ein starker, spezifischer Agonist des P2X₇ Rezeptors, verwendet (Hibell et al., 2000, North and Surprenant, 2000).

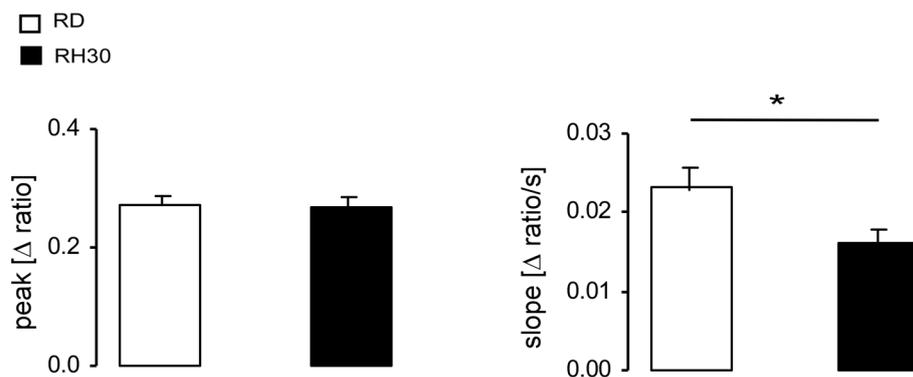


Abbildung 32: ATP-induzierte Calcium-Messung der RMS-Zelllinien RD und RH30

Nach Zugabe von 3 mM ATP wurde die maximale Calcium-Konzentration (*peak*) (links) sowie die maximale intrazelluläre Calcium-Einstromgeschwindigkeit (*slope*) (rechts) in der RME-Zelllinie RD (weiß) und der RMA-Zelllinie RH30 (schwarz) gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler aus mind. 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, T-Test), *p<0,05.

Wie in Abbildung 32 (links) dargestellt zeigen beide untersuchten malignen RMS-Zelllinien RD und RH30 nach einer Behandlung mit 3 mM ATP gleiche intrazelluläre Calcium-Konzentrationen (*peak*) in der Zelle. Gleichzeitig ist aber die maximale Calcium-Einstromgeschwindigkeit (*slope*) der RH30 Zelllinie signifikant gegenüber der RD Zelllinie vermindert (siehe Abb. 32 rechts).

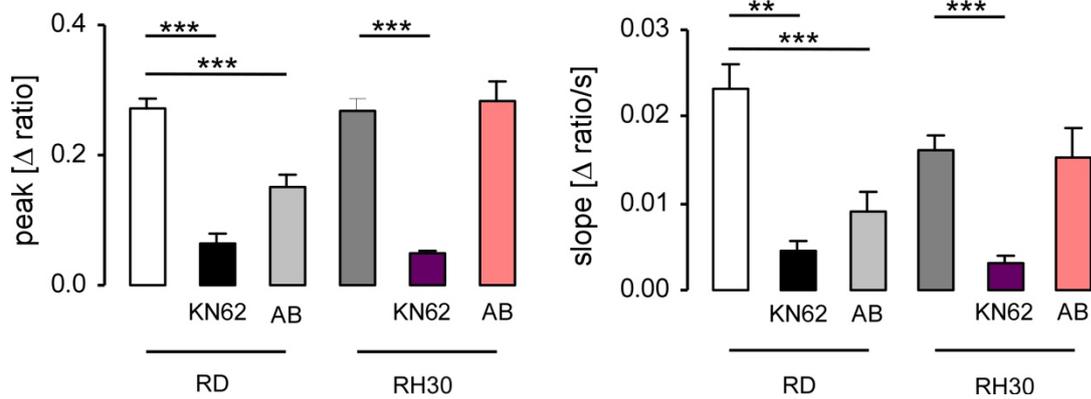


Abbildung 33: Einfluss des P2X₇ Antagonisten KN62 und nf-P2X₇ Antikörper auf den ATP-induzierten Calciumhaushalt in den RMS-Zelllinien RD und RH30

Nach Zugabe von 3 mM ATP wurde die maximale Calcium-Konzentration (*peak*) (links) sowie die maximale Calcium-Einstromgeschwindigkeit (*slope*) (rechts) in der RME-Zelllinie RD und der RMA-Zelllinie RH30 gemessen. Zusätzlich wurden die Zellen mit P2X₇ Antagonist KN62 oder nf-P2X₇ Antikörper BIL03s (hier: AB) behandelt.

Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler aus mind. 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, Bonferroni-Test), **p<0,01; ***p<0,001.

Die Abbildung 33 stellt den Einfluss des P2X₇ Rezeptor Antagonisten KN62 (Brandao-Burch et al., 2012) sowie des nf-P2X₇ Antikörpers BIL03s auf den ATP-induzierten Calciumhaushalt in RMS-Zelllinien dar. Beide Zelllinien (RD und RH30) weisen bei einer Behandlung mit dem P2X₇ Antagonisten KN62 eine signifikant verminderte intrazelluläre Calcium-Konzentration (*peak*) (Abb. 33 links) und eine signifikant verminderte Calcium-Einstromgeschwindigkeit (*slope*) (Abb. 33 rechts) im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle auf. Auch die Behandlung mit BIL03s führt in der RD-Zelllinie zu einer signifikant erniedrigten intrazellulären Calcium-Konzentration (*peak*) und einer signifikant erniedrigten Calcium-Einstromgeschwindigkeit (*slope*). Im Gegensatz hierzu zeigt die Zelllinie RH30 bei Behandlung mit BIL03s keine signifikante Veränderung des Calciumhaushaltes.

3.3.2 Transwell Migration Assay

Im Transwell Migration Assay kann der mögliche Einfluss von intrazellulären Signalwegen oder Zelloberflächenproteinen auf die Migration unter verschiedenen Stimuli gemessen werden. Die migratorische Antwort der Zellen schließt hierbei Chemotaxis, Haptotaxis und Chemokinese mit ein, ohne dabei durch den Effekt von Zellproliferation und Zell-Zell-Interaktionen beeinflusst zu sein (Chen, 2005).

Mit dem Transwell Migration Assay soll der Einfluss des nf-P2X_7 Rezeptors auf die Zellmigration untersucht werden.

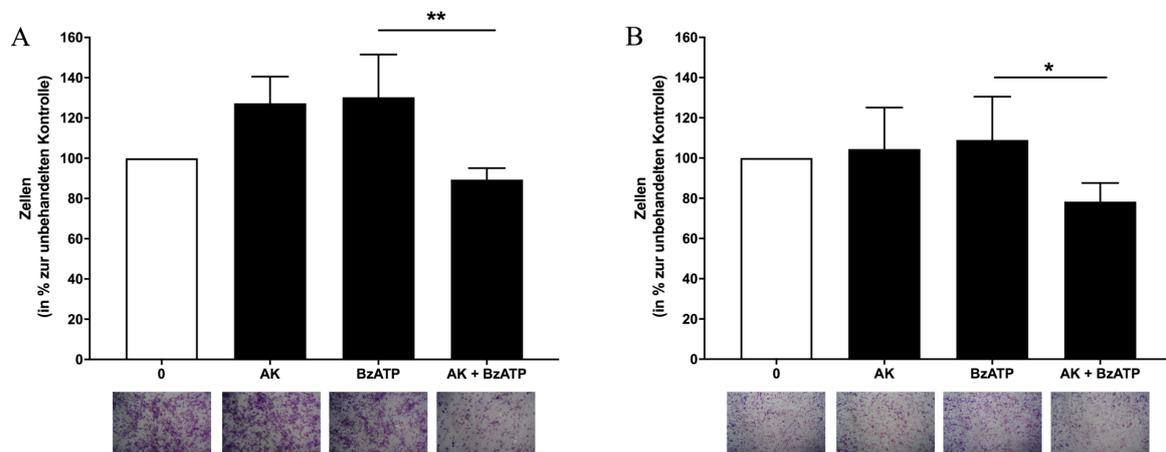


Abbildung 34: Transwell Migration der RMS-Zelllinien RD (A) und RH30 (B) bei unterschiedlichen Behandlungen mit nf-P2X_7 Antikörper und BzATP

Die RMS-Zelllinien RD (RME) und RH30 (RMA) wurden mit $0,5 \mu\text{M}$ nf-P2X_7 Antikörper BIL03s, $0,2 \text{ mM}$ Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) sowie der Kombination aus beidem behandelt. Nach 24 h wurde die Migration durch die mikroporöse Membran gemessen und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in Prozent berechnet.

(A) Transwell Migration RME-Zelllinie RD. (B) Transwell Migration RMA-Zelllinie RH30. Hinzugefügt sind exemplarische Bilder der mikroporösen Membran nach 24h Behandlung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler aus mind. 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, Sidak-Test), $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

Die Abbildung 34 stellt die Transwell Migration der RMS-Zelllinien RD und RH30 nach der Behandlung mit dem nf-P2X_7 Antikörper BIL03s, BzATP sowie der Kombination aus beidem dar. Beide RMS-Zelllinien (RD und RH30) zeigen bei der Kombinationsbehandlung von BzATP mit dem nf-P2X_7 Antikörper BIL03s eine signifikant verminderte Migration im Vergleich zu den mit BzATP behandelten Zellen.

3.3.3 Colony Forming Assay (CFA)

Mit dem Colony Forming Assay soll der Einfluss des nf-P2X₇ Rezeptors auf die Kolonienbildung untersucht werden.

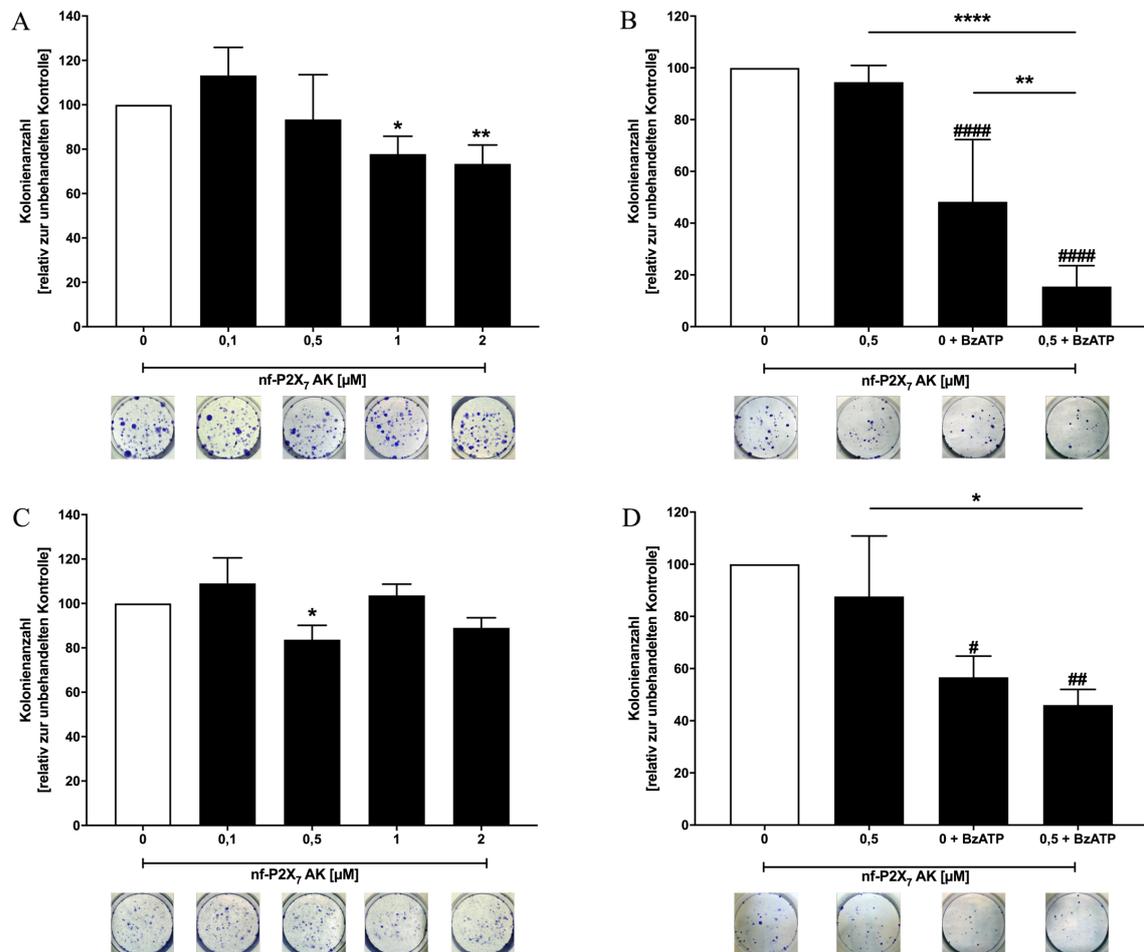


Abbildung 35: Colony Forming Assay (CFA) der RMS-Zelllinien RD (A&B) und RH30 (C&D) mit nf-P2X₇ Antikörper und BzATP-Behandlung

Es wurde die Kolonienbildung der RME-Zelllinie RD und RMA-Zelllinie RH30 bei verschiedenen Behandlungsansätzen nach entsprechender Inkubationszeit gezählt und relativ zur unbehandelten Kontrolle in Prozent ausgewertet.

(A) CFA RD-Zelllinie mit aufsteigender nf-P2X₇ Antikörper (BIL03s) Behandlung. (B) CFA RD-Zelllinie mit 0,5 µM nf-P2X₇ Antikörper (BIL03s) Behandlung, 0,2 mM BzATP-Behandlung & Kombinationsbehandlung. (C) CFA RH30-Zelllinie mit aufsteigender nf-P2X₇ Antikörper (BIL03s) Behandlung. (D) CFA RH30-Zelllinie mit nf-P2X₇ Antikörper (BIL03s) Behandlung, 0,2 mM BzATP-Behandlung & Kombinationsbehandlung. Hinzugefügt sind exemplarische Bilder der CFA nach entsprechender Inkubationszeit. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler aus mind. 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, Dunnett-Test & Sidak-Test), *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001. # = statistische Analyse in Bezug auf unbehandelte Kontrolle (weiß), #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001.

Die Abbildung 35 zeigt die Messung der Kolonienbildung der RMS-Zelllinien RD (RME) und RH30 (RMA) bei verschiedenen Behandlungsansätzen mit dem

nf-P2X₇ Antikörper (BIL03s) und BzATP. Die RD-Zelllinie zeigt bei einer Inkubation mit 1 µM und 2 µM BIL03s eine signifikant verminderte Kolonienbildung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (siehe Abb. 35A). Die Abbildung 35B stellt die zusätzliche Behandlung der RD-Zelllinie mit BzATP dar. Hierbei zeigt eine alleinige Behandlung mit BzATP eine signifikant verminderte Kolonienbildung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Wird diese BzATP-Behandlung mit 0,5 µM nf-P2X₇ Antikörper kombiniert, sinkt die Kolonienbildung der Zelllinie RD signifikant.

