

Aus der
Universitätsklinik für Urologie

**Differentielle Expression und klinische Relevanz des C-X-C Motiv
Chemokinrezeptors 4 (CXCR4) in benignen, nicht-metastasierten
und metastasierten Nierentumoren**

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

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

vorgelegt von

Kurcz, Aymone Claudia Ilka

2024

Dekan: Prof. Dr. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Rausch

2. Berichterstatter: Professorin Dr. A. Bornemann

Tag der Disputation: 14.06.2024

Widmung

Meiner lieben Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	12
1.1 Das Nierenzellkarzinom	12
1.1.1 Epidemiologie	12
1.1.2 Risikofaktoren	12
1.1.3 Nierenzellkarzinome im Rahmen hereditärer Syndrome	13
1.1.4 Histologische Varianten der malignen Nierentumore	15
1.1.5 Histologische Varianten der benignen Nierentumore	20
1.1.5.1 TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms	22
1.1.5.2 Grading	24
1.1.6 Metastasen	25
1.1.7 Klinik & Diagnostik	26
1.1.7.1 Klinik	26
1.1.7.2 Diagnostik	26
1.1.8 Nachsorge (<i>Follow-up</i>)	27
1.1.9 Therapie und molekulare Grundlagen	29
1.1.9.1 Lokalisiertes Stadium	29
1.1.9.2 Adjuvante Therapie	30
1.1.9.3 Metastasiertes Stadium	30
1.1.9.3.1 Systemische Therapien	31
1.1.9.3.2 Chirurgische Maßnahmen im fortgeschrittenen Stadium	31
1.1.9.4 Molekulare Signalwege des Nierenzellkarzinoms	33
1.1.10 Risikoklassifikation und Therapieentscheidung	34
1.1.11 Prognose-Modelle:	38
1.2 CXCR4	39
1.2.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren	39
1.2.2 CXCR4 und der Ligand CXCL12	41
1.2.3 Intrazelluläre Signaltransduktion von CXCR4/CXCL12	42
1.2.4 Onkologische Relevanz von CXCR4	43
1.2.5 CXCR4 in Nierenzellkarzinomen und als prognostischer Marker	45
1.2.6 CXCR4 in der klinischen Anwendung	46
1.2.7 Motivation und Ziele dieser Arbeit	47
2 Material und Methoden	50

2.1	Ethikvotum	50
2.2	Patientenkollektive	50
2.2.1	Klarzelliges Nierenzellkarzinom Kollektiv (Kollektiv 1)	50
2.2.2	Nierentumorkollektiv verschiedener histologischer Genesen (Kollektiv 2)	52
2.2.3	Metastasenkollektiv (Kollektiv 3)	52
2.3	Untersuchungsmaterial	53
2.3.1	Besonderheiten des klarzelligen Kollektivs (Kollektiv 1)	53
2.3.2	Besonderheiten des Nierentumorkollektivs (Kollektiv 2)	53
2.3.3	Besonderheiten des Metastasenkollektivs (Kollektiv 3)	54
2.4	Erstellung der Tissue Micro Arrays (TMA)	55
2.5	Immunhistochemische Färbung	56
2.6	Auswertung der Tissue Micro Arrays & Erfassung der Färbeintensitäten	58
2.7	Klinische Daten und Statistische Auswertung	62
2.7.1	Klinische Daten	62
2.7.2	Statistische Auswertung der Tissue Microarrays	62
2.7.3	Angewendete Tests und Software	64
3	Ergebnisse	65
3.1	Klarzelliges Nierenzellkarzinom Kollektiv (Kollektiv 1)	65
3.1.1	Patientendaten	65
3.1.2	Expressionsanalyse	67
3.1.2.1	Zytoplasmatische Expression	67
3.1.2.2	Nukleäre Expression	69
3.1.3	CXCR4-Expression bezogen auf klinisch-pathologische Daten	70
3.1.4	Uni- und multivariate Überlebensanalysen	71
3.1.5	Kaplan-Meier-Analysen	74
3.2	Nierentumorkollektiv verschiedener histologischer Genesen (Kollektiv 2)	78
3.2.1	Patientendaten	78
3.2.2	Expressionsanalyse	81
3.3	Metastasenkollektiv (Kollektiv 3)	87
3.3.1	Patientendaten	87
3.3.2	Expressionsanalyse	88
3.4	Gegenüberstellung: Primärtumor, benignes Gewebe und Metastase	94
3.5	Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse	98
4	Diskussion	100
4.1	Klarzelliges Nierenzellkarzinom Kollektiv	101
4.1.1	CXCR4-Expression und subzelluläre Distribution	101

4.1.2	Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern und Überleben	105
4.2	Nierentumorkollektiv	108
4.3	Metastaskollektiv	110
4.4	Gegenüberstellung der 3 Kollektive	112
4.5	Limitationen	113
4.6	Ausblick: Klinische Relevanz	114
5	Zusammenfassung	117
6	Erklärung zum Eigenanteil	120
7	Veröffentlichungen	121
8	Danksagung	122
9	Literaturverzeichnis	123

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
BHD	Birt-Hogg-Dubé
BMI	Body Mass Index
cAMP	Cyclic adenosine momophosphate
CPI	Checkpointinhibitor
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerin
DD	Differentialdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDA	Food and Drug Administration
FLCN	Follikulin
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HI-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
KM	Kontrastmittel
L	Lymphgefäßinvasion
LARCC	Locally advanced RCC
LDH	Laktatdehydrogenase
LEST-Rezeptor	Leukocyte-derived seven-transmembrane domain receptor
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NZK	Nierenzellkarzinom
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositoldiphosphat
PIP3	Phosphatidylinositoltriphosphat
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1/CXCL12

STAT	Signal Transducers and Activators of Transkription
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TMA	Tissue Micro Array
TNM	Tumor-Node-Metastasis
TSC	Tuberöse-Sklerose-Komplex
UICC	Union contre le Cancer
V	Veneninvasion
VHL	von Hippel Lindau

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exemplarische Darstellung eines Cores in der Übersichtsaufnahme des Programms Aperio ImageScope ePathology in 10-facher Vergrößerung.	60
Abbildung 2: Exemplarische Darstellung der verschiedenen Intensitäten der immunhistochemischen Färbung in aufsteigender Intensität (aus Metastasen-Kollektiv, zytoplasmatische CXCR4-Färbung mit Intensitäten von 0-3, 20-fache Vergrößerung).	61
Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der nukleären immunhistochemischen Färbung (aus Nierentumor-Kollektiv: nukleäre CXCR4-Färbung, Kategorien: „nicht angefärbt“ und „angefärbt“, 20-fache Vergrößerung).	62
Abbildung 4: Box-Plot Darstellung des zytoplasmatischen IRS im Vergleich des benignen Nierengewebes sowie des malignen NZK Gewebes; Abkürzungen: IRS = Immunreaktivitätsscore, NZK = Nierenzellkarzinom.	68
Abbildung 5: Nukleäre CXCR4-Expression in malignem und benignem Nierengewebe.	69
Abbildung 6: Kaplan-Meier Kurve, Überlebensrate des Patientenkollektivs mit klarzelligen NZK.	74
Abbildung 7: Kaplan-Meier Kurven des Gesamtüberlebens mit positiver bzw. negativer zytoplasmatischer CXCR4-Expression. (Group 0 (blaue Kurve) = keine zytoplasmatische Expression; Group 1 (rote Kurve) = mit zytoplasmatischer Expression)	75
Abbildung 8 : Kaplan-Meier Kurven des tumorspezifischen Überlebens in Abhängigkeit der positiven oder negativen zytoplasmatischen CXCR4-Expression. (Group 0 (blaue Kurve) = keine zytoplasmatische Expression; Group 1 (rote Kurve) = mit zytoplasmatischer Expression)	76
Abbildung 9: Kaplan-Meier Kurven für positive bzw. negative nukleäre CXCR4-Expression. (Group 0 (blaue Kurve) = keine nukleäre Expression; Group 1 (rote Kurve) = mit nukleärer Expression)	77
Abbildung 10: Kaplan-Meier Kurven des tumorspezifischen Überlebens für positive bzw. negative nukleäre CXCR4-Expression. (Group no (blaue Kurve) = keine nukleäre Expression; Group yes (rote Kurve) = mit nukleärer Expression)	78
Abbildung 11: Zytoplasmatische CXCR4-Expression im Nierentumorkollektiv.	82
Abbildung 12: Nukleäre CXCR4-Expression im Nierentumorkollektiv.	83
Abbildung 13: Zytoplasmatische CXCR4-Expression in Metastasengewebe unterschiedlicher Lokalisationen.	90
Abbildung 14: Nukleäre CXCR4-Expression in Metastasengewebe unterschiedlicher Lokalisationen.	90
Abbildung 15: Zytoplasmatische CXCR4-Expression in Abhängigkeit des Analysegewebes.	95
Abbildung 16: Nukleäre CXCR4-Expression in Abhängigkeit des Analysegewebes.	97

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Vorschläge für neue Tumorentitäten; Vancouver-Klassifikation für Nierentumore der International Society of Urological Pathology (Modifiziert nach Störkel et. al²⁶) sowie WHO-Klassifikation der Nierentumore (2016, modifiziert nach Moch et. al²⁵)</i>	16
<i>Tabelle 2: WHO Klassifikation der Nierenzelltumore 2022 (modifiziert aus den EAU-Guidelines zum Nierenzellkarzinom 2023¹¹)</i>	18
<i>Tabelle 3: Bosniak-Klassifikation, modifiziert nach Peter Hallscheidt, Nierenzellkarzinom: Abklärung suspekter renaler Raumforderungen in Onko-Nephrologie, 2020.³⁷</i>	22
<i>Tabelle 4: TNM-Klassifikation modifiziert nach Brierley³⁹</i>	23
<i>Tabelle 5: Aktuelle Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms nach UICC; entnommen aus S. Delecluse und S. Zschäbitz, in Klassifikation und med. Therapie des Nierenzellkarzinoms in Onko-Nephrologie, 2020.²⁸</i>	24
<i>Tabelle 6: WHO-ISUP-Gradingssystem für Nierenkarzinome. Der Pathologe. 2016, Modifiziert nach H. Moch.</i>	25
<i>Tabelle 7: Definition der Risikogruppen des nicht-metastasierten Nierenzellkarzinoms, modifiziert nach gültiger S-3 Leitlinie⁴⁰</i>	28
<i>Tabelle 8: Erstlinien-Therapie des metastasierten NZK; modifiziert nach EAU Guidelines.¹¹</i>	36
<i>Tabelle 9: Vorschlag der Zweitlinien-Therapie des metastasierten NZK, modifiziert nach aktuell gültiger S-3 Leitlinie.⁴⁶</i>	37
<i>Tabelle 10: Übersicht der Kollektive und der untersuchten Gewebeproben.</i>	54
<i>Tabelle 11: Materialien und Lösungen der immunhistochemischen Färbung der Tissue Micro Arrays.</i>	58
<i>Tabelle 12: Übersicht der Kollektive und der analysierten Gewebeproben.</i>	63
<i>Tabelle 13: Charakteristika des klarzelligen Nierenzellkarzinom Kollektivs (Kollektiv 1).</i>	66
<i>Tabelle 14: Statistische Analyse der absoluten zytoplasmatischen CXCR4-Expression in benignem Nierengewebe und klarzelligen NZK.</i>	68
<i>Tabelle 15: Statistische Analyse der absoluten nukleären CXCR4-Expression in benignem Nierengewebe und klarzelligen NZK.</i>	70
<i>Tabelle 16 : Chi-Quadrat-Test: Korrelation der CXCR4-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern des klarzelligen Patientenkollektivs.</i>	70
<i>Tabelle 17: Univariate Cox-Regression für das Gesamtüberleben (Overall Survival) und tumorspezifische Überleben (Cancer specific survival) des klarzelligen NZK-Kollektivs.</i>	71
<i>Tabelle 18: Multivariate Cox-Regression für das Gesamtüberleben (Overall Survival) und tumorspezifische Überleben (Cancer specific survival)des klarzelligen NZK-Kollektivs.</i>	72
<i>Tabelle 19: Charakteristika des Nierentumorkollektivs.</i>	79
<i>Tabelle 20: Statistische Analyse der absoluten nukleären und zytoplasmatischen CXCR4-Expression des Nierentumorkollektivs</i>	81
<i>Tabelle 21: Statistische Analyse der zytoplasmatischen und nukleären CXCR4-Expression in den histologischen Subgruppen.</i>	84
<i>Tabelle 22: Kruskal-Wallis-Analyse zur zytoplasmatischen CXCR4-Expression innerhalb der Nierentumor-Subgruppen.</i>	85
<i>Tabelle 23: Post-hoc-Analyse der zytoplasmatischen CXCR4-Expression.</i>	86
<i>Tabelle 24: Kruskal-Wallis-Analyse zur nukleären CXCR4-Expression innerhalb der Nierentumor-Subgruppen.</i>	86
<i>Tabelle 25: Post-hoc-Analyse der nukleären CXCR4-Expression.</i>	86
<i>Tabelle 26: Charakteristika des Metastasenkollektivs.</i>	87
<i>Tabelle 27: Statistische Analyse der absoluten zytoplasmatischen und nukleären CXCR4-Expression des Metastasenkollektivs.</i>	89

<i>Tabelle 28: Zytoplasmatische CXCR4-Expression der verschiedenen Metastasenlokalisationen.</i>	92
<i>Tabelle 29: Nukleäre CXCR4-Expression der verschiedenen Metastasenlokalisationen.</i>	93
<i>Tabelle 30: Kruskal-Wallis-Analyse zur zytoplasmatischen CXCR4-Expression innerhalb der Metastasenlokalisationen.</i>	94
<i>Tabelle 31: Kruskal-Wallis-Analyse zur nukleären CXCR4-Expression innerhalb der Metastasenlokalisationen.</i>	94
<i>Tabelle 32: Gegenüberstellung der zytoplasmatischen CXCR4-Expression in Primärtumor und benignem Nierengewebe sowie Metastasengewebe.</i>	96
<i>Tabelle 33: Kruskal-Wallis-Test der zytoplasmatischen CXCR4-Expression innerhalb der Gruppen maligne, benigne und Metastase</i>	96
<i>Tabelle 34: Post-hoc Analyse der zytoplasmatischen CXCR4-Expression innerhalb der Gruppen Primärtumor, benigne und Metastase.</i>	96
<i>Tabelle 35: Gegenüberstellung der nukleären CXCR4-Expression in Primärtumor und benignem Nierengewebe sowie Metastasengewebe.</i>	97
<i>Tabelle 36: Kruskal-Wallis-Test der nukleären CXCR4-Expression innerhalb der Gruppen maligne, benigne und Metastase</i>	98
<i>Tabelle 37: Post-hoc Analyse der nukleären CXCR4-Expression innerhalb der Gruppen Primärtumor, benigne und Metastase.</i>	98

1. Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom (NZK) macht 90% aller malignen Neoplasien der Niere aus. Nach dem Prostatakarzinom und dem Urothelkarzinom der Harnblase stellt es das dritthäufigste urologische Malignom dar und ist für ca. 3% aller Krebsleiden verantwortlich.^{1,2} Mit 76,5% hat es von den genannten Malignomen die geringste 5 Jahres-Überlebensrate.³ Im Jahre 2018 zeigten sich 99.200 neue Fälle von Nierenzellkarzinomen in Europa, wobei eine Prädominanz bei Männern gegenüber Frauen besteht (1.5:1).^{1,2} Weiterhin zeigt sich eine höhere Inzidenz in der älteren Bevölkerung, das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männern bei 68 Jahren, für Frauen bei 71 - 72 Jahren.⁴