Die Zelllinie RH30 zeigt bei einer Inkubation mit 0,5 µM nf-P2X₇ Antikörper BIL03s eine signifikant verminderte Kolonienbildung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Es zeigt sich jedoch im Gegensatz zur Zelllinie RD keine verminderte Kolonienbildung bei steigender nf-P2X₇ Antikörper Konzentration (siehe Abb. 35C). Die Abbildung 35D stellt die Behandlung der RH30-Zelllinie mit BzATP dar. Die Kolonienbildung ist bei Behandlung mit BzATP signifikant vermindert. Auch bei der Behandlung von BzATP und 0,5 µM nf-P2X₇ Antikörper zeigt die Zelllinie RH30 eine signifikant verminderte Kolonienbildung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

4 DISKUSSION

Die aktuellen Herausforderungen in der Behandlung solider Tumoren im Kindesalter sind insbesondere Fälle mit lokal fortgeschrittenem Tumorstadium, vorhandener Metastasierung oder Tumorrezidiv sowie erhebliche Spätfolgen bisheriger Therapien (Schmidt et al., 2018). Die Bewältigung dieser erfordert ein tiefgehendes Verständnis der Tumorbilogie für die Erforschung neuer effektiver sowie tolerabler Therapien (Lee, 2018).

Ein potentieller Ansatzpunkt ist der purinerge non-functional P2X₇ (nf-P2X₇) Rezeptor, dessen weitreichende Expression durch die Entwicklung spezifischer Antikörper auf adulten Tumorentitäten bestätigt wurde (siehe Tab. 2 in 1.2.3). Eine Ansteuerung des nf-P2X₇ Rezeptors durch zielgerichtete Antikörper verursachte dabei einen Zelltod *in vitro* sowie einen Rückgang von Metastasierung und Tumorgröße *in vivo* (Barden et al., 2016). Zudem erlangte man in einer Phase I Studie bei hoher Sicherheit und Tolerabilität erste Hinweise auf eine klinische Wirksamkeit einer nf-P2X₇ Antikörper Applikation (Gilbert et al., 2017). Der nf-P2X₇ Rezeptor stellt somit ein neues weitreichendes therapeutisches sowie spezifisches Target für Tumorentitäten von Erwachsenen dar (Barden et al., 2014, Barden et al., 2016, Gilbert et al., 2017, Gilbert et al., 2019). Bislang erfolgte keine Untersuchung des nf-P2X₇ Rezeptors in Hinblick auf solide Tumoren im Kindesalter.

Das Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit ist es daher erstmalig kindliche solide Tumoren hinsichtlich des nf-P2X₇ Rezeptors zu untersuchen. Dabei sollte die ubiquitäre Expression des nf-P2X₇ Rezeptors auch auf der Oberfläche kindlicher solider Tumorentitäten bestätigt und sein Potential als neues diagnostisches und therapeutisches Target untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit zeigen erstmals eine ubiquitäre Expression des nf-P2X₇ Rezeptors auf verschiedensten pädiatrischen Tumorentitäten *in vitro*. Zudem bestätigt sich durch fehlende Expression auf gesundem Gewebe das Potential des nf-P2X₇ Rezeptors als diagnostisches Target. Die Ergebnisse funktioneller Assays mit signifikanten *in vitro* Effekten

unterstützen außerdem das mögliche therapeutische Potential einer nf-P2X₇ Antikörper Applikation.

4.1 Expressionsmuster des nf-P2X₇ Rezeptors in extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren

Erstmals wurde das Expressionsprofil des nf-P2X₇ Rezeptors in extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren analysiert. Dabei zeigte sich eine ubiquitäre Membranexpression auf einer Bandbreite verschiedener kindlicher solider Tumorzelllinien. Die untersuchten Tumorzelllinien umfassen hierbei die Tumorentitäten embryonales und alveoläres Rhabdomyosarkom, maligner Rhabdoid Tumor, hepatozelluläres Karzinom (HCC), Hepatoblastom (HB), Neuroblastom, Ewing-Sarkom und Osteosarkom. Die Expression des nf-P2X₇ Rezeptors zeigte sich auf allen Zellen der untersuchten malignen Tumorentitäten um ein Vielfaches im Gegensatz zu gesunden Referenz-Zellen erhöht. Generell wurde eine nur geringe membranäre Expression des nf-P2X₇ auf den gesunden Referenz-Zellen (Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, SKMC) nachgewiesen. Die Ergebnisse schließen sich somit vorherigen Untersuchungen erwachsener solider Tumorzelllinien an, bei welchen eine Überexpression des nf-P2X₇ Rezeptors auf malignen Zellen nachgewiesen wurde (Gilbert et al., 2019, Biosceptre International Limited, 2017, Barden et al., 2016, Barden et al., 2009, Barden et al., 2003, Worthington et al., 2002, Gu et al., 2000). Das membranäre Expressionsprofil des nf-P2X₇ Rezeptors wurde in den durchflusszytometrischen Untersuchungen durch Verwendung des nf-P2X₇ Antikörpers BIL03s erstellt, für welchen eine spezifische Bindung an den nf-P2X₇ Rezeptor über das Epitop E200 bestätigt ist. Dies wurde von Gilbert et al. (2019) anhand von siRNA (von engl. *small interfering RNA*) und ELISA (von engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) Analysen untersucht. Eine Bindung des Antikörpers BIL03s an den Wildtyp P2X₇ ist dabei ausgeschlossen (Gilbert et al., 2019).

Im Vergleich der durchschnittlichen membranären nf-P2X₇ Expression wurde das Neuroblastom als stärkste exprimierende untersuchte kindliche solide

Tumorentität definiert (siehe Kap. 3.1.1.6, Abb. 25A und Tab. 13). Warum kindliche solide Tumorentitäten derart unterschiedliche Expressionsstärken an nf-P2X₇ Rezeptoren auf der Zelloberfläche aufweisen, ist bislang nicht geklärt. Zumindest der Ursprung der Tumorentität erlaubt hierfür keinen Zusammenhang, da sowohl die stärkste nf-P2X₇ exprimierende Tumorentität, das Neuroblastom, als auch das Hepatoblastom mit der geringsten nf-P2X₇ Expressionsstärke, embryonalen Ursprungs sind (Tulla et al., 2015).

Betrachtet man das Neuroblastom aus klinischer Sicht, ist ein Rückschluss von der hohen nf-P2X₇ Expression auf eine beispielsweise korrelierende schlechtere Prognose schwierig, da schon innerhalb der Tumorentität die Prognose stark vom persönlichen Risikoprofil (z.B. n-myc Amplifikation) des Patienten abhängt (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2019). Innerhalb der untersuchten malignen Zelllinien des Rhabdomyosarkoms zeigt das alveoläre Rhabdomyosarkom (RMA) eine durchschnittlich höhere nf-P2X₇ Expression als das embryonale Rhabdomyosarkom (RME) (siehe Kap. 3.1.1.6, Abb. 25A und Tab. 13). Vergleicht man die beiden Tumorentitäten anhand ihrer Prognose, zeigt das RMA mit einer 5-Jahresüberlebensrate von < 30 % eine deutlich schlechtere Prognose als das RME mit einer 5-Jahresüberlebensrate von > 70 % (Amer et al., 2019). Desgleichen weist der maligne Rhabdoid Tumor (mRT) wie das alveoläre Rhabdomyosarkom eine hohe nf-P2X₇ Expressionsstärke sowie eine geringe 5-Jahresüberlebensrate von < 30 % auf (Tekautz et al., 2005, Bartelheim et al., 2016, Reinhard et al., 2008). Analysiert man die untersuchten malignen Zelllinien der Lebertumoren, zeigt das hepatozelluläre Karzinom (HCC) eine im Durchschnitt höhere nf-P2X₇ Expression als das Hepatoblastom (siehe Kap. 3.1.1.6, Abb. 25A und Tab. 13). Aus klinischer Sicht zeigt das HCC ebenfalls im Vergleich eine deutlich schlechtere Prognose. Insbesondere nicht resektable HCC sprechen im Gegensatz zum Hepatoblastom nahezu überhaupt nicht auf eine Chemotherapie an und ziehen eine dementsprechend schlechte Prognose mit sich (Katzenstein et al., 2002, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2016). Zusammengefasst korreliert voraussichtlich beim RMA,

mRT und HCC die hohe nf-P2X₇ Expression mit einer klinisch schlechteren Prognose. Vergleicht man hingegen die Tumorentitäten der malignen Knochentumoren, zeigen sich ähnliche nf-P2X₇ Expressionsstärken (siehe Kap. 3.1.1.3, Abb. 23A) der Ewing-Sarkom und Osteosarkom Zelllinien, wobei sich auch diese Tumorentitäten sowohl in ihrer Prognose als auch beispielsweise ihrem Ansprechen auf Strahlentherapie unterscheiden (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2014, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2010).

Inwieweit die nf-P2X₇ Expressionsstärke auf der Oberfläche von Tumorzellen mit der Prognose der Tumorentität sowie deren Ansprechrate auf verschiedene Therapieformen korreliert, bedarf daher weiterer Untersuchungen mit einer höheren Patientenanzahl. Gleichzeitig können die verschiedenen Eigenschaften der Tumorentitäten ein Ansatzpunkt für die Erklärung der unterschiedlichen nf-P2X₇ Expressionsstärken sein.

Neben der Ermittlung der nf-P2X₇ positiven Zellen in Prozent wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) gemessen. Dabei war festzustellen, dass eine starke membranäre Expression des nf-P2X₇ Rezeptors nicht zwingend mit einem hohen MFI korreliert. Im durchschnittlichen Vergleich korreliert die nf-P2X₇ Expression bei der Hälfte der untersuchten Tumorentitäten (Neuroblastom, Osteosarkom, hepatozelluläres Karzinom, Hepatoblastom) mit dem MFI (siehe Kap. 3.1.1.6, Abb. 25A,B und Tab. 13). Schlussendlich bleibt offen, ob eine hohe membranäre nf-P2X₇ Expressionsstärke mit einem gleichzeitig hohen MFI zusammenhängt. Eine dahingehende Analyse fand in erwachsenen Tumorentitäten bislang nicht statt und bedarf einer weiteren Analyse mit höheren Patientenzahlen.

Gilbert et al. (2019) untersuchte dafür adulte Tumorzelllinien auf das intrazelluläre Vorhandensein des mRNA (von engl. *messenger* RNA) Transkripts des P2X₇ Rezeptorgens *P2RX7*. Hierbei korrelierten die Level an P2X₇ mRNA nicht mit der durch BIL03s untersuchten Expressionsstärke des nf-P2X₇ Rezeptors. Es wird angenommen, dass die *P2RX7* mRNA abhängig

vom Zelltyp in den Wildtyp P2X₇ oder den nf-P2X₇ Rezeptor translatiert wird (Gilbert et al., 2019). Des Weiteren zeigte Gilbert et al. (2019), dass Tumorzellen mit fehlender Porenfunktion für große Moleküle eine starke membranäre Expression des nf-P2X₇ Rezeptors und eine nur geringe membranäre Expression des Wildtyps P2X₇ aufweisen. Auch umgekehrt wurde bei einer hohen membranären Expression des Wildtyp P2X₇ Rezeptors eine erhaltene Porenfunktion für große Moleküle sowie eine geringe Expression des nf-P2X₇ Rezeptors bestätigt (Gilbert et al., 2019). Aufgrund dieser Untersuchungen kann angenommen werden, dass auch die in dieser vorliegenden Arbeit untersuchten kindlichen soliden Tumorzelllinien mit hoher nf-P2X₇ Expression eine fehlende Porenfunktion für große Moleküle aufweisen. Dennoch stellt sich die Frage, ob diese Annahme bedingungslos auf kindliche solide Tumorzellen übertragen werden kann, sodass durch eine Analyse der Porenfunktion sowie der Untersuchung der P2X₇ Membranexpression auf kindlichen soliden Tumorzellen diese Annahme in weitergehenden Experimenten bestätigt werden sollte. Trotzdem belegt die im Gegensatz zu benignen Zellen um ein Vielfaches erhöhte membranäre nf-P2X₇ Expression die mögliche Differenzierung zwischen gesunden und maligne transformierten Zellen auch bei kindlichen soliden Tumoren *in vitro*.

Zusätzlich wurde die Expression des nf-P2X₇ Rezeptors auf verschiedenen kindlich soliden Tumorentitäten analysiert. Auf 95,2 % der immunhistochemisch gefärbten Tumorschnitte konnte der nf-P2X₇ Rezeptor nachgewiesen werden (siehe Kap. 3.1.2.5, Abb. 31). Gleichzeitig zeigten untersuchtes gesundes Gewebe sowie nekrotische Areale innerhalb der Tumoren keine nf-P2X₇ Expression. Es bestätigte sich daher eine spezifische Bindung des Antikörpers BPM09, welche ebenfalls von Gilbert et al. durch ELISA und siRNA nachgewiesen wurde (Gilbert et al., 2019). Die vorliegenden Ergebnisse schließen sich somit den bisherigen Veröffentlichungen hinsichtlich der immunhistochemisch ermittelten nf-P2X₇ Expression an (Gilbert et al., 2019, Gilbert et al., 2017, Biosceptre International Limited, 2017, Barden et al., 2016,

Barden et al., 2014, Barden et al., 2009, Slater et al., 2004a, Slater et al., 2004b).

Anhand der vorher beschriebenen Expressionsstadien des nf-P2X₇ Rezeptors (Gilbert et al., 2019), wurde die Expressionsstärke des nf-P2X₇ Rezeptors anhand der Stadien 0 bis 3 analysiert, wobei sich eine in etwa gleichmäßige Verteilung der Stadien in allen untersuchten Tumorentitäten zeigte (siehe Kap. 3.1.2.5, Abb. 30). Auch der Vergleich verschiedener Patientencharakteristika in Bezug auf das nf-P2X₇ Expressionsstadium erbrachte keine sichtbare Korrelation wie beispielsweise eine erhöhte Mortalität bei Expressionsstadium 3.

Neben den nf-P2X₇ Expressionsstadien sind verschiedene intrazelluläre und membranäre Expressionsmuster des nf-P2X₇ Rezeptors beschrieben. Dabei wird mit steigendem Tumorstadium ein progressiver Transport von nf-P2X₇ aus dem Zytoplasma an die Zellmembran vermutet: Im niedrigen Tumorstadium liegt der nf-P2X₇ Rezeptor überwiegend intrazellulär vor, wohingegen fortgeschrittene Tumorstadien vor allem eine membranäre nf-P2X₇ Expression und korrespondierend wenig zytoplasmatische Expression aufweisen. Es wird daher angenommen, dass das Expressionsmuster mit dem Tumorstadium korreliert (Barden et al., 2016, Barden et al., 2014, Slater et al., 2003, Slater et al., 2004a, Slater et al., 2004b). In den immunhistochemischen Färbungen der vorliegenden Arbeit zeigen alle nf-P2X₇ positiven Tumorschnitte eine zytoplasmatische Expression, unabhängig davon, ob es sich um einen niedrig- oder höher gradigen Tumor handelt. Die sichere Abgrenzung zwischen zytoplasmatischem und membranärem Expressionsmuster war aufgrund erhöhter Kern-Plasma-Relation bei schmalen Zytoplasmasaum der Tumorzellen nicht möglich. Auch die bislang beschriebene Feldwirkung (engl. *field effect*) des nf-P2X₇ Rezeptors in Tumor-benachbartem gesunden Gewebe konnten nicht festgestellt werden. Diese nf-P2X₇ Expression wurde zuvor beim nicht invasiven Brustkrebs (lobuläres und ductales Carcinoma in situ) als auch auf normal erscheinendem Gewebe in der nächsten Umgebung von Prostatakrebszellen beschrieben und durch von Tumorzellen sekretierende

Wachstumsfaktoren, welche das umliegende gesunde Epithel durchdringen, begründet (Barden et al., 2014, Slater et al., 2004a, Slater et al., 2004b). Natürlich sind abweichende verwendete Protokolle sowie unterschiedliche Ergebnisse aufgrund der störanfälligen immunhistochemischen Färbung nicht ausgeschlossen. Eine Verwendung von standardisierten Testabläufen sowie vollautomatisierten Färbeautomaten könnte eine bessere Vergleichbarkeit der immunhistochemischen Färbungen in erwachsenen und kindlichen soliden Tumorentitäten gewährleisten. Ob letztendlich das bisherig postulierte Tumorstadium-abhängige nf-P2X₇ Expressionsmuster missinterpretiert wurde oder sich grundlegend von dem nf-P2X₇ Expressionsmuster in kindlichen soliden Tumorentitäten unterscheidet, bleibt offen. Schlussendlich widersprechen unsere Ergebnisse der Annahme, anhand verschiedener nf-P2X₇ Expressionsmuster zwischen latenten und aggressiven Tumorformen unterscheiden zu können, sowie dem Vorhandensein einer Feldwirkung in gesundem Gewebe. Nichtsdestotrotz zeigen auch die immunhistochemischen nf-P2X₇ Antikörper Färbungen der vorliegenden Arbeit eine sichere Unterscheidung zwischen gesundem und maligne transformiertem Gewebe.

Zusammenfassend bestätigen unsere Expressionsanalysen anhand durchflusszytometrischer und immunhistochemischer Untersuchungen erstmals die Rolle des nf-P2X₇ Rezeptors als hoch spezifisches, ubiquitär exprimiertes Target auf kindlichen soliden Tumoren.

4.2 Patientencharakteristika von Patienten mit extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren

Insgesamt zeigt die Analyse der Patientencharakteristika von Patienten mit extrakraniellen kindlichen soliden Tumoren in allen analysierten Tumorentitäten hohe Überlebensraten. Allerdings ist dabei der begrenzte Beobachtungszeitraum bis September 2019 sowie die heterogene Studiengruppe zu berücksichtigen. Außerdem ist die Repräsentativität aufgrund des niedrigen Stichprobenumfangs erheblich eingeschränkt. Nichtsdestotrotz entsprechen viele der analysierten Patientencharakteristika der allgemeinen

epidemiologischen Datenlage. So zeigt sich auch in unseren Daten beim Hepatoblastom (siehe Kap. 3.2.2, Tab. 15) ein Altersgipfel im Vorschulalter bei männlicher Prädisposition (Tulla et al., 2015, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2016) sowie beim hepatozellulären Karzinom (HCC) (siehe Kap. 3.2.2, Tab. 15) ein Altersgipfel im Schul- und Jugendalter (über dem 10. Lebensjahr) bei einer Mehrzahl von weiblichen Patientinnen (Khanna and Verma, 2018, Katzenstein et al., 2002). Dahingegen grenzt sich die ausgewogene Geschlechterverteilung unserer Patienten mit Rhabdomyosarkom (siehe Kap. 3.2.1, Tab. 14) von der von Amer et al. (2019) beschriebenen signifikanten männlichen Prädisposition für alle Rhabdomyosarkom Subtypen ab (Amer et al., 2019). Auch zeigen die Patientencharakteristika der Neuroblastomgruppe (siehe Kap. 3.2.3, Tab. 16) ein deutlich höheres mittleres Erkrankungsalter von 43,8 Monaten im Vergleich zu den in der Literatur angegeben 14 Monaten (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2019).

Betrachtet man die Todesfälle ($n = 2$) in der Neuroblastomgruppe (siehe Kap. 3.2.3, Tab. 16), zeigt sich der einzige in unseren Patientencharakteristika analysierte positive *n-myc* Status. Ein weiterer verstorbener Patient zeigte die einzige nachgewiesene Chromosom 1 Abberation. Zudem war bei einem Drittel der analysierten Patienten mit Neuroblastom eine Mutation des *ALK* (Anaplastische Lymphomkinase) Gens nachweisbar, welche häufig beim familiären Neuroblastom vorliegt und bei der Verfügbarkeit von *ALK* Inhibitoren Therapierelevanz besitzt (Mosse et al., 2008, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2019). Auch zeigt die Analyse der Patientengruppe mit alveolärem Rhabdomyosarkom (siehe Kap. 3.2.1, Tab. 14) in einigen Fällen das Vorliegen von Translokationen mit der Fusion des Onkogens *PAX3-* bzw. *PAX7-FOXO1*. Diese sogenannten Fusions-positiven Rhabdomyosarkome sind mit einer höheren Metastasierungsrate assoziiert (Ramadan et al., 2020). Des Weiteren ist in der Hepatoblastomgruppe (siehe Kap. 3.2.2, Tab. 15) die Erhöhung des Alpha-Fetoproteins (*AFP*) bei Erstdiagnose, dem wichtigsten Hepatoblastom Tumormarker, zu betonen

(Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2016). Im Gegensatz dazu zeigten die Patienten mit HCC (siehe Kap. 3.2.2, Tab. 15) sowohl normale als auch erhöhte AFP-Werte bei Erstdiagnose. Dies schließt sich der in der Literatur diskutierten limitierten Rolle des AFP beim kindlichen HCC an, wobei im Gegensatz zum adulten HCC eine geringe Sensitivität sowie erhöhte Werte bei Regeneration des HCC beschrieben sind (Khanna and Verma, 2018). Der eingeschränkte Nutzen des AFP im kindlichen HCC spiegelt den Bedarf an neuen sensitiven und spezifischen Tumormarkern für kindliche solide Tumoren wider.

Insgesamt unterstreicht unsere Analyse die Wichtigkeit der Bestimmung von molekulargenetischen Faktoren sowie die notwendige Etablierung neuer Biomarker zur besseren Diagnostik und Therapiestratifizierung von soliden Tumoren im Kindesalter.

4.3 Effekte der nf-P2X₇ Antikörper Applikation in kindlichen soliden Tumoren

In den letzten Jahren erlangte der nf-P2X₇ Rezeptor eine zunehmende Bedeutung bei Tumorentitäten erwachsener Patienten. Für ein tiefergehendes Verständnis des nf-P2X₇ Rezeptors als Ansatzpunkt in der zielgerichteten Therapie wurden präklinische *in vitro* und *in vivo* Studien mit einer Applikation von nf-P2X₇ gerichteten Antikörpern durchgeführt. Dabei wurde bei diversen unterschiedlichen Tumorzelllinien ein signifikant inhibiertes Wachstum sowie bei humanen, malignen Gliomzellen ein signifikant erhöhter Zelltod *in vitro* nachgewiesen (Barden et al., 2009, Barden et al., 2016). Im Xenograft Mammakarzinom Mausmodell verursachte die intravenöse (i.v.) nf-P2X₇ Antikörper Gabe eine signifikant reduzierte Lungenmetastasierung (Barden et al., 2016). Auch im Xenograft Melanom Mausmodell wurde bei topischer nf-P2X₇ Applikation ein signifikant reduziertes Tumorstadium sowie eine gute Sicherheit und Verträglichkeit festgestellt (Barden et al., 2016, Gilbert et al., 2017). Des Weiteren wurde bei der i.v. Behandlung einer Katze mit nf-P2X₇ Antikörpern eine komplette Auflösung des Plattenepithelkarzinoms der Haut mit

Bildung von neuem epithelialisiertem Gewebe erreicht. Dabei zeigte sich eine gute Verträglichkeit sowie kein Rezidiv im periodischen *Follow-up* über zwei Jahre hinweg (Barden et al., 2016). Im Anschluss an die präklinischen Studien erfolgte eine erste offene, multizentrische Phase I Studie mit einem topischen nf-P2X₇ Antikörper (BIL010t) bei Patienten mit Basalzellkarzinom (BZK). Neben einer hohen Compliance der Patienten mit lediglich milden bis moderaten, lokalisierten Nebenwirkungen, wurde erstmals eine Reduktion der Läsionsgröße bis hin zur kompletten histologischen Regression durch topische nf-P2X₇ Antikörper Applikation im Menschen nachgewiesen (Gilbert et al., 2017). Zusammengefasst ist für nf-P2X₇ Antikörper bislang ein signifikant verursachter Zelltod *in vitro*, eine signifikant reduzierte Metastasierung *in vivo* und ein signifikant verringertes Tumorwachstum *in vivo* bis hin zur Regression bei gutem Nebenwirkungsprofil bekannt (Barden et al., 2009, Barden et al., 2016, Gilbert et al., 2017).

Trotz dieser vielfachen Hinweise auf eine klinische Wirksamkeit der nf-P2X₇ Antikörper Applikation sind die damit verbundenen Mechanismen im nf-P2X₇ Rezeptor sowie den exprimierenden Zellen bislang nicht bekannt. Da der nf-P2X₇ Rezeptor aufgrund unserer nachgewiesenen Expression auch für kindliche solide Tumoren ein potentiell therapeutisches Target darstellt, wurden in dieser Forschungsarbeit tiefergehende funktionelle Analysen *in vitro* in den Rhabdomyosarkom Zelllinien RD (embryonales Rhabdomyosarkom (RME)) und RH30 (alveoläres Rhabdomyosarkom (RMA)) erstellt.

Hierbei wurde zu Beginn der Einfluss des nf-P2X₇ Rezeptors auf den Calciumhaushalt von Tumorzellen untersucht, da der nf-P2X₇ Rezeptor trotz fehlender Makroporen Funktion einen bestehenden Fluss von Calciumionen (Ca²⁺) entlang ihres elektrochemischen Gradienten in den Intrazellularraum ermöglicht (Gilbert et al., 2019, Egan and Khakh, 2004). Intrazellulär wird das Ca²⁺-Signal über eine Vielzahl verschiedener Ca²⁺-Bindungsproteine weitergeleitet (Heizmann and Cox, 1998, Slater et al., 2003). Das divalente Kation ist einer der wichtigsten sekundären Messenger der zellulären Signalgebung und in multiple physiologische Prozesse integriert (Swulius and

Waxham, 2008). Eine Veränderung des Calciumhaushaltes hat demnach einen großen Einfluss auf viele zelluläre Effekte (Slater et al., 2003). Auch in Tumorzellen korrelieren essentielle Vorgänge wie Zellmigration, Zellproliferation und Zelltod nachweislich mit der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Schmid et al., 2016, Becchetti and Arcangeli, 2010, Orrenius et al., 2003, Roderick and Cook, 2008). Dabei wird vermutet, dass eine Hochregulation von Ca^{2+} -Signalwegen mit der Therapieresistenz von Tumorzellen zusammenhängt (Schmid et al., 2016, Schmidt et al., 2014). Demnach ist die Ca^{2+} -Porenfunktion des P2X_7 und nf- P2X_7 Rezeptors für essentielle Vorgänge in Tumorzellen wichtig. Zudem wird angenommen, dass der nf- P2X_7 Rezeptor die trophische Aktivität der Tumorzellen vermutlich über seine erhaltene Ionenkanal-Funktion unterstützt (Gilbert et al., 2019, Barden et al., 2014, Jelassi et al., 2011).

In unseren Untersuchungen wurde der Calciumhaushalt der Tumorzelllinien RD und RH30 unter Einfluss von nf- P2X_7 Antikörpern und Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP), einem starken Agonisten des P2X_7 Rezeptors (Hibell et al., 2000, North, 2002, Burnstock, 2007), untersucht. Bei der Behandlung mit BzATP zeigten beide Tumorzelllinien eine gleichwertige Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (siehe Kap 3.3.1, Abb. 32). Da BzATP vor allem den P2X_7 Rezeptor aktiviert, ist anzunehmen, dass die Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration dem P2X_7 Rezeptor zuzuschreiben ist. Zudem zeigt die Inhibition des P2X_7 Rezeptors durch KN62 in beiden Zelllinien eine Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration und Ca^{2+} -Einstromgeschwindigkeit (siehe Kap. 3.3.1, Abb. 33). Jedoch wurde in RD und RH30 Tumorzellen bisher lediglich die nf- P2X_7 Form nachgewiesen, ohne die membranäre Expression des Wildtyp P2X_7 zu berücksichtigen. Es kann deshalb keine sichere Aussage darüber getroffen werden, welche Form des P2X_7 Rezeptors für die starke Zunahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich ist. Dies muss in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden. Allerdings lässt der innerhalb kurzer Zeit durch ATP-induzierte Switch der Wildtyp P2X_7 in die nf- P2X_7 Rezeptorform (siehe Kap. 1.2.3, Abb. 9) stark vermuten, dass es sich auch in unserer Messung um nf- P2X_7 induzierte Calciumströme handelt (Gilbert et al.,

2019). Es ist daher anzunehmen, dass der P2X₇ Antagonist KN62 auch eine antagonisierende Wirkung auf den nf-P2X₇ Rezeptor hat. Die weiterführende Untersuchung der Wildtyp P2X₇ Expression sowie Bestätigung eines ATP-induzierten Switch in den Tumorzelllinien RD und RH30 ist daher für ein differenzierteres Bild der verantwortlichen P2X₇ Rezeptorform hinsichtlich des Calciumhaushalts nötig.