Darüber hinaus besteht eine geographisch unterschiedliche Auftretenswahrscheinlichkeit: In Nordamerika, Australien, Neuseeland und Europa werden höhere Inzidenzen beobachtet als in Asien und Afrika.⁵ Trotz zunehmender inzidenteller Diagnosen in frühen Stadien im Rahmen von Schnittbildgebungen, besteht bei ca. 20 - 30% aller Patienten bei Erstdiagnose bereits ein metastasiertes Krankheitsstadium. Dieses ist trotz Fortschritten in der systemischen Therapie noch immer mit einer schlechten Prognose verbunden.⁶

1.1.2 Risikofaktoren

An nicht-modifizierbaren Risikofaktoren für die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms sind das Alter und das männliche Geschlecht zu nennen. Mit fortschreitendem Alter steigt das Risiko an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken progressiv an.²

Gesicherte modifizierbare Risikofaktoren für die Entstehung von Nierenzellkarzinomen umfassen Zigarettenrauchen, Hypertonie sowie Adipositas.⁷⁻¹⁰

Metaanalysen und Fall-Kontroll-Studien zeigen, dass das relative Risiko für Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern um den Faktor 1,38 erhöht ist. Im Sinne einer Dosis-Wirkungsbeziehung besteht

ein erhöhtes Risiko bei stärkerem Konsum.^{7,8} 50,2% aller Patienten mit Nierenzellkarzinom weisen eine positive Raucheranamnese auf.¹¹ In prospektiven Studien zeigten Patienten mit arterieller Hypertonie ebenfalls eine erhöhte Inzidenz von Nierenzellkarzinomen mit einer Risikoerhöhung um 10% bei einem Anstieg des systolischen Blutdrucks um 10mmHg, sowie einer Risikoerhöhung von bis zu 22% bei 10mmHg Anstieg im diastolischen Bereich.⁹ Kontrovers diskutiert wird allerdings, ob die arterielle Hypertension alleinig als Risikofaktor fungiert oder möglicherweise ein Zusammenhang mit der daraus resultierenden antihypertensiven Medikation besteht.¹² Des Weiteren muss auch Adipositas zu den Risikofaktoren des Nierenzellkarzinoms gezählt werden. Mit erhöhtem *Body-Mass-Index* (BMI) steigt das Risiko an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken. Bereits der Anstieg des BMI um 5kg/m² steigert das Erkrankungsrisiko von Männern um das 1,24-fache, sowie bei Frauen um das 1,34-fache.¹⁰ Ebenso scheint das Vorliegen eines Diabetes mellitus einen nachteiligen Effekt im Hinblick auf die Entwicklung eines Nierenzellkarzinoms zu haben.¹³

Im Gegensatz zu diesen gesicherten Einflussfaktoren steht die längerfristige, berufliche Exposition zu einigen Substanzen aktuell weiterhin in der Diskussion, das Risiko der renalen Karzinomentwicklung zu steigern. Mögliche Noxen umfassen Cadmium sowie die Exposition zu Trichlorethylen, Glasfaser, Mineralwolle und Ziegelstäuben.^{6,14} Darüber hinaus gelten die Niereninsuffizienz im Endstadium, eine erworbene zystische Nierenerkrankung, sowie die daraus resultierende Hämodialyse als prädisponierend für die Entwicklung eines Nierenzellkarzinoms.⁶

Eine protektive Wirkung wurde in einigen Studien für den moderaten Alkoholkonsum sowie dem Verzehr von Gemüse und Obst beschrieben, wobei die Gründe für erstgenanntes bislang nicht hinreichend geklärt sind.^{15,16} Als effektivste Primärprävention gilt jedoch der Verzicht auf Zigarettenkonsum sowie das Vermeiden von Übergewicht.¹¹

1.1.3 Nierenzellkarzinome im Rahmen hereditärer Syndrome

5 - 8% aller Nierenzellkarzinome treten in Rahmen von hereditären Syndromen auf.¹¹ Typischerweise findet sich hier ein deutlich jüngeres Erkrankungsalter als bei Patienten mit sporadischem Nierenzellkarzinom (mittleres Erkrankungsalter: 37 Jahre), eine familiäre Häufung

sowie multifokales und bilaterales Auftreten. In einigen Fällen kann es weiterhin zu zusätzlichen extrarenalen Manifestationen kommen.¹⁷

Das Von-Hippel-Lindau-Syndrom:

Eines dieser Syndrome ist das autosomal-dominant vererbte Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom), welches auf einer Mutation und Inaktivierung des Von-Hippel-Lindau-Gens auf Chromosom 3 beruht. Eine Inaktivierung dieses Gens wird auch bei einer Vielzahl der sporadischen Nierenzellkarzinome beobachtet, ohne dass das Vollbild eines VHL-Syndroms vorliegt.¹⁸ Durch den Funktionsverlust des Gens kommt es zur Akkumulation von hypoxieinduzierten Faktoren (HIFs) und dadurch letztlich zur Stimulation von Neoangiogenese und Tumorwachstum. Konsekutiv kommt es daher beim VHL-Syndrom zur Ausbildung von vaskulären Tumoren, wie beispielsweise Hämangioblastomen der Retina oder des zentralen Nervensystems, aber auch zu Phäochromozytomen, Pankreaskarzinomen sowie zur Ausbildung von renalen Zysten und klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Die durchschnittliche Lebenserwartung der Betroffenen ist mit 49 Jahren deutlich reduziert, nicht selten ist das Fortschreiten eines typischerweise initial multifokal und bilateralen Nierenzellkarzinoms ursächlich für den Tod der Patienten.¹⁸ Dieses Syndrom tritt mit einer Häufigkeit von 1/36.000 auf.¹⁹

Das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom:

Ebenfalls autosomal-dominant vererbt ist das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom (BHD-Syndrom). Durch eine Mutation des für Follikulin kodierenden Gens FLCN, fallen Patienten durch eine Vielzahl von kutanen Fibrofollikulomen besonders in Gesicht und Nacken auf.¹⁸ Während Patienten mit VHL-Syndrom klarzellige Nierenzellkarzinome entwickeln, präsentieren 20 - 30% der Patienten mit BHD-Syndrom an Nierenraumforderungen vor allem Onkozytome oder sogenannte Hybridtumore (Übergangsform zwischen Onkozytom und chromophoben Nierenzellkarzinom), sowie chromophobe Nierenzellkarzinome.^{20,21} Das auf Chromosom 17 lokalisierte BHD-Gen führt neben Nierentumoren auch bei mehr als 80% der betroffenen Patienten zu Zysten in der Lunge, wodurch in Folge häufiger Pneumothoraxe auftreten.²²

Tuberöse Sklerose:

Der Tuberoöse-Sklerose-Komplex (TSC), (Synonym: Bourneville-Pringle-Syndrom), kann als autosomal-dominantes Erbleiden ebenfalls zu Nierentumoren führen. Selten auftretend (1:10.000) kommt es durch eine Mutation in den für Hamartin kodierenden TSC1 oder TSC2 Genen zu Störungen der Zelladhäsion und Zellproliferation. Dadurch kommt es unter anderem zur Entstehung von Angiofibromen im Gesichtsbereich, retinalen und cerebralen Hamartomen sowie in 90% zu renalen Angiomyolipomen.²³ Nierenzellkarzinome vom papillären oder klarzelligen Typ treten nur in etwa 2 - 4% der Patienten mit TSC auf, dann jedoch häufig bilateral und multifokal.¹⁷

1.1.4 Histologische Varianten der malignen Nierentumore

Die Subtypen der Nierentumore werden anhand ihrer verschiedenen histopathologischen Merkmale klassifiziert. 2013 wurde durch die Arbeitsgruppe der Internationalen Gesellschaft für Urologische Pathologie (*International Society of Urological Pathology ISUP*) eine Überarbeitung der bis dahin gültigen WHO (*World Health Organization*) Klassifikation für Nierentumore von 2004 vorgeschlagen, welche u.a. die Anerkennung fünf neuer Entitäten innerhalb des Klassifikationssystems vorschlug (siehe Tabelle 1).²⁴ Auf Basis dieses Konsensus Vorschlags erfolgte die Überarbeitung der WHO Klassifikation, welche in der WHO Version 2016 endete und unten genannte Einteilungen vornahm (Tabelle 1).²⁵ 2022 erfolgte eine weitere Änderung der WHO Klassifikation, welche zur heute empfohlenen Klassifikation der Nierentumoren führte. Hierbei wurden die meisten Änderungen in den seltenen Nierentumoren vorgenommen (Tabelle 2).¹¹

Tabelle 1 zeigt die von der ISUP 2013 vorgeschlagenen neuen Tumorentitäten sowie die aktualisierte WHO-Klassifikation der Nierentumore von 2016.²⁴⁻²⁶

Tabelle 1: Vorschläge für neue Tumorentitäten; Vancouver-Klassifikation für Nierentumore der International Society of Urological Pathology (Modifiziert nach Störkel et. al²⁶) sowie WHO-Klassifikation der Nierentumore (2016, modifiziert nach Moch et. al²⁵)

Vancouver-Klassifikation: Vorschläge für neue Nierentumortypen der künftigen WHO-Klassifikation	
Neue epitheliale Nierentumortypen:	<ul style="list-style-type: none"> – Tubulozystisches Nierenzellkarzinom – „Erworbene zystische Nierenerkrankung“ assoziiertes Nierenzellkarzinom – Klarzelliges papilläres Nierenzellkarzinom – MiT-Familie der Translokationskarzinome (inkl. T(6;11)-Nierenzellkarzinom) – Hereditäres Leiomyomatosis-assoziiertes Nierenzellkarzinom
Provisorische Nierentumorentitäten:	<ul style="list-style-type: none"> – Schilddrüsenähnliches follikuläres Nierenzellkarzinom – Succinat-Dehydrogenase-B-Defizienz-assoziiertes Nierenzellkarzinom – ALK-Translokationsassoziiertes Nierenzellkarzinom
WHO-Klassifikation der Nierentumore (2016):	
Nierenzellkarzinome:	<ul style="list-style-type: none"> – Klarzelliges Nierenzellkarzinom – Multilokuläre zystische Neoplasie der Niere mit niedrigem malignem Potenzial – Papilläres Nierenzellkarzinom – Hereditäre Leiomyomatose und Nierenzellkarzinom-assoziiertes Nierenzellkarzinom – Chromophobes Nierenzellkarzinom – Sammelrohrkarzinom – Medulläres Nierenkarzinom – Nierenzellkarzinom mit MiT-familien-translokations – Succinat-Dehydrogenase-defizientes Nierenzellkarzinom – Muzinöses tubuläres und spindelzelliges Karzinom – Tubulozystisches Nierenzellkarzinom – „Erworbene zystische Nierenerkrankung“ assoziiertes Nierenzellkarzinom – Klarzellig-papilläres Nierenzellkarzinom – Unklassifiziertes Nierenzellkarzinom – Papilläres Adenom – Onkozytom
Metanephrische Tumoren:	<ul style="list-style-type: none"> – Metanephrisches Adenom – Metanephrisches Adenofibrom – Metanephrischer Stromatumor
Nephroblastische und zystische Tumore	<ul style="list-style-type: none"> – Nephrogene Reste – Nephroblastom

(hauptsächlich im Kindesalter):	<ul style="list-style-type: none"> - Zystisches, partiell differenziertes Nephroblastom - Pädiatrisches zystisches Nephrom
Mesenchymale Tumoren:	<p><u>Hauptsächlich im Kindesalter:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Klarzellsarkom - Kongenitales mesoblastisches Nephrom - Rhabdoidtumor - Ossifizierender kindlicher Nierentumor <p><u>Hauptsächlich bei Erwachsenen:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Leiomyosarkom - Angiosarkom - Rhabdomyosarkom - Osteosarkom - Synovialsarkom - Ewing-Sarkom - Angiomyolipom - Epitheloides Angiomyolipom - Leiomyom - Hämangiom - Lymphangiom - Hämangioblastom - Juxtaglomerulärer Tumor - Renomedullärer interstitieller Tumor - Schwannom - Solitärer fibröser Tumor
Gemischte mesenchymale und epitheliale Tumoren:	<ul style="list-style-type: none"> - Zystisches Nephrom - Gemischter Epithel- und Stromatumor
Neuroendokrine Tumoren:	<ul style="list-style-type: none"> - Gut differenzierter Neuroendokriner Tumor - Großzelliger Neuroendokriner Tumor - Kleinzelliger Neuroendokriner Tumor - Phäochromozytom
Sonstige Tumore	<ul style="list-style-type: none"> - Renale hämatologische Neoplasien - Keimzelltumore
Metastasen	

Abkürzungen: WHO = World Health Organization

Tabelle 2 zeigt die aktuelle WHO Klassifikation der Nierentumore.