Interessanterweise unterscheiden sich die embryonale und alveoläre Rhabdomyosarkom Tumorzelllinie in ihrer ATP-induzierten maximalen Ca²⁺-Einstromgeschwindigkeit (siehe Kap 3.3.1, Abb. 32), wobei diese bei der RME Zelllinie RD im Vergleich zu RH30 signifikant erhöht ist. Auch in ihrem Effekt durch den nf-P2X₇ Antikörper sind signifikante Unterschiede trotz ähnlicher nf-P2X₇ Expressionsstärke ersichtlich (siehe Kap 3.3.1, Abb. 33). Während die RD Zellen eine signifikant verminderte Ca²⁺-Konzentration und Einstromgeschwindigkeit durch nf-P2X₇ Antikörper zeigen, weist die RH30 Zelllinie keine signifikanten Veränderungen bei Antikörper Applikation auf. Das Ansprechen der RD Zellen auf den nf-P2X₇ Antikörper sowie die signifikant erhöhte Einstromgeschwindigkeit könnte durch die vielfach höhere Rezeptordichte des nf-P2X₇ Rezeptors im Gegensatz zu RH30 begründet sein (siehe Kap. 3.1.1.1, Abb. 20B). Des Weiteren sind diverse Splicevarianten des P2X₇ Rezeptors beschrieben (siehe Kap. 1.2.2.1, Tab. 1), welche Einfluss auf die P2X₇ Rezeptorfunktion ausüben. Es könnten daher auch unterschiedliche Splicevarianten wie beispielsweise die Splicevariante P2X₇B mit einer verstärkten Formung der Makropore sowie einer höheren Affinität für ATP (Di Virgilio et al., 2018) für das Ansprechen der RD Zelllinie auf den nf-P2X₇ Antikörper und die erhöhte Ca²⁺-Einstromgeschwindigkeit ursächlich sein. Zusammenfassend unterstützen unsere Ergebnisse der RD Zellen, jedoch nicht der RH30 Zellen, einen Einfluss des nf-P2X₇ Antikörper auf den ATP-induzierten Calciumhaushalt.

Diese unterschiedlichen Effekte des nf-P2X₇ Antikörpers auf den Calciumhaushalt wurden daraufhin durch Untersuchung der Zellmigration im Transwell Assay tiefergehend analysiert. Dabei reguliert unter anderem der

Calciumhaushalt die Aktin Zytoskelett abhängige Zellmotilität und Migration (Becchetti and Arcangeli, 2010). Hierzu wurde ein funktioneller Assay zur Überprüfung der oben genannten These durchgeführt. Hierbei sollten die RD Zellen unter dem Einfluss des nf-P2X₇ Antikörpers eine verminderte Migration durch Beeinflussung des Calciumhaushalts aufweisen. Im Gegensatz zum nicht vorhandenen Effekt des nf-P2X₇ Antikörpers auf den Calciumhaushalt der Tumorzelllinie RH30 zeigten beide RD und RH30 Tumorzelllinien gleichermaßen in Anwesenheit von BzATP und des nf-P2X₇ Antikörpers eine signifikant verminderte Zellmigration (siehe Kap. 3.3.2, Abb. 34).

Verknüpft man die Ergebnisse des Calciumhaushaltes und der Zellmigration von RH30 Zellen, so kann der Einfluss des nf-P2X₇ Antikörpers mit einer verminderten Zellmigration nicht auf die Beeinflussung des Calciumhaushaltes zurückgeführt werden. Auch im P2X₇ Wildtyp ist bei Aktivierung eine unabhängig vom Calciumhaushalt schnelle Umlagerung des Zytoskeletts durch Formung eines P2X₇ Signalkomplexes beschrieben (Kim et al., 2001). Des Weiteren ist zu betonen, dass unser nachgewiesener Effekt des nf-P2X₇ Antikörpers in beiden Zelllinien nur in Kombination mit BzATP auftritt. Eine alleinige nf-P2X₇ Antikörper Applikation führt in keiner der beiden Zelllinien RD und RH30 zu einer signifikant veränderten Migration. Der signifikante Effekt auf die Zellmigration des nf-P2X₇ Antikörpers in Anwesenheit von ATP könnte auf der Grundlage des von Gilbert et al. (2019) beschriebenen ATP-induzierten Switch vom Wildtyp P2X₇ zum nf-P2X₇ Rezeptor (siehe 1.2.3) basieren (Gilbert et al., 2019). Dabei liegt erst bei hoher ATP-Konzentration eine hohe Rezeptordichte des nf-P2X₇ Rezeptors vor, sodass in unseren Versuchen bei einer hohen BzATP-Konzentration der nf-P2X₇ Antikörper in ausreichender Konzentration binden und eine signifikant verminderte Zellmigration bewirken kann. Die Applikation von BzATP ohne nf-P2X₇ Antikörper führt, entsprechend der Hypothese von Gilbert et al. (2019), durch höhere nf-P2X₇ Expressionslevel zu einer gesteigerten Migration. Der Höhepunkt der nf-P2X₇ Expression wurde von Gilbert et al. (2019) nach 24 Stunden (h) ATP-Inkubation beschrieben (Gilbert et al., 2019). Dementsprechend wurden unsere Transwell Assays nach

24 h Inkubationszeit ausgewertet. Für ein tiefergehendes Verständnis des Verlaufs der nf-P2X₇ Expressionslevel unter ATP-Applikation in RD und RH30 Zellen wäre auch hier eine wie in Gilbert et al. (2019) durchgeführte Analyse des ATP-induzierten Switch sowie eine durchflusszytometrische Analyse über eine mögliche Zunahme von nf-P2X₇ an der Membran interessant. Auch eine Untersuchung der Migration über 24 h hinaus könnte den Einfluss von ATP auf den nf-P2X₇ Rezeptorstatus genauer differenzieren. Zusammengefasst verursacht eine nf-P2X₇ Antikörper Applikation bei hohen ATP-Konzentrationen in beiden Tumorzelllinien RD und RH30 eine signifikant verminderte Zellmigration.

Aufgrund unserer These, dass sich der Effekt des nf-P2X₇ Antikörpers unter hohen ATP-Konzentrationen bei der Zellmigration auch auf andere Zellfunktionen übertragen lässt, wurde im Anschluss die Kolonienbildung (Colony Forming Assay, kurz: CFA) der Tumorzelllinien RD und RH30 unter dem Einfluss von nf-P2X₇ Antikörper und BzATP untersucht. Durch den Nachweis der signifikant geringsten Kolonienbildung unter Behandlung mit nf-P2X₇ Antikörper und BzATP in beiden Tumorzelllinien RD und RH30 (siehe Kap. 3.3.3, Abb. 35) bestätigt sich die These. Auch laut Barden et al. (2014) wird eine Förderung des Metastasierungspotential von Tumorzellen durch den nf-P2X₇ Rezeptor vermutet (Barden et al., 2014). Im Gegensatz zum Transwell Assay, bei welchem beide Zelllinien einen ähnlichen Effekt der Behandlung aufweisen, zeigt die RME Zelllinie RD einen stärkeren Effekt der Behandlung auf die Kolonienbildung als die RMA Zelllinie RH30. Allerdings ist die Kolonienbildung im Gegensatz zur Migration nicht Calcium-abhängig.

Zudem verursachte die alleinige Inkubation mit BzATP in beiden Zelllinien eine signifikant verminderte Kolonienbildung im Gegensatz zur verstärkten Zellmigration unter BzATP. Dies könnte auf die im Vergleich zum Transwell Assay benötigte längere Behandlungsdauer (72 h) zurückzuführen sein. Eine derartige Abnahme der Kolonienbildung unter alleiniger BzATP-Behandlung nach 72 h könnte durch die von Gilbert et al. (2019) beschriebene Abnahme der Zellviabilität von 40 – 50 % unter BzATP erklärt werden. (Gilbert et al., 2019).

Des Weiteren weisen die RD Tumorzellen auch bei alleiniger Inkubation mit dem nf-P2X₇ Antikörper eine konzentrationsabhängige, signifikante Verminderung der Kolonienbildung im Gegensatz zum Transwell Assay auf. Dieser Effekt wurde in der RH30 Tumorzelllinie nicht beobachtet und zeigt, dass der nf-P2X₇ Rezeptor auch ohne das Vorhandensein von ATP signifikante Effekte erzielen kann.

Zusammenfassend beweisen alle drei funktionellen Assays (Calcium-Messung, Transwell Assay, CFA Assay) eine Wirksamkeit des nf-P2X₇ Antikörpers *in vitro*. Zudem zeigt sich ein stärkerer Effekt des nf-P2X₇ Antikörpers bei hoher ATP-Konzentration. Diese entspricht dabei der erhöhten ATP-Konzentration in der nächsten Umgebung von entartetem Gewebe (Gilbert et al., 2019, Roger et al., 2015, Gilbert et al., 2017) und lässt daher eine stärkere Wirksamkeit des nf-P2X₇ Antikörpers im Tumorgewebe vermuten. Außerdem zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die nachgewiesene Wirksamkeit des nf-P2X₇ Antikörpers nicht allein über eine Beeinflussung des Calciumhaushaltes begründet werden kann. Der Ca²⁺-Signalweg scheint daher ein möglicher, aber nicht essentieller Angriffspunkt des nf-P2X₇ Antikörper Effekts zu sein. Eine eindeutige Beantwortung des zugrunde liegenden Mechanismus, welcher den nf-P2X₇ Antikörper Effekt *in vitro* verursacht, ist in dieser Form nicht möglich und bedarf weiterer Untersuchungen. Auch in erwachsenen Tumorentitäten sind bislang keine nachgewiesenen Mechanismen veröffentlicht.

Im Fokus der durchgeführten funktionellen Assays lag der erstmalige Nachweis einer Wirkung der nf-P2X₇ Antikörper Applikation *in vitro* in kindlichen soliden Tumoren. Durch diese Arbeit lässt sich nun erstmals das mögliche therapeutische Potential des nf-P2X₇ Rezeptors in kindlichen soliden Tumoren unterstreichen. Dies bietet eine Grundlage und Argumentation für tiefergehende Analysen.

4.4 Limitation

Grundsätzlich lässt der P2X₇ Rezeptor mit seiner nicht funktionellen Variante, dem non-functional P2X₇ Rezeptor (nf-P2X₇), viele Fragen offen, welche sich insbesondere auf dessen Aufbau, Form und Funktion beziehen (Karasawa et al., 2017, Gilbert et al., 2019). Insbesondere ist es auch möglich, dass es sich beim nf-P2X₇ Rezeptor um eine heterotrimere Form bestehend aus Wildtyp und non-functional P2X₇ Untereinheiten handelt (Gilbert et al., 2019). Ein Beispiel einer heterotrimeren P2X₇ Form ist die gekürzte Splicevariante J, für welche ebenfalls eine fehlende große Porenbildung und Apoptoseinduktion beschrieben ist (Feng et al., 2006). Leider ermöglichen die nf-P2X₇ gerichteten Antikörper keine Differenzierung zwischen monomeren und trimeren Rezeptorformen (Barden and Gidley-Baird, 2010a).

Trotz der nachgewiesenen ubiquitären Expression von nf-P2X₇ auf einer Bandbreite von Tumoren (siehe Tab. 2 in 1.2.3) ist der kausale Pathomechanismus zur Ausbildung des nf-P2X₇ Rezeptors nicht bekannt (Lara et al., 2020). Dahingegen ist der durch hohe ATP-Konzentrationen induzierte Switch (siehe Abb. 9 in 1.2.3) vom Wildtyp P2X₇ in die nicht funktionelle Rezeptorvariante detailliert untersucht. Die höchste nf-P2X₇ Expression zeigte sich bei einmaliger Inkubation mit ATP nach 24 Stunden und fällt innerhalb von vier Tagen nahezu auf die anfänglichen Expressionslevel ab. Eine Untersuchung mit wiederholter ATP-Applikation gibt es aktuell nicht, sodass keine Rückschlüsse auf die nf-P2X₇ Expressionslevel bei andauernder Anwesenheit von ATP gezogen werden können, wie es insbesondere im Tumormikromilieu der Fall ist (Di Virgilio and Adinolfi, 2017, Di Virgilio et al., 2017, Gilbert et al., 2019, Morciano et al., 2017, Di Virgilio et al., 2018, Gilbert et al., 2017, Pellegatti et al., 2008).

Neben der Induzierung einer nf-P2X₇ Expression auf Tumorzellen spielt ATP als sensitives *danger associated molecular pattern* (DAMP) eine wichtige Rolle in der Modulation des Immunsystems im Tumormikromilieu (Allard et al., 2017, Gilbert et al., 2019, Cekic and Linden, 2016, Johnsen, 2019). Auch in der

klinischen Phase I Studie von Gilbert et al. (2017) zeigte sich bei allen mit nf-P2X₇ Antikörper behandelten entnommenen Tumorproben eine Inflammation mit einer Akkumulation von Lymphozyten in der nächsten Umgebung des Tumors (Gilbert et al., 2017). Der Nachweis einer lokalen Entzündungsreaktion bei topischer nf-P2X₇ Antikörper Applikation unterstützt die Hypothese des Einflusses von nf-P2X₇ auf die Regulation von Immunzellen im Tumormikromilieu. Trotzdem ist weder das Ausmaß noch der zugrunde liegende Mechanismus bekannt. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde bei der Untersuchung einer nf-P2X₇ antikörpervermittelten zellulären Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, kurz ADCC) keine immunologische Reaktion festgestellt. Die Modulation des Immunsystems durch nf-P2X₇ bedarf insbesondere im Hinblick auf eine klinische, systemische Anwendung von nf-P2X₇ Antikörpern weiterer Untersuchungen. Nicht zuletzt ist zu betonen, dass der Wirkmechanismus der nf-P2X₇ zielgerichteten Antikörper bislang ungeklärt ist, obwohl es vielfache Evidenzen für eine klinische Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* gibt (Barden et al., 2009, Barden et al., 2014, Barden et al., 2016, Gilbert et al., 2017, Gilbert et al., 2019).

Es liegt auf der Hand, dass die Ergebnisse der vorliegenden Forschungsarbeit sich auf *in vitro* Untersuchungen beschränken. Eine Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in zukünftigen *in vivo* Studien ist daher zwingend notwendig. Auch wurden in den bisherig veröffentlichten *in vivo* Studien lediglich erwachsene Tumorentitäten untersucht (Barden et al., 2016, Gilbert et al., 2017). Dabei ist die intravenöse nf-P2X₇ Applikation bislang nur im Mausmodell erfolgt (Barden et al., 2016), die topische Applikation in der einzigen veröffentlichte Phase I Studie beschränkte sich zeitlich auf 28 Tage (Gilbert et al., 2017). Zusammenfassend ist die aktuelle Datenlage nicht ausreichend, um eine fundierte Aussage über die Wirksamkeit einer systemischen nf-P2X₇ gerichteten Therapie im Patienten zu treffen. Da aber insbesondere die systemische Antikörpertherapie umfangreiche Möglichkeiten auch in der Behandlung kindlicher solider Tumoren bietet, sollte nach

gesicherter Wirksamkeit *in vivo* das Spektrum klinischer nf-P2X₇ Studien erweitert werden.