Tabelle 2: WHO Klassifikation der Nierenzelltumore 2022 (modifiziert aus den EAU-Guidelines zum Nierenzellkarzinom 2023¹¹)

WHO Klassifikation der Nierenzelltumore 2022	
Nierenzellkarzinome	
Klarzellige Nierentumore	<ul style="list-style-type: none"> – Klarzelliges Nierenzellkarzinom – Multilokuläre zystische renale Neoplasie mit niedrigem malignem Potenzial
Papilläre Nierentumore	<ul style="list-style-type: none"> – Papilläres Adenom – Papilläres Nierenzellkarzinom
Onkozytäre und chromophobe Nierentumore	<ul style="list-style-type: none"> – Onkozytom der Niere – Chromophobes Nierenzellkarzinom – Andere onkozytäre Tumore der Niere
Sammelrohr-Tumore	<ul style="list-style-type: none"> – Sammelrohrkarzinom
Andere renale Tumore	<ul style="list-style-type: none"> – Klarzellig-papilläres Nierenzellkarzinom – Mucinös- tubuläres und spindelzell Karzinom – Tubulozystisches Nierenzellkarzinom – Nierenzellkarzinom assoziiert mit einer erworbenen zystischen Nierenerkrankung – Eosinophiles solides und zystisches Nierenzellkarzinom – Nierenzellkarzinom nicht anderweitig spezifiziert
Molekular definierte Nierentumore	<ul style="list-style-type: none"> – TFE3-verändertes Nierenzellkarzinom – TFEB-verändertes Nierenzellkarzinom – ELOC- (früher TCEB1)- mutiertes Nierenzellkarzinom – Fumarathydratase-defizientes Nierenzellkarzinom – Succinatdehydrogenase-defizientes Nierenzellkarzinom – ALK-verändertes Nierenzellkarzinom – SMARCB1-defizientes medulläres Nierenkarzinom
Metanephritische Tumore	
	<ul style="list-style-type: none"> – Metanephritisches Adenom – Metanephritisches Adenofibrom – Metanephritischer Stromatumor
Gemischte epitheliale und stromale Tumore	

	<ul style="list-style-type: none"> - Gemischter epithelialer und stromaler Tumor - Zystisches Nephrom des Erwachsenen
Renale mesenchymale Tumore	
Renale mesenchymale Tumore des Erwachsenen	<ul style="list-style-type: none"> - Klassisches Angiomyolipom - Epitheloides Angiomyolipom - Renales Hämangioblastom - Juxtaglomerulärer Tumor - Renomedullärer interstitieller Tumor
Pädiatrische renale mesenchymale Tumore	<ul style="list-style-type: none"> - Ossifizierender renaler Tumor im Säuglingsalter - Angeborenes mesoblastisches Nephrom - Rhabdoidtumor der Niere - Klarzelliges Sarkom der Niere
Embryonale Neoplasie der Niere	
Nephroblastische Tumore	<ul style="list-style-type: none"> - Nephrogene Reste - Pädiatrisches zystisches Nephrom - Zystisches teilweise differenziertes Nephroblastom - Nephroblastom
Sonstige Tumore	
	<ul style="list-style-type: none"> - Keimzelltumore der Niere

Abkürzungen: WHO = World Health Organisation

Mehr als 90% aller diagnostizierten Nierenzellkarzinome lassen sich den drei klinisch bedeutsamsten Subtypen klarzelliges, papilläres sowie chromophobes Nierenzellkarzinom zuordnen.²⁴ Jeder dieser Subtypen kann sich wiederum sarkomatoid differenzieren, was mit einem aggressiveren Tumorverhalten einhergeht.²⁷ Im Folgenden wird kurz auf die häufigsten Subtypen eingegangen:

Das klarzellige Nierenzellkarzinom:

Mit einem Auftreten von 75 - 85% ist das klarzellige Nierenzellkarzinom die häufigste Entität aller Nierenzellkarzinome.²⁸ Das klarzellige Nierenzellkarzinom entwickelt sich aus den proximalen Tubuluszellen.²⁹ Makroskopisch charakteristisch ist ein goldgelb erscheinender, umschriebener

Tumor ohne Kapsel, welcher oft von Nekrosen durchzogen ist.¹¹ Mikroskopisch imponieren die Zellen in Nestern angeordnet, diese zeigen – namensgebend für diesen Subtyp – ein helles und wasserklares Zytoplasma.²⁸

Das papilläre Nierenzellkarzinom:

Mit 10-15% folgt das papilläre Nierenzellkarzinom.²⁸ Dieser Subtyp wird in zwei Kategorien eingeteilt: Typ I und Typ II. Beide weisen in der Mehrzahl der Fälle makroskopisch eine Tumorkapsel auf und sind häufiger multilokulär sowie bilateral zu finden. Der papilläre Typ I zeigt vorwiegend kleine Tumorzellen und meist ein basophiles Zytoplasma. Typ II zeigt größere, im Zytoplasma eosinophile Zellen mit deutlich aggressiverer Malignität.²⁸ Der papilläre Subtyp entwickelt sich aus den distalen Abschnitten des Nephrons.²⁹

Das chromophobe Nierenzellkarzinom:

Die dritthäufigste Untergruppe ist das chromophobe Nierenzellkarzinom mit 6 - 11%.²⁸ Mikroskopisch zeichnet es sich anhand blasser, großer Zellen mit gefalteten Zellkernen aus. Die 5-Jahresüberlebensrate ist bei diesem Subtyp mit 95% am höchsten aller drei genannten Subtypen.²⁸ Der chromophobe Typ entwickelt sich ebenfalls aus den distalen Abschnitten des Nephrons.²⁹

1.1.5 Histologische Varianten der benignen Nierentumore

Im Folgenden werden die häufigsten benignen Nierentumore kurz charakterisiert:

Das Onkozytom:

Mit einem Anteil von 3 - 9% aller Nierentumore ist das Onkozytom der am häufigsten auftretende benigne Nierentumor.³⁰ Makroskopisch zeigen sich Onkozytome gut abgrenzbar, meist solitär, selten synchron multipel auftretend. Histologisch erscheinen die Zellen mit einer zytoplasmatischen Eosinophilie, runden, regelmäßigen Zellkernen, kompakten Wachstumsmuster und ohne peritumorale Kapselbildung.²⁷ Onkozytome werden hauptsächlich spontan im höheren Lebensalter oder hereditär beim BHD-Syndrom beobachtet.³¹ Trotz ihrer grundsätzlich benignen Einstufung können Onkozytome in ihrem Wachstum die Nierenkapsel durchbrechen oder selten in

größere Gefäße infiltrieren.¹⁸ Die präoperative Differenzierung zwischen Onkozytom und malignen Nierentumoren ist durch Bildgebungen häufig nicht eindeutig zu treffen, weshalb es in der Vielzahl der Fälle zur chirurgischen Resektion mit anschließend pathologischer Diagnose dieser Entität kommt.³²

Das Angiomyolipom:

Das Angiomyolipom ist ein familiär im Rahmen der tuberösen Sklerose auftretender, selten sporadisch bedingter, benigner Nierentumor mesenchymalen Ursprungs. Makroskopisch erscheint der abgekapselte Tumor lipochrom-gelblich, bestehend aus einem variablen Aufbau von hauptsächlich Fettzellen, dickwandigen Gefäßen sowie glattmuskulären Zellen. Trotz möglichem verdrängenden Wachstum erfolgt keine Metastasierung.³³ Es können jedoch durch Rupturen der Angiomyolipome, bedingt durch die starke Vaskularisierung der Tumore, lebensgefährliche retroperitoneale Blutungen (Wunderlich-Syndrom) entstehen.¹⁷

Zysten:

Eine der häufigsten Raumforderungen der Niere sind renale Zysten. Etwa 10% der Gesamtpopulation weisen eine zystische Läsion der Niere auf.³⁴ Nierenzysten lassen sich in einfache (benigne) sowie komplexe (potenziell maligne) Nierenzysten einteilen. Einfache Zysten sind rund, glatt, dünnwandig berandet, flüssigkeitsgefüllt und liegen oft unifokal im Kortex.³⁵ Bei komplexen Zysten ist die Abgrenzung zu malignen Nierentumoren, welche ebenfalls in 5 - 7% der Fälle zystisch konfiguriert sein können, herausfordernder.³⁵ Hinweise auf Malignität zystischer Läsionen sind Kalzifizierungen, Septierungen, solide Anteile innerhalb der Zystensäcke, Wandverdickungen und eine erhöhte Dichte in der Computertomographie (CT).³⁵

Die Bosniak-Klassifikation zur Abschätzung des Malignitätsrisikos wird zur Beurteilung der Nierenzysten anhand von CT- Bildern herangezogen. Sie schließt oben genannte Malignitätskriterien mit ein und führt zu einer Kategorisierung zystischer Läsionen in insgesamt fünf Gruppen mit ansteigendem Malignitätsrisiko.³⁶

Die ausführliche Bosniak-Klassifikation ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Bosniak-Klassifikation, modifiziert nach Peter Hallscheidt, Nierenzellkarzinom: Abklärung suspekter renaler Raumforderungen in Onko-Nephrologie, 2020.³⁷

Kategorie	Kriterien und Management
I	Benigne, flüssigkeitsgefüllte, simple Zyste. Hauchdünne Zystenwand, keine Septen, keine Kalzifizierung, keine festen Anteile. In CT und MRT keine KM-Anreicherung
II	Benigne, minimal komplizierte Zyste mit wenigen, dünnen Septen. Keine Kalzifizierung in den Septen oder Zystenwand. Scharf begrenzt. Hyperdense Läsionen: eingedickter, noch homogener Inhalt. Keine KM-Aufnahme
IIF	Komplizierte Zyste, minimale Zystenwandverdickung. Körnige Verkalkungen, noch keine KM-Aufnahme. Verlaufskontrolle empfohlen.
III	Verdickung von Zystenwand oder Septen, inhomogen, ggf. mit KM-Aufnahme im CT DD: infizierte oder eingeblutete Zyste Indikation zur Operation gegeben
IV	Eindeutig zystisches Malignom. Irregulär, solide, KM-aufnehmende Gewebeanteile. Indikation zur Operation.

Abkürzungen: CT = Computertomografie, MRT = Magnetresonanztomografie, KM = Kontrastmittel, ggf. = gegebenenfalls, DD = Differentialdiagnose

1.1.5.1 TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms

Die Stadieneinteilung erfolgt gemäß der TNM - (*Tumor Node Metastasis*) Klassifikation sowie der Klassifikation der „*Union Internationale Contre le Cancer*“- (UICC) von 2017 und ist in den Tabelle 4 und 5 dargestellt.³⁸ Das T-Stadium beschreibt die Ausdehnung des Primärtumors, das N-Stadium das Auftreten von Metastasen in lokoregionären Lymphknoten sowie das M - Stadium das Vorliegen von Fernmetastasen.

Tabelle 4: TNM-Klassifikation modifiziert nach Brierley ³⁹

T	Primärtumor
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Hinweis auf Primärtumor
T1	Tumor auf Niere beschränkt, in größter Ausdehnung <7cm T1a: Tumor ≤4cm T1b: Tumor >4cm aber <7cm
T2	Tumor auf Niere beschränkt, in größter Ausdehnung >7cm T2a: Tumor zwischen 7-10cm T2b: Tumor auf Niere beschränkt, > 10cm
T3	Tumor infiltriert größere Venen oder perirenales Gewebe, jedoch keine Invasion über die Gerota-Faszie hinaus oder der ipsilateralen Nebenniere T3a: Invasion von Nierenvene oder einer ihrer Segmentäste/perirenales und/oder peripelvines Fettgewebe/jedoch nicht über Gerota-Faszie hinaus T3b: Makroskopische Ausbreitung des Tumors unterhalb des Zwerchfells in die Vena Cava T3c: Makroskopische Ausbreitung des Tumors in Vena Cava oberhalb des Zwerchfells oder Infiltration der Vena Cava Wand
T4	Makroskopische Ausbreitung über Gerota-Faszie hinaus (eingeschlossen der Ausbreitung per continuitatem in die ipsilaterale Nebenniere)
N	Regionäre Lymphknoten
Nx	Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Kein regionärer Lymphknotenbefall
N1	Metastase(n) in regionären Lymphknoten
M	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasierung
M1	Fernmetastasierung

Abkürzungen: T = Tumorausdehnung; N = Nodalstatus; M = Fernmetastasen, cm = Centimeter

Tabelle 5: Aktuelle Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms nach UICC; entnommen aus S. Delecluse und S. Zschäbitz, in *Klassifikation und med. Therapie des Nierenzellkarzinoms in Onko-Nephrologie, 2020.*²⁸

Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Fernmetastasen
I	T1 T1a T1b		
II	T2a T2b		
III	T3a T3b T3c		
	T1-3	N1	M0
IV	T4	N0, N1	M1
	Alle T	Alle N	M1

Abkürzungen: T = Tumorausdehnung; N = Nodalstatus; M = Fernmetastasen, UICC = Union Internationale Contre le Cancer

1.1.5.2 Grading

Das einheitliche histopathologische Grading der Nierenzellkarzinome stellt angesichts der vielen Nierentumortypen und verschiedenen morphologischen Eigenschaften eine besondere Herausforderung dar. Zusammen mit dem TNM-Staging ist es jedoch ein wesentlicher klinischer Prognose- und Verlaufsparemeter.⁴⁰

2012 wurde von der Internationalen Society für Urothologie (ISUP) ein neues Gradingssystem vorgeschlagen, welches ausschließlich auf der Beurteilung der Nukleolengröße beruht.

Für das klarzellige und papilläre Nierenzellkarzinom ist dieses Gradingssystem als Prognoseparameter validiert worden.⁴¹ 2015 wurde bei einer WHO - Konsensuskonferenz das WHO - ISUP Gradingssystem als solches für klarzellige und papilläre Nierenzellkarzinome international empfohlen. Für die vielen weiteren Subtypen kann dieses Gradingssystem ebenfalls beschreibend eingesetzt werden.⁴²

Das Grading umfasst folgende vier Kategorien, wobei für die Grade 1 - 3 ausschließlich Größe und Beurteilung des Nukleolus von Bedeutung ist und für Grad 4 die sarkomatoide oder rhabdoide Differenzierung miteinbezogen wird. Tabelle 6 beschreibt die Beurteilungskriterien in der Übersicht.

Tabelle 6: WHO-ISUP-Gradingssystem für Nierenkarzinome. Der Pathologe. 2016, Modifiziert nach H. Moch.

Grading nach WHO/ISUP	
Grad 1	Nukleolen bei 400-facher Vergrößerung nicht oder kaum sichtbar und basophil
Grad 2	Nukleolen bei 400-facher Vergrößerung eindeutig sichtbar und eosinophil
Grad 3	Nukleolen bereits bei 100-facher Vergrößerung eindeutig erkennbar
Grad 4	Ausgeprägte Zellpolymorphien oder rhabdoide/sarkomatoide Differenzierung

Abkürzungen: WHO = World Health Organization, ISUP = International Society für Urothologie

Zur umfassenden Beurteilung und Charakterisierung des Tumors sollte neben dem histologischen Tumortyp und der Tumorgraduierung nach WHO - ISUP in der pathologischen Standardbeurteilung auch das Vorhandensein von Tumornekrosen, eine sarkomatoide/ rhabdoide Morphologie, die lymphovaskuläre Invasion, die Resektionsränder sowie das TNM-Stadium beurteilt werden.²⁸ Diese Kriterien gelten als prognostisch ungünstig, in Zusammenschau kann hiernach die bestmögliche Verlaufseinschätzung erfolgen.

1.1.6 Metastasen

Fernmetastasen sind Zeichen einer fortgeschrittenen systemischen Erkrankung und gehen mit einer schlechteren Prognose einher. Die 5 - Jahres Überlebensraten bei einem UICC Stadium 4 liegen für das Nierenzellkarzinom im Mittel bei 15%.⁴⁰

Bei etwa 20 - 30 % aller Patienten mit Nierenzellkarzinom liegt bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ein metastasiertes Krankheitsbild vor. 20 - 40% aller Patienten, die sich einer kurativ intendierten Nephrektomie unterziehen, zeigen im Verlauf das Auftreten von Metastasen.^{6,40,43}

Die zumeist hämatogene Metastasierung erfolgt hauptsächlich in die Lunge (50 - 60%), den Knochen (30 - 40%), die Leber (30 - 40%) und das Gehirn (5 - 11%). Seltener Orte der

Metastasierung sind Schilddrüse, Herz, Milz oder Pankreas. Diese treten dann meist erst viele Jahre nach Primärmanifestation auf.¹⁸

1.1.7 Klinik & Diagnostik

1.1.7.1 Klinik

Das Nierenzellkarzinom ist in den Frühstadien durch einen asymptomatischen Verlauf gekennzeichnet, sodass heutzutage bis zu 70% aller Nierenzellkarzinome sonographische Zufallsbefunde sind.⁴⁴ Nur etwa 30% der Patienten werden symptomatisch auffällig.⁴⁵ Symptome umfassen insbesondere schmerzlose Makro- oder Mikrohämaturie, Flankenschmerzen, Leistungsknick, Gewichtsverlust und rekurrendes Fieber.^{44,45} Bei bereits stattgehabter Invasion des Gefäßsystems kann bei männlichen Patienten, durch den gestörten Abfluss der testikulären Venen, klinisch eine persistierende Varikozele imponieren.¹⁸ Gelegentlich können auch paraneoplastische Syndrome wie Hyperkalzämie, Hypertonie oder Polyglobulie beobachtet werden.⁴⁴ Die typische Virchow-Trias aus Flankenschmerzen, Makrohämaturie und tastbarer Raumforderung sind nur noch selten und in bereits fortgeschrittenen Erkrankungsstadien zu beobachten.¹⁸

1.1.7.2 Diagnostik

Die körperliche Untersuchung spielt aufgrund des langen asymptomatischen Verlaufs in der Detektion der Tumoren eine untergeordnete Rolle. Bei einem palpablen abdominalen Tumor, neu aufgetretenen unilateralen Ödemen der unteren Extremität oder einer persistierenden Varikozele sollten differentialdiagnostisch jedoch raumfordernde Prozesse im Retroperitoneum ausgeschlossen werden.⁴⁵

Obwohl die Laboruntersuchungen in der Nierenzellkarzinom-Diagnostik oft unspezifisch sind, sollten die Nierenfunktionswerte, Leberwerte und das Blutbild untersucht werden, sowie eine Urindiagnostik erfolgen.¹¹

Anlässlich der präoperativen Resektionsplanung und des Stagings empfiehlt die aktuell gültige S3-Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft eine native Mehrschicht-Computertomographie von Leberkuppe bis Symphyse durchzuführen, gefolgt von Kontrastmittelaufnahmen einer früharteriellen Phase der Nieren bis Beckeneingang, sowie einer venösen Phase von Leberkuppe bis Symphyse.⁴⁶ Liegt der Verdacht auf Gefäßbeteiligung vor, sollte eine Kontrastmittel gestützte MRT (Magnetresonanztomographie) Untersuchung zur besseren Beurteilung der Tumorausdehnung angeschlossen werden.⁴⁶

Ab einer Tumorgöße von 3cm besteht ein relevantes Metastasierungsrisiko, was zur Empfehlung einer Bildgebung des Thorax mittels CT führt.⁴⁶ Weitere Untersuchungen sollten nur bei klinischer Indikation, beispielsweise dem Verdacht auf Hirn- oder Knochenmetastasen erfolgen und mit der entsprechenden Bildgebung evaluiert werden.¹¹

Bei radiologisch unklaren Befunden, oder falls für die Therapieplanung relevant, kann zur Sicherung der Diagnose und histologischen Differenzierung eine Biopsie der renalen Raumforderung durchgeführt werden, insbesondere falls eine lymphatische Erkrankung als Differentialdiagnose möglich erscheint. Ebenso können genetische und molekulare Untersuchungen der Biopsie wichtige Informationen für die Wahl der zielgerichteten Therapie im späteren Erkrankungsverlauf liefern.⁴⁷

1.1.8 Nachsorge (*Follow-up*)

Wie bei allen onkologischen Erkrankungen sollte nach abgeschlossener Therapie eine strukturierte Nachsorge aller Patienten erfolgen.

Laut der deutschen S3-Leitlinie soll die Nachsorge risikoadaptiert erfolgen.⁴⁰ Die Risikogruppen für das nicht-metastasierte Nierenzellkarzinom werden wie folgt definiert.⁴⁰

Tabelle 7: Definition der Risikogruppen des nicht-metastasierten Nierenzellkarzinoms, modifiziert nach gültiger S-3 Leitlinie⁴⁰

Risikogruppe	Charakteristika
Niedrig	pT1a/b, cN0, cM0, G1-2
Intermediär	pT1a/b cN0 cM0 G3 pT2 c/pN0 cM0 G1-2 (ablative Therapie bzw. R1-Situation eines ansonsten <i>low risk</i> Karzinoms)
Hoch	pT2 c/pN0 cM0 G3 pT3-4 u./o. pN+

Abkürzungen: p = pathologische Klassifikation, T = Tumorausdehnung; N = Nodalstatus; M = Fernmetastasen, G = Grading, R1= mit Residualtumor

Für Patienten mit einem organbegrenzten, nicht-metastasierten Nierenzellkarzinom sollten nach der Lokalthherapie des Tumors klinische Untersuchungen, Laborkontrollen, CT/MRT des Thorax/Abdomen und Beckens sowie sonographische Kontrollen angeboten werden.

Je nach Risikogruppe werden diese Untersuchungen in verschiedenen Zeitintervallen durchgeführt.⁴⁸ Bei niedrigem Risiko beträgt die Nachsorge fünf Jahre, bei intermediärem und hohem Risiko neun Jahre mit jeweils engmaschigeren Kontrollen.^{11,40}

Ziele der Tumornachsorge beinhalten die frühzeitige Detektion von Lokalrezidiven, bzw. Rezidiven der kontralateralen Niere und Fernmetastasen, die Beurteilung der Nierenfunktion sowie die Erfassung möglicher Komplikationen der stattgehabten Therapie.⁴⁰

Bei Patienten mit bereits metastasiertem Nierenzellkarzinom ist nicht nur die Therapie, sondern auch die Nachsorge individuell auf den Patienten abgestimmt. Eine geringere Metastasenlast kann mit einem besseren Ansprechen auf eventuelle systemische Therapien einhergehen, weshalb eine engmaschige Betreuung der Patienten anzustreben ist.¹¹ Neben der klinischen Untersuchung und Laborkontrollen sollte unter laufender Systemtherapie eine Schnittbildgebung, vorzugsweise mittels CT im Abstand von 6-12 Wochen zur Verlaufskontrolle durchgeführt werden.⁴⁰ Hierbei gibt es keine prospektiven Daten zum optimalen Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung, die verwendeten Intervalle beruhen meist auf den Studien zur Erstlinientherapie, welche Intervalle von 4-12 Wochen verwendeten.⁴⁹ Neben der onkologischen Kontrolle der Ansprechraten der Systemtherapie mittels Schnittbildgebung sollten jedoch im Rahmen der Nachsorge auch

potenzielle Nebenwirkungen der verfügbaren systemtherapeutischen Ansätze (immunvermittelte Nebenwirkungen wie beispielsweise autoimmune Hepatitis, Pneumonitis, Vaskulitis etc. und TKI vermittelte Nebenwirkungen wie u.a. Hautreaktionen, Bluthochdruck, Leber- und Nierenfunktionsstörungen) beachtet werden und die Schnittbildgebungen durch gezielte Anamnesen, körperliche Untersuchungen und Labordiagnostiken ergänzt werden.

1.1.9 Therapie und molekulare Grundlagen

1.1.9.1 Lokalisiertes Stadium

Standardtherapie des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms ist die kurativ intendierte chirurgische Resektion, sofern dies mit dem klinischen Zustand des Patienten vereinbar ist.¹¹ Sie stellt somit den Hauptpfeiler der Therapie des lokalisierten Nierenzellkarzinoms dar. Bei kleinen Tumoren ist die adäquate Tumorthherapie bei möglichst organschonendem Vorgehen das vorrangige Ziel. Je nach Expertise des Operateurs kann dies offen chirurgisch oder minimalinvasiv durchgeführt werden. Die Entfernung der ipsilateralen Nebenniere soll nicht standardmäßig erfolgen, sondern ausschließlich bei Verdacht auf Infiltration. Ebenso sollte bei unauffälliger Bildgebung, sowie intraoperativ unauffälligem Befund der Lymphknoten auf eine Lymphadenektomie im Rahmen der operativen Therapie verzichtet werden, da bei höherer Invasivität der Operation kein Überlebensvorteil beobachtet werden konnte.^{11,46,50} Lokal fortgeschrittene Nierenzellkarzinome über 7cm Größe oder mit Infiltration der angrenzenden Strukturen sollten chirurgisch en bloc als radikale Nephrektomie mit dem Ziel der R0 Resektion, also der Entfernung des Tumors im Gesunden, therapiert werden.⁵¹

In Bezug auf sehr kleine, zufällig diagnostizierte renale Tumore zeigen einige Studien eine große Heterogenität des Wachstums- und Metastasierungsverhalten dieser Tumore.^{52,45} Daher gewinnen besonders für Patienten mit kleinen Tumoren, welche sich beispielsweise aufgrund von Komorbiditäten keiner Operation unterziehen können, lokale Ablationsverfahren zunehmend an Bedeutung. Zu nennen sind hier die Kryoablation und die Radiofrequenzablation, die sowohl laparoskopisch als auch transkutan durchgeführt werden können. Die EAU *Guidelines* beschreiben ein gutes *Outcome* für kleine Tumore im Stadium T1a, also unter 4cm Größe.¹¹ Im Rahmen von

experimentellen oder individuellen Therapieformen kann die Indikationen für eine *Active Surveillance*, also ein beobachtendes Abwarten mit regelmäßigen Kontrolluntersuchungen, gestellt werden. Dies ist beispielsweise für Patienten mit bereits eingeschränkter Lebenserwartung oder mit erhöhtem Operationsrisiko aufgrund von Komorbiditäten relevant.⁵³

1.1.9.2 Adjuvante Therapie

Trotz Tumorresektion entwickeln etwa die Hälfte aller Patienten im Verlauf ein Rezidiv oder Metastasen. Dies schränkt die Lebenserwartung deutlich ein.⁵⁴

Bisher existiert kein allgemeingültiges Therapieregime zur adjuvanten systemischen Therapie nach Tumorresektion. Die in den aktuellen *Guidelines* enthaltenen Optionen umfassen die *aktive Surveillance* oder das Einschließen in laufende klinische Studien nach der Tumorresektion.¹¹

Eine 2021 veröffentlichte randomisierte, doppelblinde Phase 3 Studie von Choueiri et al. verglich den PD-1Antikörper Pembrolizumab im Vergleich zu einem Placebo-Präparat als adjuvante Therapie an Patienten mit Nierenzellkarzinom nach Tumorresektion. Diese Studie ist die erste Phase III Studie mit einem verbesserten krankheitsfreien Überleben unter adjuvanter Therapie mit Pembrolizumab und zeigte nach 24-Monaten ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben mit 77,3% im Vergleich zu 68,1% in dem Vergleichsarm.⁵⁵ Bis weitere Studienergebnisse diesbezüglich vorliegen sprach die EAU-Gesellschaft eine schwache Empfehlung für die adjuvante Pembrolizumab Therapie für Patienten mit lokalisiertem, hoch-risikoreichem aber operablem Nierenzellkarzinom aus.¹¹

1.1.9.3 Metastasiertes Stadium

Das metastasierte Nierenzellkarzinom geht mit einer schlechten Prognose einher und stellt aufgrund der hohen Strahlen- und Chemotherapieresistenz eine therapeutische Herausforderung dar.⁵⁶ Das initiale Management für Stadium IV Patienten ist abhängig von der Resektabilität des Primärtumors und seiner Metastasen, sowie von den prognostischen Risikofaktoren.

Falls es chirurgisch möglich ist, eine komplette Tumornephrektomie inklusive aller Metastasen durchzuführen, kann auch im fortgeschrittenen Stadium diese Therapie in kurativer Intention angestrebt werden. Auch bei vollständiger Resektion besteht jedoch ein hohes Rezidivrisiko, sodass der Charakter der chirurgischen Therapie im metastasierten Stadium eher in der Verzögerung als in der Vermeidung der medikamentösen systemischen Therapie liegt.

1.1.9.3.1 Systemische Therapien

Lange Zeit standen für das Nierenzellkarzinom aufgrund der hohen Chemo- und Radiotherapieresistenz im metastasierten Stadium nur limitierte Therapieoptionen zur Verfügung. Das wachsende Verständnis der molekularen und genetischen Hintergründe in der Entstehung des Nierenzellkarzinoms ermöglichte jedoch in den letzten zwei Jahrzehnten einen enormen Fortschritt in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms. Die Einführung der neuen Wirkstoffklassen führte dazu, dass das frühere Standardregime des metastasierten Nierenzellkarzinoms, bestehend aus Interferon-Alpha- oder IL-2-Therapie (Interleukin 2) heute weit in den Hintergrund gerückt ist.⁵⁷

Therapierelevant für das metastasierte Nierenzellkarzinom sind aktuell Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), *mechanistic target of rapamycin*-Inhibitoren (mTOR Inhibitoren), sowie *programmed cell death 1/ programmed cell death ligand 1*-Antikörper (PD-1/PD-L1-Antikörper) oder eine Kombination dieser. Hierbei zeigt sich im Hinblick auf die therapeutischen Möglichkeiten allgemein, sowie auf die Auswahl des spezifischen Therapieregimes im Speziellen eine hohe Dynamik, welche auch durch die hohe Anzahl an klinischen Studien in diesem Bereich deutlich wird.⁵⁸⁻⁶¹

1.1.9.3.2 Chirurgische Maßnahmen im fortgeschrittenen Stadium

Der Stellenwert der zytoreduktiven Tumornephrektomie hat durch die Entwicklung der neuen systemtherapeutischen Ansätze, welche im Folgenden erörtert werden, an Relevanz eingebüßt. Die zytoreduktive Tumornephrektomie beschreibt die Entfernung des Primärtumors bei nicht resektablen Metastasen. Im Zeitalter der interferon-basierten Immuntherapie hatte sie durch die

nachgewiesene Verlängerung der Überlebenszeit einen relevanten therapeutischen Stellenwert.⁶² Im Rahmen der großen randomisierten Studien CARMENA und SURTIME konnte die zytoreduktive Therapie jedoch keinen Überlebensvorteil bei Patienten mit intermediärem bis hohem Risiko zeigen.^{63,64} In der CARMENA-Studie wurden insgesamt 450 Patienten mit bestätigtem, metastasierten Nierenzellkarzinom eingeschlossen und anschließend in zwei Gruppen randomisiert. Eine Gruppe wurde mit zytoreduktiver Nephrektomie und anschließender Sunitinib Gabe therapiert, die andere Gruppe erhielt die Sunitinib-Therapie ohne vorherige Nephrektomie. Als primärer Endpunkt galt das Gesamtüberleben. Sunitinib allein zeigte sich laut Studie einer initialen Nephrektomie plus Sunitinib-Therapie nicht unterlegen.⁶³ Die SURTIME-Studie hatte zum Ziel, einen günstigen Zeitpunkt der zytoreduktiven Nephrektomie von Patienten mit synchron metastasiertem Nierenzellkarzinom zu ermitteln. Dazu wurden 99 Patienten in die Studie eingeschlossen und die initiale zytoreduktive Nephrektomie mit anschließender Sunitinib-Therapie in den Vergleich mit einer zeitversetzten Nephrektomie nach bereits drei Zyklen Sunitinib gesetzt. Als primärer Endpunkt galt in dieser Studie das progressionsfreie Überleben. Die sofortige zytoreduktive Nephrektomie zeigte für die Patienten keinen Vorteil bezüglich der progressionsfreien Überlebenszeit.⁶⁴ Die 2020 erschienene Leitlinie der NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) empfahl daher für Patienten einer hohen Risikogruppe, einer großen Metastasenlast oder klarzelliger Histologie des Tumors eine systemische Therapie ohne vorherige zytoreduktive Chirurgie.⁶⁵

Die fortwährende Weiterentwicklung der systemischen Therapieansätze resultierte in der Etablierung Immuntherapie-basierter Substanzklassen. Die erste Therapiewahl für Patienten mit einer intermediären oder hohen Risikoklasse ist mittlerweile eine Immuntherapie-basierte Kombinationstherapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren oder anderen Substanzklassen.¹¹ Während noch auf Ergebnisse von randomisierten Phase III-Studien gewartet wird, zeigen erste Resultate einen Vorteil der Immunbasierten Therapie gegenüber Sunitinib alleine.¹¹ In Zusammenschau mit der CARMENA- und SURTIME-Studie deuten diese Ergebnisse auf einen Vorteil der systemischen Therapie ohne zytoreduktive Nephrektomie für Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom und Patienten der intermediären oder hohen Risikogruppe hin. Weitere Studienergebnisse zeigten jedoch, dass Patienten, bei denen eine systemische Therapie nicht unmittelbar erforderlich war, von einer zytoreduktiven Nephrektomie profitieren können.⁶⁶ Für

Patienten mit gutem Ansprechen auf eine initiale systemische Therapie könnte auch eine zytoreduktive Nephrektomie im Verlauf angeschlossen werden.⁶⁶ Diese neuesten Änderungen unterstreichen noch einmal die Dynamik und Herausforderung der Therapie des Nierenzellkarzinoms.