4.5 Ausblick

Der ursprüngliche P2X₇ Rezeptor Wildtyp erschwert aufgrund seiner heterogenen Expression auf diversen Tumoren sowie gesunden Zellen (siehe 1.2.2) die P2X₇ zielgerichtete Therapie maligner Erkrankungen (Di Virgilio and Adinolfi, 2017). Im Gegensatz dazu ist zu betonen, dass die fehlende Expression des nf-P2X₇ Rezeptors auf gesundem Gewebe sowie dessen ubiquitäre Expression auf diversen Tumorentitäten ideale Voraussetzungen für die Ansteuerung von entarteten Tumorzellen mithilfe des nf-P2X₇ Rezeptors bieten.

Die Exposition des Epitops E200 ermöglichte der Firma Biosceptre die Entwicklung einer Bandbreite an verschiedenen onkologischen, nf-P2X₇ zielgerichteten Therapeutika (Biosceptre international Limited, 2019c). Dabei könnte die zielgerichtete Ansteuerung maligner Zellen durch Antikörper eine Minimierung sog. *off-target* Effekte sowie eine höhere therapeutische Sicherheit, längere Wirksamkeit, niedrigere Dosis und geringere Toxizität ermöglichen (Constantinou et al., 2010, Chen et al., 2011, Barden et al., 2014, Barden et al., 2016, Danquah et al., 2016, Hutchings et al., 2019). Dies ist insbesondere bei der Behandlung pädiatrischer solider Tumoren ein hohes Ziel, welche bislang durch eminente Nebenwirkungen mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität verbunden ist (Dantonello et al., 2009). Zudem könnte eine spezifische Ansteuerung des soliden Tumors eine Minderung der erheblichen Spätfolgen der bisherigen Therapien fördern (Schmidt et al., 2018).

Während bislang in der zielgerichteten Therapie abhängig von der kindlichen Tumorentität verschiedene Zielstrukturen angesteuert werden, könnte der nf-P2X₇ Rezeptor auf Grundlage unserer nachgewiesenen ubiquitären

Expression auf kindlichen soliden Tumorentitäten ein universelles *Target* darstellen.

Zusätzlich zu den beschriebenen nf-P2X₇ zielgerichteten Antikörpern wurde von der Firma Biosceptre ein Vakzin (BIL06v) für die Therapie von soliden Tumoren entwickelt, welches aktuell bei Erwachsenen eine klinische Phase 1 Studie (Studiennummer: ACTRN12618000838213) in Australien durchläuft. Dabei handelt es sich um eine Konjugation an das Peptid E200, wodurch das Immunsystem selbst für eine nf-P2X₇ zielgerichtete Antikörper Produktion stimuliert wird. Neben geringeren Produktionskosten sind Vakzine vor allem aufgrund einer niedrigeren Dosierung und geringeren Toxizität von Vorteil (Biosceptre International Limited, 2019b, Oliphant et al., 2019, Lara et al., 2020). Der Einsatz des Vakzins BIL06v bei der Behandlung pädiatrischer solider Tumoren stellt somit ein mögliches, völlig neues Behandlungskonzept dar.

Neben den oben dargestellten Therapien mit nf-P2X₇ gerichteten Antikörpern sowie dem Einsatz von Vakzinen entwickelt Biosceptre weitere nf-P2X₇ zielgerichtete Therapiemodalitäten, wobei auch die CAR-T-Zelltherapie (chimäre Antigenrezeptor-T-Zelltherapie) eine Rolle spielt (Biosceptre international Limited, 2019c). Darüber hinaus wäre auch eine Markierung der nf-P2X₇ Antikörper mit Radioisotopen oder anderweitigen toxischen Komponenten denkbar (Fichna and Janecka, 2003, Hutchings et al., 2019). Dabei würde theoretisch durch die hohe spezifische Bindung von entarteten Zellen eine gezielte Ansteuerung und Freisetzung geringer Dosen ionisierender Strahlung im Tumorgewebe erreicht werden. Hierdurch könnte der nf-P2X₇ Rezeptor auch in der Immunszintigraphie oder Radioimmuntherapie Anwendung finden. Ein ähnlicher angewandter Mechanismus ist beispielsweise bei der Kopplung von meta-Iodobenzylguanidin (mIBG) mit radioaktivem Iod in der Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms bekannt (Hoefnagel et al., 1994, Lewington et al., 2017, Piccardo et al., 2019).

Gleichzeitig eröffnet der nf-P2X₇ Rezeptor neue weitreichende diagnostische Möglichkeiten. Durch seine spezifische Expression auf malignen Zellen könnte er ein neuer Ansatzpunkt für die Entwicklung eines diagnostischen Tumormarkers sein. In erster Linie steht aktuell die immunhistochemische Färbung unter Verwendung des diagnostischen nf-P2X₇ Antikörpers BPM09 im Vordergrund. Hierbei weisen diverse Tumorentitäten eine spezifische nf-P2X₇ Expression auf, wohingegen gesundes Gewebe keine Farbreaktion zeigt (Gilbert et al., 2019, Gilbert et al., 2017, Biosceptre International Limited, 2017, Barden et al., 2016, Barden et al., 2014, Barden et al., 2009, Slater et al., 2004a, Slater et al., 2004b). Besonders bei histologisch morphologisch unklaren Ergebnissen könnte die zusätzliche Verwendung einer immunhistochemischen nf-P2X₇ Antikörperfärbung die diagnostische Sensitivität und Spezifität von kindlichen soliden Tumoren optimieren und die Diagnosestellung beschleunigen. Darüber hinaus wird bei erwachsenen Tumorentitäten eine Differenzierung verschiedener Tumorstadien anhand unterschiedlicher nf-P2X₇ Expressionsmuster angenommen (Barden et al., 2016, Barden et al., 2014, Slater et al., 2003, Slater et al., 2004a, Slater et al., 2004b). Eine zusätzliche nf-P2X₇ Antikörperuntersuchung könnte somit eine neue, wichtige Erweiterung der aktuellen Krebsdiagnostik sein (Barden et al., 2014).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Behandlung insbesondere fortgeschrittener Stadien kindlicher solider Tumoren erfordert tiefergehende grundlagenwissenschaftliche Erkenntnisse für die Entwicklung neuer Behandlungskonzepte (Fuchs, 2012). Ein möglicher Angriffspunkt ist der purinerge P2X₇ Rezeptor, welcher auf Tumorzellen in einer nicht funktionellen Variante, genannt non-functional P2X₇ (nf-P2X₇) Rezeptor, vorliegt. Durch die Exposition eines spezifischen Epitops (E200) wurde über nf-P2X₇ zielgerichtete Antikörper der Firma Biosceptre eine ubiquitäre Überexpression von nf-P2X₇ auf einer Bandbreite erwachsener Tumorentitäten im Gegensatz zu gesunden Zellen nachgewiesen (Gilbert et al., 2019, Gilbert et al., 2017, Barden et al., 2016, Barden et al., 2014). In der vorliegenden Forschungsarbeit wurden zum ersten Mal extrakranielle, kindliche solide Tumoren hinsichtlich des nf-P2X₇ Rezeptors untersucht.

Es zeigte sich auch in kindlichen soliden Tumorentitäten eine vielfach höhere nf-P2X₇ Expression als in untersuchten benignen Zellen. In den durchflusszytometrischen Expressionsanalysen *in vitro* wurden Zelllinien verschiedener, kindlich solider Tumorentitäten untersucht: Alveoläres Rhabdomyosarkom, embryonales Rhabdomyosarkom, maligner Rhabdoid Tumor, hepatozelluläres Karzinom, Hepatoblastom, Neuroblastom, Ewing-Sarkom und Osteosarkom. Dabei erwiesen sich alle untersuchten malignen Zelllinien als nf-P2X₇ positiv und zeigten im Gegensatz zu gesunden Zelllinien eine vielfach höhere mediane Fluoreszenzintensität. Diesen Ergebnissen schlossen sich immunhistochemische Färbungen an, welche in über 95 % der Tumorproben von Rhabdomyosarkom, Neuroblastom, Wilms-Tumor, Hepatoblastom und hepatozellulärem Karzinom eine Expression des nf-P2X₇ Rezeptor aufwiesen. Zudem zeigte sich keine Farbreaktion in gesundem Gewebe und nekrotischen Arealen.

In der aktuellen Literatur werden für den nf-P2X₇ Rezeptor neben seiner ubiquitären Expression auf malignen adulten Tumorzellen auch essentielle Eigenschaften für deren Überleben beschrieben (Gilbert et al., 2019). Auch

zeigen sich in einer klinischen Phase I Studie bei erwachsenen Patienten mit Basalzellkarzinom erste klinische Hinweise auf die Wirksamkeit einer topischen nf-P2X₇ Antikörper Applikation (Gilbert et al., 2017). Daran anknüpfend wurden als Vertreter für kindliche solide Tumoren die beiden Rhabdomyosarkom (RMS) Zelllinien RD (alveoläres RMS) und RH30 (embryonales RMS) unter nf-P2X₇ Antikörper Applikation in funktionellen Assays untersucht.

Während bei RH30 Zellen kein signifikanter Einfluss der nf-P2X₇ Antikörper auf den Calciumhaushalt nachgewiesen wurde, zeigte sich bei RD Zellen eine signifikante Abnahme der maximalen Calcium-Einstromgeschwindigkeit (*slope*) sowie der maximalen intrazellulären Calcium-Konzentration (*peak*). Gleichzeitig wurde in beiden Zelllinien (RD und RH30) eine signifikant verminderte Kolonienbildung und Migration durch nf-P2X₇ Antikörper Applikation unter hohen ATP-Konzentrationen festgestellt. Insgesamt geben die funktionellen Assays Hinweise auf eine Wirksamkeit der nf-P2X₇ Antikörper Applikation in kindlichen soliden Tumoren *in vitro*, wobei der zugrunde liegende Mechanismus nicht allein auf die Beeinflussung des Calciumhaushaltes zurückgeführt werden kann. Zudem zeigten sich die Effekte unter der von Gilbert et al. (2019) beschriebenen hohen ATP-Konzentration, welche die Expression des nf-P2X₇ Rezeptors auf Tumorzellen stimuliert (Gilbert et al., 2019).

Die vorliegende Forschungsarbeit zeigt erstmalig das Vorhandensein eines in kindlichen soliden Tumorentitäten übergreifenden spezifischen Targets. Unsere Untersuchungen bestätigen dabei die bislang in erwachsenen Tumorentitäten dargestellten Vorteile des nf-P2X₇ Rezeptors auch in kindlichen soliden Tumoren. Der nf-P2X₇ Rezeptor bietet daher mit seinem Epitop E200 sowie seiner spezifischen Expression auf malignen Zellen eine neue Grundlage für sowohl diagnostische als auch therapeutische Optionen für kindliche solide Tumoren. Weitergehende Studien zur tieferen Analyse der Bedeutung des nf-P2X₇ Rezeptors in kindlichen soliden Tumoren erscheinen auf der Basis dieser Forschungsarbeit gerechtfertigt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ABBRACCHIO, M. P. & BURNSTOCK, G. 1998. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol*, 78, 113-45.
- ADINOLFI, E., CALLEGARI, M. G., FERRARI, D., BOLOGNESI, C., MINELLI, M., WIECKOWSKI, M. R., PINTON, P., RIZZUTO, R. & DI VIRGILIO, F. 2005. Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol Biol Cell*, 16, 3260-72.
- ADINOLFI, E., CIRILLO, M., WOLTERS DORF, R., FALZONI, S., CHIOZZI, P., PELLEGATTI, P., CALLEGARI, M. G., SANDONA, D., MARKWARDT, F., SCHMALZING, G. & DI VIRGILIO, F. 2010. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J*, 24, 3393-404.
- ADINOLFI, E., RAFFAGHELLO, L., GIULIANI, A. L., CAVAZZINI, L., CAPECE, M., CHIOZZI, P., BIANCHI, G., KROEMER, G., PISTOIA, V. & DI VIRGILIO, F. 2012. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res*, 72, 2957-69.
- ADRIOUCH, S., BANNAS, P., SCHWARZ, N., FLIEGERT, R., GUSE, A. H., SEMAN, M., HAAG, F. & KOCH-NOLTE, F. 2008. ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *FASEB J*, 22, 861-9.
- AGTERESCH, H. J., DAGNELIE, P. C., VAN DEN BERG, J. W. & WILSON, J. H. 1999. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs*, 58, 211-32.
- ALLARD, B., LONGHI, M. S., ROBSON, S. C. & STAGG, J. 2017. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev*, 276, 121-144.
- ALLEN-RHOADES, W., WHITTLE, S. B. & RAINUSSO, N. 2018. Pediatric Solid Tumors of Infancy: An Overview. *Pediatr Rev*, 39, 57-67.
- ALLSOPP, R. C. & EVANS, R. J. 2011. The intracellular amino terminus plays a dominant role in desensitization of ATP-gated P2X receptor ion channels. *J Biol Chem*, 286, 44691-701.
- ALLSOPP, R. C., FARMER, L. K., FRYATT, A. G. & EVANS, R. J. 2013. P2X receptor chimeras highlight roles of the amino terminus to partial agonist efficacy, the carboxyl terminus to recovery from desensitization, and independent regulation of channel transitions. *J Biol Chem*, 288, 21412-21.
- ALVES, L. A., DE MELO REIS, R. A., DE SOUZA, C. A., DE FREITAS, M. S., TEIXEIRA, P. C., NETO MOREIRA FERREIRA, D. & XAVIER, R. F. 2014. The P2X7 receptor: shifting from a low- to a high-conductance channel - an enigmatic phenomenon? *Biochim Biophys Acta*, 1838, 2578-87.
- AMER, K. M., THOMSON, J. E., CONGIUSTA, D., DOBITSCH, A., CHAUDHRY, A., LI, M., CHAUDHRY, A., BOZZO, A., SIRACUSE, B., AYTEKIN, M. N., GHERT, M. & BEEBE, K. S. 2019. Epidemiology, Incidence, and Survival of Rhabdomyosarcoma Subtypes: SEER and ICES Database Analysis. *J Orthop Res*, 37, 2226-2230.