Die chirurgische Metastasenresektion hat einen festen Stellenwert als Bestandteil der Palliation bei symptomatischen Patienten. Darüber hinaus stehen die oben genannten ablativen Verfahren als palliative supportive Therapie sowie die Bestrahlung als weitere Maßnahmen zur Verfügung.^{11,44,67} Umstritten bleibt der Einfluss der Metastasenresektion auf das Überleben der Patienten; in retrospektiven Analysen deutet sich jedoch ein prognostischer Vorteil an. Eine Studie von Kwak et. al schloss 62 Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom und bereits stattgehabter Nephrektomie ein, welche keiner Immuntherapie zugeführt werden konnten. Analysiert wurde, ob diese Patienten von einer Metastasenresektion profitieren. Es zeigte sich, dass Patienten mit vollständiger Metastasenresektion ein verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten ohne Metastasenresektion aufweisen.⁶⁸ Das tumorspezifische 5-Jahres-Überleben lag laut einer Studie von Alt et al. für Patienten mit kompletter Metastasenresektion bei 49,4%, wohingegen es für Patienten ohne Resektion bei lediglich 13,9% lag.^{68,69} Die aktuellen EAU Leitlinien empfehlen eine Metastasektomie in Zusammenschau mit dem Allgemeinzustand des Patienten, dem Risikoprofil des Eingriffs und dem Wunsch des Patienten.¹¹

1.1.9.4 Molekulare Signalwege des Nierenzellkarzinoms

Um die molekularen Ansatzpunkte der systemischen Therapeutika zu verdeutlichen, folgt ein kurzer Exkurs zu molekularen Signalwegen beim Nierenzellkarzinom.

Exkurs: VHL-HIF-VEGF-Signalweg:

Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist mit einer Mutation im VHL-Gen, dem von-Hippel-Lindau-Gen assoziiert. Das VHL-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3p lokalisiert und ist in 52% der sporadisch auftretenden klarzelligen Nierenzellkarzinome inaktiviert, sowie ebenfalls in dem oben erwähnten Von-Hippel-Lindau Syndrom.⁷⁰ In der physiologischen Zelle trägt das von dem VHL-Gen kodierte Protein pVHL maßgeblich zu dem Abbau des Hypoxie-induzierten Faktors

(HIF) bei. Dieser spielt eine zentrale Rolle bei verschiedenen Steuerungsprozessen der Zelle inklusive pH Kontrolle, Zellmigration, Proliferation und Angiogenese und ermöglicht eine Anpassung an ein hypoxisches Milieu.⁷¹ Bei Verlust dieses Vorgangs akkumuliert HIF in der Zelle und führt zur Transkription von Angiogenese und Zellwachstum stimulierenden Zielgenen. Zu diesen gehören unter anderem die Tyrosinkinase *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *Platelet derived growth factor* (PDGF), welche durch Tyrosinkinase-Inhibitoren gezielt angesteuert werden können.^{72,73} Für die systemische Therapie sind heute mehrere Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie beispielsweise Sorafenib, Sunitinib oder Pazopanib zugelassen.⁶⁵ Eine Übersicht der zugelassenen Substanzen zeigt Tabelle 8. In klarzelligen Nierenzellkarzinomen ist einerseits der Abbau von HIF durch das inaktivierte VHL-Gen reduziert, zusätzlich wurde die übermäßige Synthese von HIF durch Alterationen in der mTOR Signalkaskade nachgewiesen.⁷² Die Aktivierung von mTOR führt, neben der verstärkten Synthese von HIF zu einem erhöhten Zellwachstum und gesteigerter Zellteilung.^{74,75} Somit stellt der mTOR Signalweg ein weiteres Ziel der *Target Therapy* dar und kann mit Temsirolimus und Everolimus, sogenannten mTOR-Inhibitoren, gezielt inhibiert werden. Neben den genannten Optionen der Signaltransduktionsinhibition spielt auch die sogenannte Immuncheckpoint-Inhibitionstherapie eine große Rolle. Grundlage hierfür ist die von renalen Tumorzellen ausgelöste, dysregulierte Immunreaktion des Körpers, in welche therapeutisch eingegriffen wird. Das körpereigene Immunsystem registriert Tumorzellen unter anderem durch die gerichtete, zelluläre Immunantwort von T-Zellen. T-Zellen erkennen anhand von Tumorantigenen diese körperfremden Strukturen und zerstören die Tumorzelle. Das auf T-Zellen exprimierte Checkpoint-Molekül PD-1 ist ein inhibitorischer, immunmodulatorischer Rezeptor, welcher bei Interaktion mit seinem Liganden PD-L1/PD-L2 durch negatives Feedback das Signal zur eigenen Herunterregulation und damit zur Limitation der T-Zellaktivität führt. Die meisten Nierenzellkarzinom-Zellen exprimieren PD-L1/PD-L2 auf ihrer Oberfläche und nutzen diesen Signalweg, um sich der Immunkontrolle durch T-Zellen zu entziehen.^{76,77} Durch Antikörper wie Nivolumab soll die PD-1/PD-L1 Bindung verhindert, und die PD-1 vermittelte antitumorale Immunantwort reaktiviert werden.⁷²

1.1.10 Risikoklassifikation und Therapieentscheidung

Die aktuellen Empfehlungen der *First-/Second-Line*-Therapie beruhen auf den randomisierten, Phase III Studienergebnissen der letzten Dekaden, der Risikogruppe des Patienten, der

individuellen Toxizitätsprofile verschiedener Wirkstoffe und nicht zuletzt auf den klinikinternen Präferenzen des behandelnden Teams.⁷⁸ Weiterhin sind bei der Entscheidung die Zulassungsstadien der Medikamente zu beachten. Hierdurch erklären sich teils unterschiedliche Empfehlungen hinsichtlich der Medikation zwischen den verschiedenen zur Verfügung stehenden *Guidelines* (bspw. NCNN, EAU, S3-Leitlinie).

Allen Leitlinien gemein ist die Notwendigkeit einer initialen Risikoklassifikation vor der therapeutischen Entscheidung. Hier hat sich die Anwendung des sogenannten Motzer Scores (MSKCC-Score) oder dessen Weiterentwicklung, des sogenannten IMDC Score etabliert. Ziel dieser Scores ist es, Patienten mittels festgelegter Parameter in Risikogruppen einzuteilen, und anhand der Risikogruppe eine möglichst akkurate Vorhersage bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit treffen zu können. Die Vorhersagewahrscheinlichkeit der folgenden Modelle beträgt aktuell zwischen 52 - 65%.⁴⁶

Die von Motzer et al. 1999 erstmals publizierte MSKCC-Klassifikation (*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*), teilt Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom anhand von klinischen und laborchemischen Parametern in drei Risikogruppen ein.⁷⁹ Hierbei fließen folgende fünf Parameter ein, welche bei Zutreffen jeweils mit einem Punkt gezählt werden: Der Karnofsky Performance Status (< 80%), die Zeit von Diagnosestellung bis Therapiebeginn einer systemischen Therapie (< 1Jahr), die Serumcalcium-Konzentration (> 10mg/dl), der Hämoglobinwert (< untere Grenze des Normwerts) sowie eine LDH-Erhöhung (Laktatdehydrogenase > 1,5x der Norm).⁵⁶ Bei 0 Punkten ergibt sich ein niedriges Risikoprofil, bei 1 - 2 Punkten ein intermediäres, und ab 3 Punkten ein hohes Risikoprofil. Anhand einer Kohorte von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom und *Second-Line*-Studie, wurde die Klassifikation 2004 von den Autoren auf die drei Faktoren Hämoglobin, Kalziumwert und Karnofsky-Index gekürzt.⁸⁰

Im Zeitalter der *Target-Therapy* wurde durch Heng et. al. ein neues Modell der Risikostratifizierung für Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom unter sowohl *First-Line*- als auch unter *Second-Line*-Anti-VEGF-Therapie entwickelt.⁸¹ Das *International Metastatic Renal Cell Carinoma Database Consortium* (IMDC) Modell schließt vier der fünf oben genannten Kriterien aus dem MSKCC-Modell ein, mit dem Unterschied, dass die Anzahl von Neutrophilen und Thrombozyten die LDH-Erhöhung ersetzen. Auch hier erfolgt die Einteilung in drei Risikogruppen. Patienten mit 0 Punkten werden in die Gruppe mit niedrigem Risikoprofil

kategorisiert, bei 1 - 2 Punkten in die intermediäre, ab 3 Punkten in die hohe Risikogruppe.⁸¹ Dieses Modell weist eine verbesserte Vorhersagewahrscheinlichkeit hinsichtlich der Überlebensprognose der Patienten im Vergleich mit den Motzer-Kriterien auf.^{46,57}

Die Entscheidung des Therapieregimes erfolgt dann anhand der Einteilung in eines der drei Risikoprofile. Tabelle 8 zeigt einen Überblick über die aktuell laut EAU-Leitlinie zur Verfügung stehenden Medikamente in der Erstlinientherapie. Hier zeigt sich, dass die Erstlinientherapie in der Regel in einer Kombinationstherapie besteht, indem mindestens ein Immuncheckpointinhibitor beteiligt ist. Alternativ stehen jedoch bei Kontraindikation für eine solche Therapie auch TKI Monotherapien zur Verfügung.

Tabelle 8: Erstlinien-Therapie des metastasierten NZK; modifiziert nach EAU Guidelines.¹¹

Risikogruppe	Niedriges Risiko	Mittleres Risiko	Hohes Risiko
RF	0 Risikofaktoren nach IMDC	1-2 Risikofaktoren nach IMDC	3 Risikofaktoren nach IMDC
MÜZ	30 Monate	14 Monate	5 Monate

1. Linie	<ul style="list-style-type: none"> - Nivolumab/ Cabozantinib (CPI/TKI) - Axitinib/ Pembrolizumab (TKI/CPI) - Pembrolizumab/ Lenvatinib (CPI/TKI) - (CPI/TKI) 	<ul style="list-style-type: none"> - Nivolumab/ Cabozantinib (CPI/TKI) - Axitinib/ Pembrolizumab (TKI/CPI) - Pembrolizumab/ Lenvatinib (CPI/TKI) - Ipilimumab/ Nivolumab (CPI/CPI) 	<ul style="list-style-type: none"> - Nivolumab/ Cabozantinib (CPI/TKI) - Axitinib/ Pembrolizumab (TKI/CPI) - Pembrolizumab/ Lenvatinib (CPI/TKI) - Ipilimumab/ Nivolumab (CPI/CPI)
	Alternative bei CPI Unfähigkeit: Sunitinib/ Pazopanib	Alternative bei CPI Unfähigkeit: Cabozantinib/ Sunitinib/ Pazopanib	Alternative bei CPI Unfähigkeit: Cabozantinib/ Sunitinib/ Pazopanib

Abkürzungen: MÜZ= mittlere Überlebenszeit, TKI= Tyrosinkinaseinhibitor, CPI= Checkpointinhibitor, RF= Risikofaktoren, IMDC= International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium, NZK= Nierenzellkarzinom

Durch die genannten Kombinationstherapien in der Erstlinie besteht in späteren Therapielinien bei Progress die Schwierigkeit der Wahl der Zweitlinientherapie.

Tabelle 9 zeigt einen möglichen Entscheidungsalgorithmus, welcher sich an der S3 Leitlinie orientiert. Hierbei wird ein „mode of action“ Wechsel, falls möglich, angestrebt.

Tabelle 9: Vorschlag der Zweitlinien-Therapie des metastasierten NZK, modifiziert nach aktuell gültiger S-3 Leitlinie.⁴⁶

Vorthherapie	Leitlinienempfehlung	Optionale Alternative
VEGF/R Inhibitor	Cabozantinib Nivolumab	Lenvatinib/ Everolimus Alternativ anderer TKI

CPI		TKI basierte Therapie (je nach Zulassungsstatus)
CPI/TKI Kombination		TKI basierte Therapie (je nach Zulassungsstatus)
Temserolimus		TKI Nivolumab

Abkürzungen: TKI = Tyrosinkinaseinhibitor, CPI = Checkpointinhibitor, VEGF/R-Inhibitor = Vascular endothelial growth factor/receptor

1.1.11 Prognose-Modelle:

Das Nierenzellkarzinom gilt im Vergleich zu vielen anderen Tumorentitäten als schwierig zu prognostizieren.⁴⁶

Prognostische Faktoren lassen sich in anatomische, histologische, klinische und molekulare Kategorien zusammenfassen. Die anatomischen Faktoren sind in der TNM-Klassifikation beinhaltet. Histologisch relevant sind der Subtyp, der Grad der Entdifferenzierung, Tumornekrose und lymphovaskuläre Invasion.⁸² Eine rhabdoide oder sarkomatoide Differenzierung ist prognostisch ungünstig und äquivalent zum Differenzierungsgrad 4.⁸³

Klinisch existieren je nach Stadium verschiedene Prognosescores für das Nierenzellkarzinom. Im lokalisierten Stadium kann beispielsweise zur Abschätzung der Überlebenschancen der SSIGN-Score angewendet werden. Der SSIGN-Score wurde zur Vorhersage des tumorspezifischen Überlebens von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom entwickelt.⁸⁴ Im Rahmen externer Validierungen betrug die Aussagegenauigkeit des SSIGN-Scores 87%.⁸⁵ Anhand der Berücksichtigung der klinischen Faktoren *Stage*, *Size*, *Grade* und *Necrosis* können Patienten in die Risikogruppen *Gering*-, *Intermediär*- und *Hoch*-risikoreich eingeteilt werden, was Aussagen zur Überlebenschancen erlaubt.^{84,86} So kann das 5-Jahre metastasenfreie Überleben bei Patienten mit der SSIGN-Zuteilung in die Risikogruppe *Gering* mit 97,1% angegeben werden. Für Patienten mit intermediärem Risiko liegt dies bei 73,8% und mit hohem Risiko lediglich bei 31,2%.²⁸

Im metastasierten Stadium finden vor allem die oben beschriebenen Scores (Motzer; IMDC) Anwendung. Weitere prognosebeeinflussende Faktoren sind laut der deutschen Krebsgesellschaft das Intervall bis zum Auftritt der ersten Metastase, eine hohe AP (Alkalische Phosphatase) und

eine fehlende Nephrektomie.⁴⁰ Pulmonale Metastasen haben die beste Prognose der Fernmetastasen, Hirnmetastasen gehen hingegen unbehandelt mit einem medianen Überleben von einem Monat einher.^{69,87}

Neben diesen klinischen Faktoren beschäftigt sich die Forschung intensiv mit der Evaluation weiterer prognostischer Marker, auch auf molekularer Ebene.