- AMOROSO, F., CAPECE, M., ROTONDO, A., CANGELOSI, D., FERRACIN, M., FRANCESCHINI, A., RAFFAGHELLO, L., PISTOIA, V., VARESIO, L. & ADINOLFI, E. 2015. The P2X7 receptor is a key modulator of the PI3K/GSK3beta/VEGF signaling network: evidence in experimental neuroblastoma. *Oncogene*, 34, 5240-51.
- ASCHRAFI, A., SADTLER, S., NICULESCU, C., RETTINGER, J. & SCHMALZING, G. 2004. Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *J Mol Biol*, 342, 333-43.
- BARDEN, J. A., BREWIS, N., JONES, P. & GRANT, S. 2015. Anti-P2X7 receptor antibodies and fragments thereof. Patent US9,127,059 B2.
- BARDEN, J. A. & GIDLEY BAIRD, A. 2008. Antibodies to non-functional P2X7 receptor. Patent US7,326,415 B2.
- BARDEN, J. A. & GIDLEY-BAIRD, A. 2010a. Anti-P2X7 peptides and epitopes. Patent WO2010/000041 A1.
- BARDEN, J. A. & GIDLEY-BAIRD, A. 2010b. Hybridomas producing antibodies against non functional p2x7 receptor. Patent US2010/0105068 A1.
- BARDEN, J. A., GIDLEY-BAIRD, A., ARMSTRONG, A., BEAN, P., PILKINGTON, G., SEMPFF, F., TEH, L. C., YUKSEL, A., HUYNH, V., PEDERSEN, J., SCOTT LUSIA, M. & VAN BOKHOVEN, A. 2009. Evaluation of Non-Functional P2X7 receptor as an effective pan cancer therapeutic and diagnostik Target *Proc Am Assoc Cancer Res; 2009 Apr 18-22; Denver, CO. Philadelphia (PA): AACR; 2009. Abstract nr LB-153, 69.*
- BARDEN, J. A., GIDLEY-BAIRD, A., TEH, L. C., RAJASEKARIAH, G., PEDERSEN, J., CHRISTENSEN, N. I., SPIELMAN, D. & DAVID M ASHLEY, D. M. 2016. Therapeutic Targeting of the Cancer-Specific Cell Surface Biomarker nP2X7. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 7.
- BARDEN, J. A., SLUYTER, R., GU, B. J. & WILEY, J. S. 2003. Specific detection of non-functional human P2X7receptors in HEK293 cells and B-lymphocytes. *FEBS Letters*, 538, 159-162.
- BARDEN, J. A., YUKSEL, A., PEDERSEN, J., DANIELETTO, S. & DELPRADO, W. 2014. Non-Functional P2X7: A Novel and Ubiquitous Target in Human Cancer. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 05.
- BARRERA, N. P., ORMOND, S. J., HENDERSON, R. M., MURRELL-LAGNADO, R. D. & EDWARDSON, J. M. 2005. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem*, 280, 10759-65.
- BARTELHEIM, K., NEMES, K., SEERINGER, A., KERL, K., BUECHNER, J., BOOS, J., GRAF, N., DURKEN, M., GERSS, J., HASSELBLATT, M., KORTMANN, R. D., TEICHERT VON LUETTICHAU, I., NAGEL, I., NYGAARD, R., OYEN, F., QUIROGA, E., SCHLEGEL, P. G., SCHMID, I., SCHNEPPENHEIM, R., SIEBERT, R., SOLANO-PAEZ, P., TIMMERMANN, B., WARMUTH-METZ, M. & FRUHWALD, M. C. 2016. Improved 6-year overall survival in AT/RT - results of the registry study Rhabdoid 2007. *Cancer Med*, 5, 1765-75.

- BECCHETTI, A. & ARCANGELI, A. 2010. Integrins and ion channels in cell migration: implications for neuronal development, wound healing and metastatic spread. *Adv Exp Med Biol*, 674, 107-23.
- BIOSEPTRE INTERNATIONAL LIMITED. 2017. *Immuno-Oncology Platform targeting nfp2X7: A Broadly Occurring and High Specificity Cancer Target* [Online]. Available: http://www.biosceptre.com/wp-content/uploads/2017/04/Romain_Lara_Biosceptre_Belgrade_March_2017-compressed.pdf [Accessed 22 May 2019].
- BIOSEPTRE INTERNATIONAL LIMITED. 2019a. *About BIL03s* [Online]. Available: <https://www.biosceptre.com/systemic/> [Accessed 21 Nov 2019].
- BIOSEPTRE INTERNATIONAL LIMITED. 2019b. *About BIL06v - A peptide protein conjugate vaccine targeting solid and haematological tumours* [Online]. Available: <https://www.biosceptre.com/vaccine/> [Accessed 19 Nov 2019].
- BIOSEPTRE INTERNATIONAL LIMITED. 2019c. *Pipeline* [Online]. Available: <https://www.biosceptre.com/pipeline/> [Accessed 19 Nov 2019].
- BOUE-GRABOT, E., ARCHAMBAULT, V. & SEQUELA, P. 2000. A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J Biol Chem*, 275, 10190-5.
- BOUMECHACHE, M., MASIN, M., EDWARDSON, J. M., GORECKI, D. C. & MURRELL-LAGNADO, R. 2009. Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells. *J Biol Chem*, 284, 13446-54.
- BRAKE, A. J., WAGENBACH, M. J. & JULIUS, D. 1994. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*, 371, 519-23.
- BRANDAO-BURCH, A., KEY, M. L., PATEL, J. J., ARNETT, T. R. & ORRISS, I. R. 2012. The P2X7 Receptor is an Important Regulator of Extracellular ATP Levels. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3, 41.
- BROWNE, L. E., JIANG, L. H. & NORTH, R. A. 2010. New structure enlivens interest in P2X receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 31, 229-37.
- BURNSTOCK, G. 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, 24, 509-81.
- BURNSTOCK, G. 1978. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. . *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*, pp. 107 – 118.
- BURNSTOCK, G. 2006. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev*, 58, 58-86.
- BURNSTOCK, G. 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, 64, 1471-83.

- BURNSTOCK, G. & DI VIRGILIO, F. 2013. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal*, 9, 491-540.
- BURNSTOCK, G. & KNIGHT, G. E. 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol*, 240, 31-304.
- BURNSTOCK, G. A., MP. 1994. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?
- CEKIC, C. & LINDEN, J. 2016. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 16, 177-92.
- CHEEWATRAKOOLPONG, B., GILCHREST, H., ANTHES, J. C. & GREENFEDER, S. 2005. Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun*, 332, 17-27.
- CHEN, C., CONSTANTINOU, A. & DEONARAIN, M. 2011. Modulating antibody pharmacokinetics using hydrophilic polymers. *Expert Opin Drug Deliv*, 8, 1221-36.
- CHEN, H. C. 2005. Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol*, 294, 15-22.
- COLLO, G., NEIDHART, S., KAWASHIMA, E., KOSCO-VILBOIS, M., NORTH, R. A. & BUELL, G. 1997. Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, 36, 1277-83.
- COMPAN, V., ULMANN, L., STELMASHENKO, O., CHEMIN, J., CHAUMONT, S. & RASSENDREN, F. 2012. P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *J Neurosci*, 32, 4284-96.
- CONSTANTINOU, A., CHEN, C. & DEONARAIN, M. P. 2010. Modulating the pharmacokinetics of therapeutic antibodies. *Biotechnol Lett*, 32, 609-22.
- COSSARIZZA, A., CHANG, H. D., RADBRUCH, A., AKDIS, M., ANDRA, I., ANNUNZIATO, F., BACHER, P., BARNABA, V., BATTISTINI, L., BAUER, W. M., BAUMGART, S., BECHER, B., BEISKER, W., BEREK, C., BLANCO, A., BORSELLINO, G., BOULAIS, P. E., BRINKMAN, R. R., BUSCHER, M., BUSCH, D. H., BUSHNELL, T. P., CAO, X., CAVANI, A., CHATTOPADHYAY, P. K., CHENG, Q., CHOW, S., CLERICI, M., COOKE, A., COSMA, A., COSMI, L., CUMANO, A., DANG, V. D., DAVIES, D., DE BIASI, S., DEL ZOTTO, G., DELLA BELLA, S., DELLABONA, P., DENIZ, G., DESSING, M., DIEFENBACH, A., DI SANTO, J., DIELI, F., DOLF, A., DONNENBERG, V. S., DORNER, T., EHRHARDT, G. R. A., ENDL, E., ENGEL, P., ENGELHARDT, B., ESSER, C., EVERTS, B., DREHER, A., FALK, C. S., FEHNIGER, T. A., FILBY, A., FILLATREAU, S., FOLLO, M., FORSTER, I., FOSTER, J., FOULDS, G. A., FRENETTE, P. S., GALBRAITH, D., GARBI, N., GARCIA-GODOY, M. D., GEGINAT, J., GHORESCHI, K., GIBELLINI, L., GOETTLINGER, C., GOODYEAR, C. S., GORI, A., GROGAN, J., GROSS, M., GRUTZKAU, A., GRUMMITT, D., HAHN, J., HAMMER, Q., HAUSER, A. E., HAVILAND, D. L., HEDLEY, D., HERRERA, G., HERRMANN, M., HIEPE, F., HOLLAND, T., HOMBRINK, P., HOUSTON, J. P., HOYER, B. F., HUANG, B., HUNTER, C. A., IANNONE, A., JACK, H. M., JAVEGA, B., JONJIC, S., JUELKE, K., JUNG, S., KAISER, T., KALINA, T., KELLER, B., KHAN, S., KIENHOFER, D., KRONEIS, T., et al. 2017. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*, 47, 1584-1797.

- DANQUAH, W., MEYER-SCHWESINGER, C., RISSIEK, B., PINTO, C., SERRACANT-PRAT, A., AMADI, M., IACENDA, D., KNOP, J. H., HAMMEL, A., BERGMANN, P., SCHWARZ, N., ASSUNCAO, J., ROTTHIER, W., HAAG, F., TOLOSA, E., BANNAS, P., BOUE-GRABOT, E., MAGNUS, T., LAEREMANS, T., STORTELERS, C. & KOCH-NOLTE, F. 2016. Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med*, 8, 366ra162.
- DANTONELLO, T. M., INT-VEEN, C., HARMS, D., LEUSCHNER, I., SCHMIDT, B. F., HERBST, M., JUERGENS, H., SCHEEL-WALTER, H. G., BIELACK, S. S., KLINGEBIEL, T., DICKERHOFF, R., KIRSCH, S., BRECHT, I., SCHMELZLE, R., GREULICH, M., GADNER, H., GREINER, J., MARKY, I., TREUNER, J. & KOSCIELNIAK, E. 2009. Cooperative trial CWS-91 for localized soft tissue sarcoma in children, adolescents, and young adults. *J Clin Oncol*, 27, 1446-55.
- DEUTSCHES KINDERKREBSREGISTER. 2018. *Jahresbericht / Annual Report 2018* [Online]. Available: http://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure_downloads/22605/0/2df4719687ba2596d4216218a4f4632763b64847/jb2018s.pdf [Accessed 30 Sep 2019].
- DI VIRGILIO, F. 1995. The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today*, 16, 524-8.
- DI VIRGILIO, F. 2012. Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res*, 72, 5441-7.
- DI VIRGILIO, F. & ADINOLFI, E. 2017. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*, 36, 293-303.
- DI VIRGILIO, F., DAL BEN, D., SARTI, A. C., GIULIANI, A. L. & FALZONI, S. 2017. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*, 47, 15-31.
- DI VIRGILIO, F., FERRARI, D. & ADINOLFI, E. 2009. P2X(7): a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signal*, 5, 251-6.
- DI VIRGILIO, F., SCHMALZING, G. & MARKWARDT, F. 2018. The Elusive P2X7 Macropore. *Trends Cell Biol*, 28, 392-404.
- EGAN, T. M. & KHAKH, B. S. 2004. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci*, 24, 3413-20.
- ELTZSCHIG, H. K., SITKOVSKY, M. V. & ROBSON, S. C. 2012. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med*, 367, 2322-33.
- EVANS, R. J., LEWIS, C., VIRGINIO, C., LUNDSTROM, K., BUELL, G., SURPRENANT, A. & NORTH, R. A. 1996. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol*, 497 (Pt 2), 413-22.
- FENG, Y. H., LI, X., WANG, L., ZHOU, L. & GORODESKI, G. I. 2006. A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem*, 281, 17228-37.

- FERRARI, S., LUKSCH, R., HALL, K. S., FAGIOLI, F., PRETE, A., TAMBURINI, A., TIENGI, A., DIGIROLAMO, S., PAIOLI, A., ABATE, M. E., PODDA, M., CAMMELLI, S., ERIKSSON, M. & BRACH DEL PREVER, A. 2015. Post-relapse survival in patients with Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 62, 994-9.
- FICHNA, J. & JANECKA, A. 2003. Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging. *Bioconjug Chem*, 14, 3-17.
- FORRESTER, T. 1972. An estimate of adenosine triphosphate release into the venous effluent from exercising human forearm muscle. *J Physiol*, 224, 611-28.
- FRANKEN, N. A., RODERMOND, H. M., STAP, J., HAVEMAN, J. & VAN BREE, C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1, 2315-9.
- FRANZEN, R. & TOIS, J. 2003. Purine and sugar chemistry on solid phase--100 years after the Emil Fischer's Chemistry Nobel Prize 1902. *Comb Chem High Throughput Screen*, 6, 433-44.
- FUCHS, J. 2012. *Solide Tumoren im Kindesalter: Grundlagen - Diagnostik - Therapie*; Schattauer Verlag; ISBN: 3794527860.
- FULLER, S. J., STOKES, L., SKARRATT, K. K., GU, B. J. & WILEY, J. S. 2009. Genetics of the P2X7 receptor and human disease. *Purinergic Signal*, 5, 257-62.
- GALLUZZI, L., BUQUE, A., KEPP, O., ZITVOGEL, L. & KROEMER, G. 2017. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol*, 17, 97-111.
- GESELLSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE ONKOLOGIE UND HÄMATOLOGIE. 2004. *NB2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma* [Online]. Available: https://www.kinderkrebsinfo.de/e1676/e9032/e68518/e206421/download7673/NB_2004_1.00_komprimiert__ger.pdf [Accessed 06 Sep 2019].
- GESELLSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE ONKOLOGIE UND HÄMATOLOGIE. 2007. *Therapieoptimierungsstudie zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit einem Nephroblastom, SIOP 2001 / GPOH* [Online]. Available: https://www.kinderkrebsinfo.de/e1676/e9032/e1758/e5370/download38301/2007_01_01_SIOP2001_Protokoll_ger.pdf [Accessed 12 Sep 2019].
- GESELLSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE ONKOLOGIE UND HÄMATOLOGIE. 2010. *AWMF 025/005, Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Osteosarkome* [Online]. Available: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/025-005.html> [Accessed 15 April 2020].
- GESELLSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE ONKOLOGIE UND HÄMATOLOGIE. 2014. *025-006 – S1-Leitlinie:Ewing-Sarkome des Kindes- und Jugendalters* [Online]. Available: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/025-006.html> [Accessed 15 April 2020].

- GESELLSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE ONKOLOGIE UND HÄMATOLOGIE. 2016. *S1-Leitlinie 025/011: Hepatoblastom* [Online]. Available: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/025-011.html> [Accessed 15. April 2020].
- GESELLSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE ONKOLOGIE UND HÄMATOLOGIE. 2019. *S1-Leitlinie 025-008 Neuroblastom* [Online]. Available: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/025-008.html> [Accessed 15 April 2020].
- GHALALI, A., WIKLUND, F., ZHENG, H., STENIUS, U. & HOGBERG, J. 2014. Atorvastatin prevents ATP-driven invasiveness via P2X7 and EHBP1 signaling in PTEN-expressing prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 35, 1547-55.
- GIDLEY-BAIRD A, B. J. 2003. Antibodies to Non-Functional P2X7 Receptor, Diagnosis and Treatment of Cancers and Other Conditions. Patent WO2003020762 A1.
- GILBERT, S. M., GIDLEY BAIRD, A., GLAZER, S., BARDEN, J. A., GLAZER, A., TEH, L. C. & KING, J. 2017. A phase I clinical trial demonstrates that nfP2X7 -targeted antibodies provide a novel, safe and tolerable topical therapy for basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*, 177, 117-124.
- GILBERT, S. M., OLIPHANT, C. J., HASSAN, S., PEILLE, A. L., BRONSERT, P., FALZONI, S., DI VIRGILIO, F., MCNULTY, S. & LARA, R. 2019. ATP in the tumour microenvironment drives expression of nfP2X7, a key mediator of cancer cell survival. *Oncogene*, 38, 194-208.
- GINIATULLIN, R. & NISTRİ, A. 2013. Desensitization properties of P2X3 receptors shaping pain signaling. *Front Cell Neurosci*, 7, 245.
- GIULIANI, A. L., COLOGNESI, D., RICCO, T., RONCATO, C., CAPECE, M., AMOROSO, F., WANG, Q. G., DE MARCHI, E., GARTLAND, A., DI VIRGILIO, F. & ADINOLFI, E. 2014. Trophic activity of human P2X7 receptor isoforms A and B in osteosarcoma. *PLoS One*, 9, e107224.
- GORDON, J. L. 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J*, 233, 309-19.
- GRIFFITHS, G. & MILSTEIN, C. 1985. In: *Hybridoma technology in the biosciences and medicine*, ed. T., S. New York: Plenum Publishing Corp, 1985. p 103-115.
- GU, B. J., RATHSAM, C., STOKES, L., MCGEACHIE, A. B. & WILEY, J. S. 2009. Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X(7) complex: this dissociation regulates P2X(7) pore formation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297, C430-9.
- GU, B. J., ZHANG, W., WORTHINGTON, R. A., SLUYTER, R., DAO-UNG, P., PETROU, S., BARDEN, J. A. & WILEY, J. S. 2001. A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem*, 276, 11135-42.
- GU, B. J., ZHANG, W. Y., BENDALL, L. J., CHESSELL, I. P., BUELL, G. N. & WILEY, J. S. 2000. Expression of P2X(7) purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: evidence for nonfunctional P2X(7) receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C1189-97.

- GUO, C., MASIN, M., QURESHI, O. S. & MURRELL-LAGNADO, R. D. 2007. Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol*, 72, 1447-56.
- HABERMACHER, C., DUNNING, K., CHATAIGNEAU, T. & GRUTTER, T. 2016. Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology*, 104, 18-30.
- HARKAT, M., PEVERINI, L., CERDAN, A. H., DUNNING, K., BEUDEZ, J., MARTZ, A., CALIMET, N., SPECHT, A., CECCHINI, M., CHATAIGNEAU, T. & GRUTTER, T. 2017. On the permeation of large organic cations through the pore of ATP-gated P2X receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E3786-E3795.
- HATTORI, M. & GOUAUX, E. 2012. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature*, 485, 207-12.
- HAUSMANN, R., KLESS, A. & SCHMALZING, G. 2015. Key sites for P2X receptor function and multimerization: overview of mutagenesis studies on a structural basis. *Curr Med Chem*, 22, 799-818.
- HAWLEY, T. S. & HAWLEY, R. G. 2004. *Flow Cytometry Protocol*
- HEIZMANN, C. W. & COX, J. A. 1998. New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biometals*, 11, 383-97.
- HIBELL, A. D., KIDD, E. J., CHESSELL, I. P., HUMPHREY, P. P. & MICHEL, A. D. 2000. Apparent species differences in the kinetic properties of P2X(7) receptors. *Br J Pharmacol*, 130, 167-73.
- HINSON, A. R., JONES, R., CROSE, L. E., BELYEA, B. C., BARR, F. G. & LINARDIC, C. M. 2013. Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front Oncol*, 3, 183.
- HOEFNAGEL, C. A., DE KRAKER, J., VALDES OLMOS, R. A. & VOUTE, P. A. 1994. 131I-MIBG as a first-line treatment in high-risk neuroblastoma patients. *Nucl Med Commun*, 15, 712-7.
- HUDSON, M. M., LINK, M. P. & SIMONE, J. V. 2014. Milestones in the curability of pediatric cancers. *J Clin Oncol*, 32, 2391-7.
- HUTCHINGS, C. J., COLUSSI, P. & CLARK, T. G. 2019. Ion channels as therapeutic antibody targets. *MAbs*, 11, 265-296.
- JELASSI, B., CHANTOME, A., ALCARAZ-PEREZ, F., BAROJA-MAZO, A., CAYUELA, M. L., PELEGRIN, P., SURPRENANT, A. & ROGER, S. 2011. P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. *Oncogene*, 30, 2108-22.
- JIANG, R., TALY, A. & GRUTTER, T. 2013. Moving through the gate in ATP-activated P2X receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, 38.

- JOHNSEN, B. K., K.E.; NADER, S.; SCHNEIDER, E.; NICOLA, J.A.; FLIEGERT, R.; WOLF, I.M.A.; GUSE, A.H.; NIKOLAEV, V.O.; KOCH-NOLTE, F.; HAAG, F. 2019. P2X7-mediated ATP secretion is accompanied by depletion of cytosolic ATP.
- KACZMAREK-HAJEK, K., LORINCZI, E., HAUSMANN, R. & NICKE, A. 2012. Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal*, 8, 375-417.
- KANG, M. H., SMITH, M. A., MORTON, C. L., KESHELAVA, N., HOUGHTON, P. J. & REYNOLDS, C. P. 2011. National Cancer Institute pediatric preclinical testing program: model description for in vitro cytotoxicity testing. *Pediatr Blood Cancer*, 56, 239-49.
- KARASAWA, A. & KAWATE, T. 2016. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *Elife*, 5.
- KARASAWA, A., MICHALSKI, K., MIKHELZON, P. & KAWATE, T. 2017. The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition. *Elife*, 6.
- KATZENSTEIN, H. M., KRAILO, M. D., MALOGOLOWKIN, M. H., ORTEGA, J. A., LIU-MARES, W., DOUGLASS, E. C., FEUSNER, J. H., REYNOLDS, M., QUINN, J. J., NEWMAN, K., FINEGOLD, M. J., HAAS, J. E., SENSEL, M. G., CASTLEBERRY, R. P. & BOWMAN, L. C. 2002. Hepatocellular carcinoma in children and adolescents: results from the Pediatric Oncology Group and the Children's Cancer Group intergroup study. *J Clin Oncol*, 20, 2789-97.
- KAWATE, T., MICHEL, J. C., BIRDSONG, W. T. & GOUAUX, E. 2009. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature*, 460, 592-8.
- KHAKH, B. S. & LESTER, H. A. 1999. Dynamic selectivity filters in ion channels. *Neuron*, 23, 653-8.
- KHAKH, B. S. & NORTH, R. A. 2012. Neuromodulation by Extracellular ATP and P2X Receptors in the CNS. *Neuron*, 76, 51-69.
- KHANNA, R. & VERMA, S. K. 2018. Pediatric hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 24, 3980-3999.
- KIM, M., JIANG, L. H., WILSON, H. L., NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. 2001. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J*, 20, 6347-58.
- KINNAMON, S. C. & FINGER, T. E. 2013. A taste for ATP: neurotransmission in taste buds. *Front Cell Neurosci*, 7, 264.
- KUNZLI, B. M., BERBERAT, P. O., GIESE, T., CSIZMADIA, E., KACZMAREK, E., BAKER, C., HALACELI, I., BUCHLER, M. W., FRIESS, H. & ROBSON, S. C. 2007. Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, G223-30.

- KWON, J. H., NAM, E. S., SHIN, H. S., CHO, S. J., PARK, H. R. & KWON, M. J. 2014. P2X7 Receptor Expression in Coexistence of Papillary Thyroid Carcinoma with Hashimoto's Thyroiditis. *Korean J Pathol*, 48, 30-5.
- LALO, U., VERKHRATSKY, A., BURNSTOCK, G. & PANKRATOV, Y. 2012. P2X receptor-mediated synaptic transmission. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 1.
- LARA, R., ADINOLFI, E., HARWOOD, C., PHILPOTT, M., BARDEN, J., DI VIRGILIO, F. & MCNULTY, S. 2020. P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Frontiers in Pharmacology*, 11:793.
- LEARY, S. E., WOZNIAK, A. W., BILLUPS, C. A., WU, J., MCPHERSON, V., NEEL, M. D., RAO, B. N. & DAW, N. C. 2013. Survival of pediatric patients after relapsed osteosarcoma: the St. Jude Children's Research Hospital experience. *Cancer*, 119, 2645-53.
- LEE, J. A. 2018. Solid Tumors in Children and Adolescents. *J Korean Med Sci*, 33, e269.
- LENERTZ, L. Y., WANG, Z., GUADARRAMA, A., HILL, L. M., GAVALA, M. L. & BERTICS, P. J. 2010. Mutation of putative N-linked glycosylation sites on the human nucleotide receptor P2X7 reveals a key residue important for receptor function. *Biochemistry*, 49, 4611-9.
- LEWINGTON, V., LAMBERT, B., POETSCHGER, U., SEVER, Z. B., GIAMMARILE, F., MCEWAN, A. J. B., CASTELLANI, R., LYNCH, T., SHULKIN, B., DROBICS, M., STAUDENHERZ, A. & LADENSTEIN, R. 2017. (123)I-mIBG scintigraphy in neuroblastoma: development of a SIOPEX semi-quantitative reporting method by an international panel. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 44, 234-241.
- LEWIS, J. J. & BENEDETTI, F. 1997. Adjuvant therapy for soft tissue sarcomas. *Surg Oncol Clin N Am*, 6, 847-62.
- MANSOOR, S. E., LU, W., OOSTERHEERT, W., SHEKHAR, M., TAJKHORSHID, E. & GOUAUX, E. 2016. X-ray structures define human P2X(3) receptor gating cycle and antagonist action. *Nature*, 538, 66-71.
- MARRON, J. M., DUBOIS, S. G., GLADE BENDER, J., KIM, A., CROMPTON, B. D., MEYER, S. C., JANEWAY, K. A. & MACK, J. W. 2016. Patient/parent perspectives on genomic tumor profiling of pediatric solid tumors: The Individualized Cancer Therapy (iCat) experience. *Pediatr Blood Cancer*, 63, 1974-82.
- MCALLISTER, R. M., MELNYK, J., FINKELSTEIN, J. Z., ADAMS, E. C., JR. & GARDNER, M. B. 1969. Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer*, 24, 520-6.
- MORCIANO, G., SARTI, A. C., MARCHI, S., MISSIROLI, S., FALZONI, S., RAFFAGHELLO, L., PISTOIA, V., GIORGI, C., DI VIRGILIO, F. & PINTON, P. 2017. Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. *Nat Protoc*, 12, 1542-1562.
- MOSSE, Y. P., LAUDENSLAGER, M., LONGO, L., COLE, K. A., WOOD, A., ATTIYEH, E. F., LAQUAGLIA, M. J., SENNETT, R., LYNCH, J. E., PERRI, P., LAUREYS, G., SPELEMAN, F.,

- KIM, C., HOU, C., HAKONARSON, H., TORKAMANI, A., SCHORK, N. J., BRODEUR, G. M., TONINI, G. P., RAPPAPORT, E., DEVOTO, M. & MARIS, J. M. 2008. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*, 455, 930-5.
- NICKE, A., BAUMERT, H. G., RETTINGER, J., EICHELE, A., LAMBRECHT, G., MUTSCHLER, E. & SCHMALZING, G. 1998. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J*, 17, 3016-28.
- NICKE, A., RETTINGER, J. & SCHMALZING, G. 2003. Monomeric and dimeric byproducts are the principal functional elements of higher order P2X1 concatamers. *Mol Pharmacol*, 63, 243-52.
- NORTH, R. A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 82, 1013-67.
- NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. 2000. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 563-80.
- NUTTLE, L. C. & DUBYAK, G. R. 1994. Differential activation of cation channels and non-selective pores by macrophage P2z purinergic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, 269, 13988-96.
- OBERLIN, O., REY, A., LYDEN, E., BISOGNO, G., STEVENS, M. C., MEYER, W. H., CARLI, M. & ANDERSON, J. R. 2008. Prognostic factors in metastatic rhabdomyosarcomas: results of a pooled analysis from United States and European cooperative groups. *J Clin Oncol*, 26, 2384-9.
- OLIPHANT, C. J., FREEMAN, E., GILBERT, S. M., LARA, R., HUANG, E., BARDEN, J. A. & MCNULTY, S. 2019. BIL06v immunizations generate antibodies specific for non-functional P2X7 (nfP2X7) that target solid tumors in vivo [abstract]. *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019; 2019 Mar 29-Apr 3; Atlanta, GA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2019;79(13 Suppl):Abstract nr LB-201.*
- ORRENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B. & NICOTERA, P. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 552-65.
- PELEGRIN, P. 2011. Many ways to dilate the P2X7 receptor pore. *Br J Pharmacol*, 163, 908-11.
- PELLEGATTI, P., RAFFAGHELLO, L., BIANCHI, G., PICCARDI, F., PISTOIA, V. & DI VIRGILIO, F. 2008. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One*, 3, e2599.
- PEVERINI, L., BEUDEZ, J., DUNNING, K., CHATAIGNEAU, T. & GRUTTER, T. 2018. New Insights Into Permeation of Large Cations Through ATP-Gated P2X Receptors. *Front Mol Neurosci*, 11, 265.
- PICCARDO, A., MORANA, G., PUNTONI, M., CAMPORA, S., STEFANIA, S., ZUCCHETTA, P., UGOLINI, M., CONTE, M., CISTARO, A., FERRARAZZO, G., PESCIETTO, M., LATTUADA, M., BOTTONI, G., GARAVENTA, A., GIOVANELLA, L. & LOPCI, E. 2019. Diagnosis, Treatment Response and Prognosis. The role of (18)F-DOPA PET/CT in children affected by