Zu erwähnen ist an dieser Stelle der S3-Score. Der S3-Score ermöglicht eine molekulare Risikoeinschätzung für das klarzellige Nierenzellkarzinom.⁸⁸ Er basiert auf der Beobachtung, dass klarzellige Nierenzellkarzinome weniger aggressiv auftreten, wenn sie ein ähnliches Gen-Expressionsmuster wie ihr Ursprungsgewebe aus dem Nephron zeigen.⁸⁹ Für die Etablierung des S3-Scores wurden 97 Signaturgene aus benignen Nephronzellen selektiert und die Ähnlichkeit der Nierentumor-Gene zu den Signaturgenen analysiert.⁸⁸ Der Score zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Genexpression und dem krebspezifischen Überleben der Patienten und bietet einen neuen klinischen Ansatz der Risikostratifizierung für Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom.⁹⁰

Ein molekularer Marker von Relevanz ist auch der Chemokinrezeptor CXCR4, welcher in den EAU Leitlinien von 2022 als molekularer prognostischer Faktor erwähnt wird. Diese Arbeit umfasst die Untersuchung des Expressionsverhalten und der klinischen Relevanz des CXCR4-Rezeptors in malignen und benignen Nierenzelltumoren sowie Metastasen maligner Nierentumore.

1.2 CXCR4

1.2.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine gehören zu der großen Gruppe der Zytokine. Sie entfalten ihre Wirkung über Bindung an spezifische Chemokin-Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen. Bei Bindung wird eine intrazelluläre Signalkaskade veranlasst, was in einer Änderung der Genexpression oder Induktion der Migration, Apoptose oder Proliferation der Zielzelle resultiert.⁹¹

Chemokine sind mit 8-14 kDa (*Kilodalton*) relativ kleine Moleküle. Sie binden an spezifische G-Protein gekoppelte Transmembranrezeptoren (GPCR).⁹² Bisher konnten 48 Chemokine und 23 Chemokin-Rezeptoren identifiziert werden.⁹³ Die Namensgebung und Einteilung der Chemokine in die 4 Subgruppen C, CC, CXC und CXXXC erfolgt anhand ihrer N-terminalen Aminosäuresequenz, wobei C für die Aminosäure Cystein, und X für eine variable Aminosäure steht.⁹⁴

Chemokine sind an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Vorgängen beteiligt. Sie werden von verschiedenen Zelltypen sezerniert und wirken als chemische Lockstoffe für Zellen, die den korrespondierenden Rezeptor an ihrer Oberfläche exprimieren. So migrieren diese Zellen entsprechend des Konzentrationsgradienten an den Ort hoher Chemokinexpression.⁹⁵ Besonders in Inflammationsreaktionen und der Aufrechterhaltung der Homöostase sind Chemokine essentielle Mediatoren.⁹⁶ Sie zeichnen sich durch die Fähigkeit der Aktivierung und Induktion gerichteter Migration von Leukozyten aus. So können Leukozyten durch Chemokine zu Entzündungsherden, Infektionen oder Tumoren gelockt werden. Homöostatisch wirksame Chemokine lenken Leukozyten im Rahmen der Blutbildung ins Knochenmark und den Thymus.⁹⁷ Ebenso spielen sie eine große Rolle in der hämatopoetischen Zellmigration, Virus-Zell-Interaktionen, Angio- und Neoangiogenese.⁹⁶

Aufgrund ihres Einflusses auf die Neoangiogenese sowie der Fähigkeit zur Induktion gerichteter Zellmigration sind Chemokine ebenfalls an der Tumorentstehung und -progression beteiligt.⁹⁵

Chemokinrezeptoren gehören zu der Familie der G-gekoppelten Transmembranrezeptoren (*G protein-coupled receptor*, GPCR) und damit zur größten Familie der membrangebundenen Rezeptoren.⁹⁶ Alle GPCRs sind aus sieben Transmembranhelices aufgebaut, mit denen sie die Zellmembran durchspannen. Ihr N-terminales Ende liegt extrazellulär, wo die meisten Liganden binden. Das C-terminale Ende liegt intrazellulär.⁹⁸ Die Gruppe der GPCRs werden anhand des G-Proteins in vier Hauptklassen eingeteilt: G_{α} , G_q , G_i und G_s . Je nach Klasse aktivieren sie teilweise unterschiedliche Signalwege. Weiter lässt sich der Rezeptor in drei Untereinheiten namens α , β und γ einteilen. Die α -Untereinheit hat im Ruhezustand des Rezeptors ein Guanosindiphosphat (GDP) gebunden, welches bei Bindung des Liganden durch Konformationsänderung dissoziiert und sofort durch ein GTP-Molekül (Guanosintriphosphat) ersetzt wird. Durch diese Aktivierung des Rezeptors kommt es im Anschluss zur Dissoziation des Monomers α und des Dimers $\beta\gamma$, der

Bindung weiterer Effektorproteine und der anschließenden Bildung von Second Messenger cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) und IP3 (Inositol-1,4,5-trisphosphat). Diese wiederum aktivieren verschiedene Signalwege und lösen eine Vielzahl an zellulären Effekten aus.^{98,99} Durch Aktivierung der Rezeptoren kommt es im Allgemeinen zu einer Kaskade von Downstream-Signalen wie der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, sowie der Aktivierung verschiedener Proteinkinasen. Die Namensgebung der Chemokinrezeptoren basiert auf der Subklasse der Chemokine, die an dem Rezeptor binden (bspw. CXC), gefolgt von einem „R“ für Rezeptor und einer Nummer, welche nicht mit der Nummer des Liganden übereinstimmen muss. Viele Chemokin-Rezeptoren können mehrere Chemokine binden, und viele Chemokine können mehr als einen Rezeptor aktivieren.¹⁰⁰

1.2.2 CXCR4 und der Ligand CXCL12

Der Chemokinrezeptor CXCR4 wurde im Jahre 1994 erstmals von Loetscher et al. als LEST-Rezeptor (*leukocyte-derived seven-transmembrane domain receptor*) beschrieben.¹⁰¹

1996 wurde das Chemokin CXCL12 als endogener Ligand entdeckt und der Rezeptor anhand der konventionellen Nomenklatur in CXCR4 umbenannt.¹⁰² Im selben Jahr haben Feng et al. CXCR4 ebenfalls als wichtigen Co-Rezeptor für die Fusion des HI-Virus (Humanes Immundefizienz-Virus) mit CD4⁺ Lymphozyten entdeckt.¹⁰³

CXCR4 wird von einer Vielzahl an Zelltypen exprimiert, besonders von Lymphozyten, lymphatischen Gewebe, Endothel- und Epithelzellen sowie hämatopoetischen, endothelialen, neuronalen und embryonalen Stammzellen, Fibroblasten und auch Tumorzellen.^{99,104} Eine hohe funktionelle Expression des Rezeptors wurde in embryonalen pluripotenten Stammzellen, sowie gewebegebundenen Stammzellen von Nervengewebe, Skelettmuskel, Herz, Leber, Endothel, renalem Tubulusepithel und retinalem Pigmentepithel nachgewiesen.¹⁰⁵ Eine funktionale Expression bedeutet ein gerichtetes Migrieren oder auch Eindringen der rezeptortragenden Zellen entlang des CXCL12 Gradienten.

CXCL12, auch als *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) bekannt, ist ein Chemokin, welches 1993 erstmals als Sekretionsprodukt einer Knochenmarks-Stromazelle von Tashiro et al. beschrieben wurde.¹⁰²

CXCL12 bindet an die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und wirkt als proinflammatorischer Mediator sowie potenter Lockstoff für Lymphozyten und hämatopoetischen Progenitorzellen.¹⁰² Es wird konstitutiv in vielen Geweben exprimiert bzw. sezerniert, einschließlich der Lunge, Leber, Skelettmuskel, Gehirn, Herz, Niere, Haut und Knochenmark. Mehrere Studien zeigten eine erhöhte Chemokin-Sekretion in hypoxischem Gewebe, wie beispielsweise im Rahmen von Myokardinfarkt, Extremitäten Ischämie, toxischem Leberschaden oder nach Chemotherapie.⁹² Es wurde ebenfalls beobachtet, dass ein erhöhtes VEGF in geschädigtem Lebergewebe zu einer Induktion von CXCL12 führt.

Die Bindung von CXCL12 am CXCR4-Rezeptor induziert verschiedene intrazelluläre Signalwege bezüglich Chemotaxis, Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, Zellproliferation und -überleben sowie die Induktion bestimmter Gentranskriptionen.⁹² Die CXCR4/CXCL12 Achse zeigt sich unverzichtbar für die regelrechte, embryonale Zellmigration in der Hämatopoese, Vaskularisation und Organogenese.¹⁰⁴ So zeigten Studien zu CXCR4/CXCL12-Gen-Knockout Mäusen bereits embryonal letale Verläufe aufgrund von fehlerhafter Migration hämatopoetischer Stammzellen, sowie Defekten der Herz- und Gehirn-Differenzierung.^{92,106}

1.2.3 Intrazelluläre Signaltransduktion von CXCR4/CXCL12

Bei Bindung des Liganden CXCL12 an CXCR4 kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors und dadurch zum Austausch von GDP (Guanosindiphosphat) zu GTP (Guanosintriphosphat). Dies bewirkt die Dissoziation der Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta\gamma$, die je nach Gewebe- oder Zelltyp und Klasse des $G\alpha$ -Proteins unterschiedliche Signalkaskaden auslösen. Die CXCR4-gerichtete Zellmigration wird durch die PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) gefördert, welche durch beide Untereinheiten, $G\alpha_i$ und $G\beta\gamma$, aktiviert wird. PI3K reguliert die Zellmigration, Gentranskription und Proliferation durch die Phosphorylierung der AKT. AKT ist eine Serin-Threonin-Kinase, sowie auch ein Protoonkogen und aktiviert und inhibiert weitere Substrate, die dadurch die Proliferation, Transkription und Apoptose der Zelle beeinflussen.⁹⁹ $G\alpha_i$ inhibiert gleichzeitig die Adenylatzyklase, was einerseits zur Reduktion des Second Messengers cAMP führt und andererseits über Signalwege (Ras/Raf/MEK/ERK) den Zellzyklus und dadurch das Überleben der Zelle fördert.¹⁰⁷ Die Untergruppe $G\beta\gamma$ aktiviert die Phospholipase C, diese katalysiert die

Hydrolyse von PIP₂ (Phosphatidylinositoldiphosphat) zu PIP₃ (Phosphatidylinositoltriphosphat) und DAG (Diacylglycerin). PIP₃ fördert die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. DAG aktiviert seinerseits die Proteinkinase C und die MAP-Kinase (*Mitogen-activated protein kinase*), welche positiven Einfluss auf Zellmigration und Zellüberleben nehmen.⁹² Zur intrazellulären Calciumerhöhung, sowie der Transkription verschiedener Zielgene, kommt es bei Ligandenbindung auch unabhängig der Untergruppen durch Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges (Januskinase/*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Allerdings ist dieser Signalweg noch Gegenstand aktueller Forschung und Studien.^{99,108} Ebenfalls durch die Ligandenbindung getriggert, wird CXCR4 von G-Protein gekoppelten Rezeptor-Kinasen phosphoryliert und dadurch der β -Arrestin-vermittelten Internalisierung des Rezeptors zugeführt. Damit kommt die Signaltransduktion zum Erliegen.^{99,109} Im Anschluss kann der Rezeptor recycelt in der Zellmembran eingegliedert, oder im Lysosom dem Abbau zugeführt werden.^{92,99}

1.2.4 Onkologische Relevanz von CXCR4

Mittlerweile kann dem CXCR4-Rezeptor in pathophysiologischer Hinsicht eine bedeutende Rolle in der Tumorprogression zugeschrieben werden. Durch die oben genannten physiologischen Signalkaskaden, aktiviert die CXCR4/CXCL12-Achse bei Expression in Tumorzellen Prozesse, welche die Proliferation, Angiogenese und Metastasierung von Malignomen fördern.^{92,110}

So haben Müller et al. bereits 2001 den Zusammenhang hoher CXCR4-Expression auf Brusttumoren und eine korrespondierende Metastasierung der CXCR4 tragenden Tumorzellen in CXCL12-reiche Regionen im Mausmodell beschrieben. In diesem Modell führte die Neutralisierung der CXCR4/CXCL12-Achse zu einer verringerten Metastasenlast der lokalen Lymphknoten und der Lunge.¹¹¹ Ebenfalls zeigten Mausmodelle zu menschlichem Brustkrebs, aber auch Untersuchungen zu Prostata-Karzinomen, hohe intratumorale CXCL12-Spiegel. Es ließ sich eine chemotaktische Migration von CXCR4-positiven Inflammations-, Gefäß- und Stromazellen in CXCL12-reiche Gewebe beobachten. Die daraus resultierende Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und proangiogenetischen Faktoren unterstützt das Tumorstadium weiter.^{112,113} Schlussfolgern lässt sich hieraus, dass eine erhöhte CXCR4-Expression auf Tumorzellen zu einer gesteigerten Chemotaxis zu Organen mit hohen CXCL12

Spiegeln führt, und somit die Induktion der Fernmetastasierung bedingen kann. Unterstützend dieser Annahme zeigen Organe besonders hohe CXCL12 Level, die typische Lokalisationen der Metastasierung darstellen, wie beispielsweise Gehirn, Knochen, Lungen und Leber.^{104,114} Ishikawa et al. beschrieben 2009 durch Studien an Brusttumoren, dass das schnelle Tumorstadium und die damit einhergehende regionale Hypoxie zu einer lokalen HIF-1 Ausschüttung führt, welche über die Bildung des Transkriptionsfaktors NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) den Reiz zur erhöhten CXCR4-Transkription in Tumorzellen bewirkt.^{115,116} Ein erhöhtes HIF-1 führt ebenfalls zur vermehrten Ausschüttung von VEGF, was seinerseits zusätzlich zur gesteigerten CXCR4-Expression führt, sowie eine gesteigerte Neoangiogenese bewirkt.¹¹⁷ Jiang et al. zeigten anhand von Studien an Osteosarkom-Zellen, den Zusammenhang der CXCR4-aktivierten Signalkaskade PI3K/AKT und Tumorzellproliferation, durch gehemmte Apoptose und stimuliertem Zellzyklus.¹¹⁸

CXCR4 ist ebenfalls auf Krebsstammzellen exprimiert. Hermann et al. berichtete 2007, dass die CXCR4-Expression in pankreatischen Krebsstammzellen eine Schlüsselrolle in dem Prozess der Metastasierung von Pankreastumoren darstelle.¹¹⁹ Gatti et al. untersuchten Glioblastom-Gewebe und zeigten nicht nur, dass die CXCR4/CXCL12-Achse eine bedeutende Rolle in der Proliferation, Invasion und Angiogenese dieser Tumoren spielt, sondern auch, dass auf Krebsstammzellen von Glioblastomen CXCR4 exprimiert ist und dadurch einen Einfluss auf das Metastasierungsverhalten und Resistenz der Tumorzellen zu haben scheint.¹²⁰ Die CXCR4-Expression in Krebsstammzellen verleiht den Tumoren eine höhere Invasivität und verstärktes Metastasierungspotenzial, sowie gesteigerte Überlebens- und Erneuerungsfähigkeit.^{104,120}