- Neuroblastoma in comparison with (123)I-mIBG scan. The first prospective study. *J Nucl Med*.
- PIETSCH, T., FONATSCH, C., ALBRECHT, S., MASCHEK, H., WOLF, H. K. & VON SCHWEINITZ, D. 1996. Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma. *Lab Invest*, 74, 809-18.
- PIPEL, A., STOLZ, M., WOLTERS DORF, R., KLESS, A., SCHMALZING, G. & MARKWARDT, F. 2017. Localization of the gate and selectivity filter of the full-length P2X7 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E2156-E2165.
- RAFFAGHELLO, L., CHIOZZI, P., FALZONI, S., DI VIRGILIO, F. & PISTOIA, V. 2006. The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res*, 66, 907-14.
- RAMADAN, F., FAHS, A., GHAYAD, S. E. & SAAB, R. 2020. Signaling pathways in Rhabdomyosarcoma invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 39, 287-301.
- REINHARD, H., REINERT, J., BEIER, R., FURTWANGLER, R., ALKASSER, M., RUTKOWSKI, S., FRUHWALD, M., KOSCIELNIAK, E., LEUSCHNER, I., KAATSCH, P. & GRAF, N. 2008. Rhabdoid tumors in children: prognostic factors in 70 patients diagnosed in Germany. *Oncol Rep*, 19, 819-23.
- RIEDEL, T., SCHMALZING, G. & MARKWARDT, F. 2007. Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X7 receptor-operated single-channel currents. *Biophys J*, 93, 846-58.
- ROBERT, R., CARLILE, G. W., PAVEL, C., LIU, N., ANJOS, S. M., LIAO, J., LUO, Y., ZHANG, D., THOMAS, D. Y. & HANRAHAN, J. W. 2008. Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect. *Mol Pharmacol*, 73, 478-89.
- ROBERTS, J. A., VIAL, C., DIGBY, H. R., AGBOH, K. C., WEN, H., ATTERBURY-THOMAS, A. & EVANS, R. J. 2006. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch*, 452, 486-500.
- ROBINSON, L. E. & MURRELL-LAGNADO, R. D. 2013. The trafficking and targeting of P2X receptors. *Front Cell Neurosci*, 7, 233.
- ROBINSON, L. E., SHRIDAR, M., SMITH, P. & MURRELL-LAGNADO, R. D. 2014. Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization. *J Biol Chem*, 289, 31983-94.
- RODERICK, H. L. & COOK, S. J. 2008. Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer*, 8, 361-75.
- RODRIGUEZ-PERALES, S., MARTINEZ-RAMIREZ, A., DE ANDRES, S. A., VALLE, L., URIOSTE, M., BENITEZ, J. & CIGUDOSA, J. C. 2004. Molecular cytogenetic characterization of rhabdomyosarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*, 148, 35-43.

- ROGER, S., JELASSI, B., COUILLIN, I., PELEGRIN, P., BESSON, P. & JIANG, L. H. 2015. Understanding the roles of the P2X7 receptor in solid tumour progression and therapeutic perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1848, 2584-602.
- ROGER, S., MEI, Z. Z., BALDWIN, J. M., DONG, L., BRADLEY, H., BALDWIN, S. A., SURPRENANT, A. & JIANG, L. H. 2010. Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *J Psychiatr Res*, 44, 347-55.
- ROKIC, M. B. & STOJILKOVIC, S. S. 2013. Two open states of P2X receptor channels. *Front Cell Neurosci*, 7, 215.
- SACK, U., TÁRNOK, A. & ROTHE, G. 2007. *Zelluläre Diagnostik, Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie*, Basel, Karger.
- SCHLAG, P., HARTMANN, J. & BUDACH, V. 2011. *Weichgewebetumoren - Interdisziplinäres Management; Springer Verlag; ISBN: 978-3-642-04939-2*.
- SCHMID, E., STAGNO, M. J., YAN, J., STOURNARAS, C., LANG, F., FUCHS, J. & SEITZ, G. 2016. Store-operated Ca(2+) entry in rhabdomyosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 477, 129-136.
- SCHMID, R. & EVANS, R. J. 2019. ATP-Gated P2X Receptor Channels: Molecular Insights into Functional Roles. *Annu Rev Physiol*, 81, 43-62.
- SCHMIDT, A., WARMANN, S. W., URLA, C. & FUCHS, J. 2018. Innovationen in der chirurgischen Behandlung solider Tumoren im Kindesalter. *Chirurg*, 89, 205-211.
- SCHMIDT, S., LIU, G., LIU, G., YANG, W., HONISCH, S., PANTELAKOS, S., STOURNARAS, C., HONIG, A. & LANG, F. 2014. Enhanced Orai1 and STIM1 expression as well as store operated Ca2+ entry in therapy resistant ovary carcinoma cells. *Oncotarget*, 5, 4799-810.
- SCHWARZ, N., DROUOT, L., NICKE, A., FLIEGERT, R., BOYER, O., GUSE, A. H., HAAG, F., ADRIOUCH, S. & KOCH-NOLTE, F. 2012. Alternative splicing of the N-terminal cytosolic and transmembrane domains of P2X7 controls gating of the ion channel by ADP-ribosylation. *PLoS One*, 7, e41269.
- SHEMON, A. N., SLUYTER, R., FERNANDO, S. L., CLARKE, A. L., DAO-UNG, L. P., SKARRATT, K. K., SAUNDERS, B. M., TAN, K. S., GU, B. J., FULLER, S. J., BRITTON, W. J., PETROU, S. & WILEY, J. S. 2006. A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J Biol Chem*, 281, 2079-86.
- SLATER, M., DANIELETTO, S., GIDLEY-BAIRD, A., TEH, L. C. & BARDEN, J. A. 2004a. Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors. *Histopathology*, 44, 206-15.

- SLATER, M., DANIELETTO, S., POOLEY, M., CHENG TEH, L., GIDLEY-BAIRD, A. & BARDEN, J. A. 2004b. Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions. *Breast Cancer Res Treat*, 83, 1-10.
- SLATER, M., SCOLYER, R. A., GIDLEY-BAIRD, A., THOMPSON, J. F. & BARDEN, J. A. 2003. Increased expression of apoptotic markers in melanoma. *Melanoma Res*, 13, 137-45.
- SLUYTER, R. 2017. The P2X7 Receptor. *Adv Exp Med Biol*, 1051, 17-53.
- SLUYTER, R. & STOKES, L. 2011. Significance of P2X7 receptor variants to human health and disease. *Recent Pat DNA Gene Seq*, 5, 41-54.
- SMITH, M. A., ALTEKRUSE, S. F., ADAMSON, P. C., REAMAN, G. H. & SEIBEL, N. L. 2014. Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer*, 120, 2497-506.
- SOFT TISSUE SARCOMA COMMITTEE OF THE CHILDREN'S ONCOLOGY, G., LAGER, J. J., LYDEN, E. R., ANDERSON, J. R., PAPPO, A. S., MEYER, W. H. & BREITFELD, P. P. 2006. Pooled analysis of phase II window studies in children with contemporary high-risk metastatic rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*, 24, 3415-22.
- SPARBER-SAUER, M., VON KALLE, T., SEITZ, G., DANTONELLO, T., SCHEER, M., MUNTER, M., FUCHS, J., LADENSTEIN, R., BIELACK, S. S., KLINGEBIEL, T., KOSCIELNIAK, E. & COOPERATIVE WEICHTEILSARKOM, S. 2017. The prognostic value of early radiographic response in children and adolescents with embryonal rhabdomyosarcoma stage IV, metastases confined to the lungs: A report from the Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS). *Pediatr Blood Cancer*, 64.
- STEINBERG, T. H., NEWMAN, A. S., SWANSON, J. A. & SILVERSTEIN, S. C. 1987. ATP4-permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J Biol Chem*, 262, 8884-8.
- STEWART, E., FEDERICO, S., KARLSTROM, A., SHELAT, A., SABLAEUER, A., PAPPO, A. & DYER, M. A. 2016. The Childhood Solid Tumor Network: A new resource for the developmental biology and oncology research communities. *Dev Biol*, 411, 287-293.
- SURPRENANT, A. & NORTH, R. A. 2009. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol*, 71, 333-59.
- SURPRENANT, A., RASSENDREN, F., KAWASHIMA, E., NORTH, R. A. & BUELL, G. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 272, 735-8.
- SWULIUS, M. T. & WAXHAM, M. N. 2008. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol Life Sci*, 65, 2637-57.
- TAYLOR, A. C., SHU, L., DANKS, M. K., POQUETTE, C. A., SHETTY, S., THAYER, M. J., HOUGHTON, P. J. & HARRIS, L. C. 2000. P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Med Pediatr Oncol*, 35, 96-103.

- TEKAUTZ, T. M., FULLER, C. E., BLANEY, S., FOULADI, M., BRONISER, A., MERCHANT, T. E., KRASIN, M., DALTON, J., HALE, G., KUN, L. E., WALLACE, D., GILBERTSON, R. J. & GAJJAR, A. 2005. Atypical teratoid/rhabdoid tumors (ATRT): improved survival in children 3 years of age and older with radiation therapy and high-dose alkylator-based chemotherapy. *J Clin Oncol*, 23, 1491-9.
- TORRES, G. E., EGAN, T. M. & VOIGT, M. M. 1999. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem*, 274, 6653-9.
- TULLA, M., BERTHOLD, F., GRAF, N., RUTKOWSKI, S., VON SCHWEINITZ, D., SPIX, C. & KAATSCH, P. 2015. Incidence, Trends, and Survival of Children With Embryonal Tumors. *Pediatrics*, 136, e623-32.
- VALERA, S., HUSSY, N., EVANS, R. J., ADAMI, N., NORTH, R. A., SURPRENANT, A. & BUELL, G. 1994. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*, 371, 516-9.
- VIRGINIO, C., MACKENZIE, A., RASSENDREN, F. A., NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. 1999. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci*, 2, 315-21.
- WATANABE, I. & OKADA, S. 1967. Reproductive death of irradiated cultured mammalian cells and its relation to mitosis. *Nature*, 216, 380-1.
- WEI, L., CASELEY, E., LI, D. & JIANG, L. H. 2016. ATP-induced P2X Receptor-Dependent Large Pore Formation: How Much Do We Know? *Front Pharmacol*, 7, 5.
- WICKERT, L. E., BLANCHETTE, J. B., WALDSCHMIDT, N. V., BERTICS, P. J., DENU, J. M., DENLINGER, L. C. & LENERTZ, L. Y. 2013. The C-terminus of human nucleotide receptor P2X7 is critical for receptor oligomerization and N-linked glycosylation. *PLoS One*, 8, e63789.
- WILEY, J. S., DAO-UNG, L. P., LI, C., SHEMON, A. N., GU, B. J., SMART, M. L., FULLER, S. J., BARDEN, J. A., PETROU, S. & SLUYTER, R. 2003. An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem*, 278, 17108-13.
- WINTER, G. & MILSTEIN, C. 1991. Man-made antibodies. *Nature*, 349, 293-9.
- WORTHINGTON, R. A., SMART, M. L., GU, B. J., WILLIAMS, D. A., PETROU, S., WILEY, J. S. & BARDEN, J. A. 2002. Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X7receptor function. *FEBS Letters*, 512, 43-46.
- XU, X. J., BOUMECHACHE, M., ROBINSON, L. E., MARSCHALL, V., GORECKI, D. C., MASIN, M. & MURRELL-LAGNADO, R. D. 2012. Splice variants of the P2X7 receptor reveal differential agonist dependence and functional coupling with pannexin-1. *J Cell Sci*, 125, 3776-89.
- YAN, Z., KHADRA, A., LI, S., TOMIC, M., SHERMAN, A. & STOJILKOVIC, S. S. 2010. Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating. *J Neurosci*, 30, 14213-24.

- YAN, Z., LI, S., LIANG, Z., TOMIC, M. & STOJILKOVIC, S. S. 2008. The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J Gen Physiol*, 132, 563-73.
- YOUNG, C. N. J., CHIRA, N., ROG, J., AL-KHALIDI, R., BENARD, M., GALAS, L., CHAN, P., VAUDRY, D., ZABLOCKI, K. & GORECKI, D. C. 2018. Sustained activation of P2X7 induces MMP-2-evoked cleavage and functional purinoceptor inhibition. *J Mol Cell Biol*, 10, 229-242.

7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Jörg Fuchs durchgeführt.

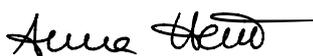
Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Evi Schmid, Leiterin des Forschungslabors der Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie Tübingen.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Evi Schmid, Matias Stagno (biologischer Doktorand), Julia Wenz (MTA), Bettina Kirchner (MTA) und Melanie Hauth (MTA) von mir eigenständig durchgeführt. Die Isolation der *peripheral blood mononuclear cells* und Differenzierung der Makrophagen wurden von Matias Stagno durchgeführt. Die H&E-Färbung wurde von Mitarbeitern / Mitarbeiterinnen des Pathologischen Instituts Tübingen durchgeführt. Ebenfalls erfolgte die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit Unterstützung durch PD Dr. med. Hans Bösmüller. Die Daten der Calcium-Messungen wurden von Dr. Jing Yan erhoben.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Evi Schmid eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die Veröffentlichung der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation ist aktuell in Bearbeitung.

Tübingen, den 08.12.2021



Anna Hein

8 DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jörg Fuchs, für die freundliche Aufnahme in das Labor der Kinderchirurgie und Kinderurologie des Universitätsklinikums für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen. Danke für die Ermöglichung und Betreuung dieser Dissertation!

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Evi Schmid für die Auswahl des interessanten Themas, die umfangreiche Planung, die herzlichen Gespräche sowie die vor allem umfassende Unterstützung zu wirklich jeder Zeit bedanken. Der Einblick in die wissenschaftliche Forschung wird mir eine schöne und unvergessliche Erinnerung sein!

Auch Herrn Prof. Dr. Steven Warmann möchte ich für jegliches Korrekturlesen sowie die spannenden Einblicke im OP der Kinderchirurgie danken!

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Hans Bösmüller für das gemeinsame Mikroskopieren, die tolle Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut und vor allem für die persönliche und herzliche Begleitung während dem gesamten Studium.

Auch Romain Lara, ehemaliger Mitarbeiter der Firma Biosceptre, möchte ich für die intensive Zusammenarbeit und Beantwortung jeglicher Fragen danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Matias Stagno, Julia Wenz, Melanie Hauth, Bettina Kirchner und Hannes Weil für die großartige Unterstützung und die schöne Zeit im Labor.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder Simon und meinem Freund Christoph von ganzem Herzen danken. Ohne Euch wäre vieles nicht möglich gewesen.