Insgesamt liegen Daten vor, dass CXCR4 in 23 Tumorarten überexprimiert ist, darunter in Brust, Prostata, Gehirn, Pankreas, Ovar und Melanomen und eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie dieser Tumore zu spielen scheint.¹⁰⁴ In einigen dieser Tumore wurde die erhöhte CXCR4-Expression als negativer prognostischer Marker identifiziert.¹⁰⁴

1.2.5 CXCR4 in Nierenzellkarzinomen und als prognostischer Marker

Es beschäftigen sich schon seit längerer Zeit Arbeitsgruppen mit dem Chemokinrezeptor CXCR4 in Nierenzellkarzinomen. Schrader et al. veröffentlichten 2002, anhand eines Kollektivs von zehn Patienten, die erste Studie zur CXCR4/CXCL12-Expression in klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Immunhistochemische Färbungen und mRNA (*messenger Ribonucleic acid*) Analysen von zehn Tumorproben, und den korrespondierenden benignen Gewebeproben, zeigten eine heterogene, aber konstante Hochregulation der CXCR4-Expression in Tumorgewebe, verglichen mit normalem Nierengewebe. Durch Messung einer erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentration nach Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden CXCL12, bestätigten Schrader et al. die Funktionalität des Rezeptors in den Tumorzellen.¹²¹ 2003 widmeten sich Staller et al. der Frage, wie Nierentumorzellen den Rezeptor CXCR4 erwerben. Die Ergebnisse ihrer Studie stütze die initiale Hypothese, dass Nierenzellkarzinome mit einem Funktionsverlust des VHL-Gens und resultierender HIF-1 Akkumulation, eine verstärkte CXCR4-Expression aufweisen. Ferner belegte die Studie an 195 Patienten, in univariater Analyse, einen Zusammenhang zwischen hochreguliertem CXCR4 und verkürztem tumorspezifischen Überleben. Mit einer multivariaten Cox-Analyse konnte dies unabhängig von Tumorstadium oder Differenzierungsgrad bestätigt werden.¹²² Die Rolle von CXCR4 und dessen Expression und Funktionalität im Metastasierungsprozess wurde von Wang et al. 2009 evaluiert. Sie analysierten die CXCR4-Expression in primären Nierenzelltumoren, Metastasen sowie benignem Nierengewebe, sowie das subzelluläre Verteilungsmuster des Rezeptors in den unterschiedlichen Gewebearten. Zu beobachten war, dass sich die CXCR4-Expression in Metastasengewebe höher als in Primärtumoren oder benignen Gewebe darstellte. Interessanterweise zeigten Metastasen die CXCR4-Expression vorwiegend im Zytoplasma und im Nukleus, in den Primärtumoren war CXCR4 hauptsächlich membranös lokalisiert. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Expression in Primärtumor, Metastasen und benignem Gewebe, sowie der unterschiedlichen intrazellulären Lokalisation von CXCR4 unterstreicht die mögliche Rolle der CXCR4/CXCL12-Achse im Prozess der Metastasierung von Nierenzellkarzinomen.¹²³

Auch der prognostische Charakter des Chemokinrezeptors wurde von verschiedenen Studien analysiert. Mehrere Veröffentlichungen zeigten bereits, dass eine erhöhte CXCR4-Expression in Nierenzellkarzinomen mit einem schlechten Outcome der Patienten assoziiert ist, und sich der

CXCR4-Rezeptor auch in multivariater Analyse als unabhängiger Prognose-Faktor bestätigt.¹²⁴⁻¹²⁶ Kaplan-Meier Analysen zeigten eine ungünstigere Prognose für Patienten mit starker CXCR4-Expression.^{127,128} Die Arbeitsgruppe Li et al. untersuchten 2011 die prognostische Rolle von CXCR4 im Rahmen der Metastasierung bei LARCC (*locally advanced renal cell carcinoma*). Während die Studie keinen Zusammenhang zwischen CXCR4-Expression und der Metastasierung von Nierenzellkarzinomen nachweisen konnte, zeigte sie eine hohe Expression bei 80% der Patienten mit Tumorprogress. Patienten ohne Progress innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums zeigten nur in 20% eine hohe CXCR4-Expression. Ferner bestätigte auch diese Studie in multivariater Cox-Analyse, dass eine starke CXCR4-Expression mit einem erhöhten Risiko für den Progress des Karzinoms und kürzerem Gesamtüberleben einhergeht.¹²⁹ In einer Veröffentlichung von 2013 untersuchte die Arbeitsgruppe um Li et al. 104 Gewebeproben von klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Wang et al. untersuchten im gleichen Jahr 97 Nierenzellkarzinom-Proben unbekannter Histologie. Es zeigte sich jeweils, dass CXCR4 in uni- und multivariater Analyse einen signifikanten Marker bezüglich des Gesamtüberlebens und tumorspezifischen Überlebens darstellt.^{124,125} Auch Metaanalysen bestätigen bereits eine höhere CXCR4-Expression in Tumorgewebe als in benignem Nierengewebe, einen Zusammenhang zwischen schlechtem Gesamtüberleben bei hoher CXCR4-Expression, sowie eine vermehrte Expression von CXCR4 in metastasiertem Nierenzellkarzinom als in lokalisiertem Nierenzellkarzinom.¹³⁰

1.2.6 CXCR4 in der klinischen Anwendung

In Anbetracht der bedeutenden Rolle der CXCR4-CXCL12-Achse in der Tumorprogression wurden bereits viele Ansätze entwickelt diese Achse therapeutisch zu unterbrechen.

Ein CXCR4-Antagonist, welcher sich bereits im klinischen Einsatz befindet, ist Plerixafor (AMD3100) und wird zur Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen sowie dem multiplen Myelom angewendet.¹³¹

Im Rahmen der Erforschung neuer Therapieansätze für das Nierenzellkarzinom werden aktuell CXCR4-Antagonisten in verschiedenen Studien untersucht.

Ein oral verfügbarer CXCR4 Antagonist (X4P-001), welcher in Xenograft-Modellen die HIF-2alpha Konzentration senkt, wurde bereits in Phase I/II Studien an Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom in Kombination mit Axitinib verabreicht. Die ersten Studienergebnisse deuten auf vielversprechende Überlebenszeiten dieser Kombinationstherapie hin.^{132,133}

In einer randomisierten Phase II Studie von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom wurde der Therapieeffekt der Kombination eines CXCR4 Inhibitors (LY2510924) mit Sunitinib der Sunitinib Monotherapie gegenübergestellt. Diese Studie zeigte keinen Vorteil des Überlebens der Patienten mit der Kombinationstherapie.¹³⁴

Auch in anderen Tumorentitäten wie Brust- und Pankreaskarzinomen sind CXCR4 Antagonisten Gegenstand klinischer Studien.^{135,136} Abschließende Ergebnisse dieser Studien sind noch ausstehend.

Auf Grund der hohen CXCR4-Rezeptor Expression in einer Vielzahl von Malignomen stellt der Rezeptor auch einen interessanten Angriffspunkt als Radiotracer für eine CXCR4-gerichtete Bildgebung, beispielsweise in der Positron-Emissions-Tomographie dar. Ein CXCR4 gerichteter Tracer (PentixaFor) wurde bereits zur Bildgebung an Patienten mit verschiedenen soliden und hämatologischen Neoplasien untersucht und zeigte beispielsweise in Marginal-Zonen Lymphomen gute Ergebnisse.^{137,138} In soliden Tumoren zeigte eine Studie von Werner et al keine eindeutigen Vorteile der CXCR4-gerichteten Bildgebung.¹³⁹

1.2.7 Motivation und Ziele dieser Arbeit

Nierenzellkarzinome stellen etwa 3% aller Tumorerkrankungen weltweit dar und sind besonders im metastasierten Stadium schwer zu therapieren.¹⁴⁰ Obwohl durch zunehmende Bildgebungen Nierenzellkarzinome immer früher entdeckt werden, präsentieren 25 - 30% der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Fernmetastasen. Weitere 30% aller Patienten entwickeln im Verlauf Metastasen.^{6,128} Die Strahlen- und Chemotherapie-Resistenz des Nierentumors limitiert die Therapiemöglichkeiten und führt zu eingeschränkten Lebenserwartungen mit einer 5 Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von nur etwa 15% bei fortgeschrittenem Tumorstadium.⁴⁶ Trotz verbesserten Therapieansätzen innerhalb der letzten zwei Dekaden, durch sogenannte *Target-*

Therapy und *Immunotherapy*, erleiden die meisten Patienten im Verlauf einen Rückfall und versterben letztendlich an den Folgen des Nierenzellkarzinoms. Des Weiteren weisen einige Patienten mit vergleichbaren klinischen und pathologischen Merkmalen, unterschiedliche Verläufe und Outcomes auf.¹⁴¹ Die aktuell verwendeten prognostischen Modelle basieren hauptsächlich auf klinischen und pathologischen Faktoren. Molekulare Aspekte werden bislang nicht berücksichtigt.

Diese Gründe betonen die Notwendigkeit Nierenzellkarzinome frühzeitig zu erkennen und auch auf Basis molekularer Signalwege effektivere Therapieregimes zu entwickeln. Um die Risikostratifizierung von Patienten mit Nierenzellkarzinomen zu verbessern, gilt es weitere prognostische Marker zu identifizieren.¹²⁸

Die prognostische Wertigkeit des Chemokinrezeptors CXCR4 wurde bereits für einige Tumorentitäten belegt.¹⁰⁴ In Nierenzellkarzinomen wurde die prognostische Relevanz von CXCR4 noch nicht ausreichend validiert.^{95,96} Verschiedene Studien untersuchten die subzelluläre CXCR4 Distribution in Nierenzellkarzinomen anhand immunhistochemischer Analysen. Während jedoch einige Autoren die Rezeptorexpression hauptsächlich membranös bestätigten, wiesen andere Studien eine starke zytoplasmatische oder nukleäre Lokalisation des Rezeptors nach.^{123,124,128,129} Eine umfassendere Kenntnis über die intrazelluläre Lokalisation von CXCR4 in Nierentumoren und Metastasen könnte mehr Aufschluss über den Einfluss des Rezeptors in der Tumorentstehung und -progress, sowie dem Metastasierungsprozess geben. Darüber hinaus wird der CXCR4/CXCL12 Achse auch ein therapeutisches Potential zugeschrieben: In Mausmodellen mit Brustkrebszellen zeigte eine Blockade der CXCR4/CXCL12 Achse einen deutlich verringerten Metastasierungsprozess.¹¹¹ Basierend hierauf sowie auf den oben geschilderten Ausführungen der bisherigen Arbeiten zu CXCR4 im Nierenzellkarzinom, liegen der vorliegenden Arbeit folgende Hypothesen zu Grunde:

Maligne Nierentumore zeigen eine höhere CXCR4-Expression als benignes Gewebe.

Metastasen weisen, möglicherweise als Hinweis auf eine höhere biologische Aggressivität, eine stärkere CXCR4-Expression als Primärtumore auf.

Weiter stellt CXCR4 für klarzellige Nierenzellkarzinome einen negativen prognostischen Faktor dar.

Für die vorliegende Arbeit wurden drei unabhängige Nierentumorkollektive in Form von Tissue Micro Arrays (TMA) aufbereitet und anhand immunhistochemischer Färbung auf zytoplasmatische und nukleäre CXCR4-Expression untersucht. Ziel dieser Arbeit ist die umfassende Analyse der CXCR4-Expression in primären Nierenzellkarzinomen und Metastasengewebe, sowie in weiteren histologischen Subtypen maligner und benigner Genese. Darüber hinaus wird die subzelluläre Distribution analysiert, wie auch der prognostische Charakter von CXCR4 bezüglich des Gesamt- und tumorspezifischen Überlebens in klarzelligen Nierenzellkarzinomen.

Ein genaueres Verständnis der CXCR4-Expression und dessen funktionellen Auswirkungen könnten in einer optimierten Prognose-Genauigkeit resultieren. Dies würde einerseits zu einer verbesserten Aufklärung der betroffenen Patienten und deren Angehörigen führen, als auch die bisher limitierten Therapieoptionen potenziell erweitern.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Die vorliegende Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Tübingen geprüft. Ein positives Ethikvotum konnte erteilt werden (Ethiknummer: 078/2012B02).

2.2 Patientenkollektive

Für die vorliegende Studie konnten drei voneinander unabhängige Kollektive aus Nierentumoren sowie Metastasen der Klinik für Urologie in Tübingen erstellt werden. Im Folgenden wird auf die Charakteristika des jeweiligen Kollektivs detailliert eingegangen.

2.2.1 Klarzelliges Nierenzellkarzinom Kollektiv (Kollektiv 1)

Kollektiv 1 umfasst das histologische Material von 64 Patienten mit primär klarzelligem Nierenzellkarzinomen, welche zwischen 05/2008 bis 04/2010 an der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen in kurativer Intention operiert wurden. Bei 39 Patienten wurde eine Nephrektomie durchgeführt, bei 25 Patienten eine Nierenteilresektion. Es wurden die korrespondierenden histologischen Gewebeproben im Institut für Pathologie und Neuropathologie identifiziert und nach unten genanntem Vorgehen histologisch aufgearbeitet.

Die klinischen und pathologischen Daten, sowie das *Follow-Up* der Patienten wurden in eine Datenbank aufgenommen. Hierfür wurden folgende Parameter erhoben:

Allgemeine Parameter/Patientendaten:

- Alter
- Geschlecht
- Operationsdatum

Tumorausdehnung:

- Größe des Primärtumors (cm)
- Tumorausdehnung (T)
- Nodalstatus (N)
- Metastasenstatus (M)
- Veneninfiltration
- Lymphovaskuläre Infiltration
- R0/R1 Resektionsstatus

Tumormorphologie:

- Grading
- Tumornekrose
- Sarkomatoide Differenzierung

Follow up:

- Nachbeobachtungszeit in Monaten nach Erstdiagnose
- Todesdatum
- Nierenzellkarzinom-abhängiger Tod

Pro Patient wurde an zwei markierten Tumorarealen Gewebeproben zur Herstellung der Tissue Micro Arrays entnommen. Ein besonderes Interesse galt der Fragestellung, inwieweit CXCR4 in seiner Expression zwischen benignem und malignem Gewebe variiert. Daher wurde neben den Tumorarealen auch explizit als gutartig identifizierte Areale entnommen und zur Analyse in Form von Tissue Micro Arrays aufbereitet. Für 59 Patienten dieses Kollektivs konnten korrespondierende benigne Areale gewonnen und untersucht werden.

2.2.2 Nierentumorkollektiv verschiedener histologischer Genesen (Kollektiv 2)

Kollektiv 2 wurde aus 146 Patienten mit verschiedenen benignen und malignen Nierenraumforderungen zusammengestellt, welche in dem Zeitraum von 01/12 bis 06/13 am Universitätsklinikum Tübingen reseziert wurden. Eingeschlossen und verglichen wurden hierbei Raumforderungen verschiedener Histologien. Diese umfassten klarzellige, papilläre und chromophobe Nierenzellkarzinome sowie benigne Raumforderungen wie Onkozytome, Angiomyolipome und Zysten. Dieses Kollektiv diente der Analyse der CXCR4-Expression in Abhängigkeit der histologischen Variante des Nierentumors.

Dazu wurden für jeden Patienten ebenfalls zwei Gewebeproben der tumorösen Raumforderung, sowie eine benigne Gewebeprobe entnommen und als TMAs aufbereitet.

Die unter 2.2.1 genannten klinischen und pathologischen Daten der Patienten wurden auch für dieses Kollektiv in eine Datenbank aufgenommen. Eine Übersicht der relevanten Charakteristika findet sich in Tabelle 19 im Kapitel 3.2.1.

2.2.3 Metastasenkollektiv (Kollektiv 3)

Kollektiv 3 umfasst Operationsresektate von Metastasen von 92 Patienten. Die syn- bzw. metachrone Metastasenresektion wurde am Universitätsklinikum Tübingen im Zeitraum von 1990 bis 2011 durchgeführt. Pro Patient konnten Metastasen von einer bis drei Lokalisationen entfernt werden, sodass insgesamt Gewebe von 137 Metastasen für dieses Kollektiv eingeschlossen wurden. Ziel war die Evaluation der unterschiedlichen zytoplasmatischen und nukleären CXCR4-Expression in den verschiedenen Lokalisationen der Metastasen. Die unter 2.2.1 genannten klinischen und pathologischen Daten wurden erfasst. Eine Übersicht der relevanten Charakteristika zeigt Tabelle 26 im Kapitel 3.3.1.

2.3 Untersuchungsmaterial

Die für diese Studie eingeschlossenen Resektate wurden jeweils nach der Operation in Paraffin fixiert und in den Archiven des Instituts für Pathologie und Neuropathologie des Uniklinikum Tübingens gelagert. Die zugehörigen Gewebelöcke der in die drei Kollektive eingeschlossenen Patienten wurden aus den Archiven herausgesucht. Es wurden bereits für die klinische Diagnostik Hämatoxylin-Eosin-(HE) Übersichtsfärbungen der jeweiligen Resektate angefertigt, welche ebenfalls im Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie gelagert und für die Analyse herausgesucht wurden. Die HE-Schnitte konnten in der Pathologie Tübingen mikroskopiert werden. Es wurden jeweils zwei Tumorareale, sowie korrespondierendes benignes Gewebe identifiziert und für die anschließende Erstellung der Tissue Micro Arrays markiert.

2.3.1 Besonderheiten des klarzelligen Kollektivs (Kollektiv 1)

Für die CXCR4-Expressionsanalyse wurden 64 Resektate von klarzelligen Nierenzellkarzinomen bereitgestellt. Durch die Aufbereitung von jeweils zwei Proben des Tumorgewebes, sowie für 59 Patienten ebenfalls einer Probe des unveränderten Nierengewebes, konnten insgesamt 187 *Cores* (Gewebeproben) analysiert werden.

2.3.2 Besonderheiten des Nierentumorkollektivs (Kollektiv 2)

Das Charakteristikum des Nierentumorkollektivs besteht in der histologischen Diversität der eingeschlossenen Resektate. Neben malignen Nierentumoren konnten auch benigne Raumforderungen auf ihre CXCR4-Expression untersucht werden. Von den 146 eingeschlossenen Resektaten waren 108 maligner und 33 benigner Genese. Für fünf Resektate war die Histologie unbekannt. Auch in Kollektiv 2 wurden jeweils zwei Areale der tumorösen Raumforderung, sowie eine Vergleichsprobe aus unverändertem Nierengewebe für die Erstellung der TMAs entnommen. Damit konnten aus diesem Kollektiv 438 *Cores* histologisch untersucht und analysiert werden.

2.3.3 Besonderheiten des Metastasenkollektivs (Kollektiv 3)

Kennzeichnung des dritten Kollektivs ist die alleinige Zusammenstellung von Metastasen primärer Nierenzellkarzinome. Die Gesamtheit des Kollektivs umfasst 92 Patienten. Als Histologie des Primärtumors wiesen 83 Patienten ein klarzelliges, drei Patienten ein papilläres und zwei Patienten ein chromophobes Nierenzellkarzinom auf. Für vier Patienten konnte die Histologie des Primarius nicht eruiert werden. Die Patienten wiesen an bis zu drei verschiedenen Orten lokalisierte Metastasen auf, sodass insgesamt 137 Metastasen in die Analyse einfließen konnten. Es wurden pro Metastase jeweils zwei Gewebeproben für die Erstellung der TMAs gewonnen, wodurch 274 *Cores* dieses Kollektivs untersucht werden konnten. Eine Übersicht der Kollektive zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10: Übersicht der Kollektive und der untersuchten Gewebeproben.

Kollektiv	Kollektiv 1	Kollektiv 2	Kollektiv 3
Eigenschaften	Klarzelliges NZK Kollektiv	Nierentumorkollektiv verschiedener Histologien	Metastasenkollektiv primärer NZK
Patienten	64	146	92
OP-Zeitraum	05/08 – 04/10	01/12 – 06/13	1990 – 2011
Untersuchtes Gewebe	Tumorgewebe klarzelliger NZK - 64 Proben verfügbar Benigne Areale - 59 Proben verfügbar	Maligne Primärtumore - 108 Proben verfügbar Benigne Primärtumore - 33 Proben verfügbar Unbekannt: - 5 Proben verfügbar	Metastasengewebe - 137 Proben verfügbar
Zusammensetzung der evaluierten <i>Cores</i> des TMA	Je 2x <i>Cores</i> aus malignem Gewebe = 128 <i>Cores</i> Je 1x <i>Core</i> aus benignem Gewebe = 59 <i>Cores</i>	Je 2x <i>Cores</i> aus 108 malignen Primärtumoren = 216 <i>Cores</i> Je 1x <i>Core</i> aus korrespondierendem benignem Gewebe = 108 Je 2x <i>Cores</i> aus 33 benignen Primärtumoren = 66 Je 1x <i>Core</i> aus benignem unverändertem Nierengewebe = 33 2x <i>Cores</i> aus 5x nicht identifizierbarem Primärtumor = 10	Je 2x <i>Cores</i> der 137 Metastasen

		Je 1x <i>Core</i> aus benignem Gewebe der nicht identifizierbaren Tumore = 5	
Insgesamt evaluierte <i>Cores</i> im TMA	187 <i>Cores</i>	438 <i>Cores</i>	274 <i>Cores</i>

Abkürzungen: NZK=Nierenzellkarzinom, OP=Operation, TMA=Tissue Micro Array

2.4 Erstellung der Tissue Micro Arrays (TMA)

Die Gewebeaufbereitung mittels Tissue Micro Array ist ein Verfahren, welches die gleichzeitige Färbung vieler Gewebeproben erlaubt und bereits 1998 von Kononen et al. beschrieben wurde.^{142,143}

Zur Erstellung der TMAs wird aus vorliegenden *Donor*-Blöcken an einer repräsentativen Stelle eine zylindrische Gewebeprobe (*Core*) ausgestant und auf einen leeren *Recipient*-Paraffinblock übertragen.¹⁴⁴ Um die intratumorale Heterogenität auszugleichen werden meist zwei bis drei Stanzen pro Gewebeprobe entnommen. Je nach Durchmesser der *Cores* und Beschaffenheit des Gewebes können bis zu 1000 Proben auf einem *Recipient*-Block Platz finden.¹⁴⁴ Die TMA-Technik stellt somit ein effizientes und kostengünstiges Verfahren für die gleichzeitige immunhistochemische Analyse großer Gewebekollektive dar.¹⁴³

Für das Herstellen der vorliegenden TMAs wurde im Urologischen Labor der Universitätsklinik Tübingen das TMA-Gerät MTA I von *Beecher Instruments* (Silver Springs, USA) verwendet. Die zu untersuchenden Gewebeproben waren zur histopathologischen Aufbereitung in konventionellen Paraffinblöcken eingebettet. Tumorareale und korrespondierende benigne Areale wurden anhand der markierten HE-Schnitte identifiziert. Zur Vorbereitung des *Recipient*-Blocks wurde mittels einer 600µm dicken Hohladel ein 2mm tiefes Loch in den noch leeren Paraffinblock gestant. Von dem zu analysierenden Gewebe wurde anschließend mit einer ebenfalls 600µm dicken Hohladel eine 2mm tiefe Gewebeprobe entnommen und in den Hohlraum des *Recipient*-Blocks eingesetzt. Mit einem Mittelpunkt-zu-Mittelpunkt Abstand von 1,4mm wurden in dieser Technik bis zu 132 *Cores* in einen *Recipient*-Block eingebracht.

Jedem *Core* wurde auf dem TMA-Block eine genaue Koordinate zugeteilt und in einem Lageplan eindeutig festgehalten. Um eine ausreichende Stabilität der *Cores* im *Recipient*-Block herzustellen, wurde dieser anschließend für 10 – 20 Minuten im Wärmeschrank inkubiert. Dadurch erfolgte die feste Einschmelzung der *Cores* in den Block, was das darauffolgende Schneiden mittels Microtom in 5µm Schnitte ermöglichte. Nach der Glättung der Schnitte in einem 48°C warmen Wasserbad wurden diese auf einen Objektträger aufgezogen und auf einer Wärmeplatte getrocknet. Anschließend konnten die erstellten TMAs der immunhistochemischen Färbung zugeführt werden. Durch die simultane Färbung aller *Cores* eines TMAs bietet dieses Verfahren eine besonders hohe Homogenität der Färbeergebnisse und somit eine gute Vergleichbarkeit durch stets gleiche Umwelteinflüsse.¹⁴³

2.5 Immunhistochemische Färbung

Die Analyse von Gewebeproben (TMA) auf in-situ Proteinexpression mittels Immunhistochemie ist aktueller Goldstandard. Mit Hilfe von Antikörpern wird die Proteinexpression in den jeweiligen Zellkompartimenten direkt sichtbar gemacht. Die zu untersuchenden Gewebeproben werden mit einem ersten, proteinspezifischen *Target*-Antikörper gefärbt. Anschließend wird mit einem zweiten Antikörper gegengefärbt, welcher direkt gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Dieser zweite Antikörper ist markiert, um die Expression des zu untersuchenden Proteins indirekt sichtbar zu machen. Beispielsweise kann zur Markierung ein Fluoreszenz-Farbstoff verwendet werden.¹⁴⁵

Die Färbungen für die vorliegende Arbeit wurden von Hand am Institut für Pathologie und Neuropathologie in Tübingen durchgeführt.

Die TMA-Schnitte wurden in absteigenden Alkoholbädern entparaffiniert. Das nun für die Weiterbehandlung zugängliche Gewebe wurde anschließend mit einem *TEC-Puffer* (pH 9; Tris, EDTA, Citrat-Puffer) für fünf Minuten in einem geschlossenen Presskochtopf bei 120°C gekocht. Nach Abkühlen der Schnitte und kurzem Spülen in destilliertem Wasser gegen Kristallbildung, wurden sie mit *Wash-Buffer* gespült.

Für die Detektion wurden die Schnitte erneut mit *Wash-Buffer* (2x5 min) gespült und anschließend fünf Minuten einer *Blocking Solution* ausgesetzt (Zytomed). Der CXCR4-Antikörper (Abcam,

ab124824, Klon: UMB2) wurde 1:100 in Antikörperverdünner (*Antibody Diluent*) auf die Schnitte pipettiert und anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurden die TMAs erst dem sekundären Antikörper (Zytomed) für 30 Minuten, daraufhin dem Konjugat, ebenfalls für 30 Minuten und abschließend dem Farbstoff *DAB* (3,3'-Diaminobenzidin) für 2x5 Minuten ausgesetzt. Zwischen diesen Schritten wurden die Schnitte jeweils 2x5 Minuten im *Wash-Buffer* gespült. Nach zweiminütigem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit *Papanicolaou*-Lösung gegengefärbt und anschließend dreimal mit Leitungswasser gespült und in Ethanol-Ammoniak (200ml 70% EtOH + 6ml NH₃) geschwenkt. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte mit dem *Mounting Medium* (Zytoseal XYL) eingedeckt.

Die genauen Angaben zu den verwendeten Materialien und Lösungen sind in Tabelle 11 nachzuvollziehen.

Tabelle 11: Materialien und Lösungen der immunhistochemischen Färbung der Tissue Micro Arrays.

Lösungen	Hersteller: Firma/Land	Erkennungsnummer bzw. Zusammensetzung
Tec-Puffer	Von Hand	pH 9; Tris, EDTA, Citrat-Puffer
Wash-Buffer (Spüllösung)	Zytomed Systems GmbH/Berlin, Germany	Cat. No.: ZUC020-500
CXCR4-Antikörper	Abcam Berlin/Germany	Abcam, ab.:124824 Klon: UMB2 Wirt: Rabbit monoclonal Konz.: 2,38mg/ml 39274-4
Antibody Diluent	Zytomed Systems GmbH/Berlin, Germany	Cat. No.: ZUC025-100
Detektionskit: Blocking Solution + Post Block + HRP – Polymer = ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit	Zytomed Systems GmbH/Berlin, Germany	Ref./Cat. No.: POLHRP -100
DAB Farbstoff (3,3'- Diaminobenzidin)	Zytomed Systems GmbH/Berlin, Germany	Cat. No.: DAB057 DAB Chromogen (flüssiges DAB-Konzentrat) + DAB-Substrate (Substratpuffer)
Papanicolaou Färbelösung	Sigma-Aldrich/Darmstadt, Germany	Art. 109253/Art. 109254
Mounting Medium	Thermo Scientific "Richard-Allan Scientific" Cytoseal™ XYL/ Kalamazoo, Michigan	Ref.: 8312-4

Abkürzungen: Cat. No = Katalog Nummer, Ref. = Referenznummer, Art. = Artikelnummer

2.6 Auswertung der Tissue Micro Arrays & Erfassung der Färbeintensitäten

Um die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten CXCR4 TMA-Schnitte digital vorzunehmen, wurden diese mit dem *Leica Biosystems Slide Scanner SCN400* (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) eingescannt. Dadurch war die Betrachtung der TMAs über den Computerbildschirm mit der Software *Aperio ImageScope ePathology* (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) möglich.

Die Auswertung der TMAs in der vorliegenden Arbeit erfolgte zweistufig. Zunächst wurde eine Skala der Färbeintensität von 0 – 3 angelegt, wobei die Skalierung von 0 = *nicht gefärbt*, 1 = *leicht*, 2 = *mäßig* bis 3 = *stark gefärbt* reichte. Aufgrund limitierter Abstufung der Färbeintensität in den Kernen wurde diese Skalierung nur für die zytoplasmatische CXCR4-Expression angewendet. Die nukleäre Expression wurde dichotom in die Kategorien „*angefärbt*“ und „*nicht angefa*rbt“ eingeteilt. Es erfolgte nun die einzelne Betrachtung der *Cores*. Hier wurde die zytoplasmatische Expression mittels der Intensitätsskala 0 - 3 bewertet. Die nukleäre Färbung wurde dichotomisiert wie oben beschrieben bewertet in positive, beziehungsweise negative Färbung. Die erhobenen Daten wurden in zugehörigen Datentabellen festgehalten.

Im zweiten Schritt erfolgte in einem zufällig ausgewählten Referenzareal eine Auszählung des genauen Anteils (0 - 100) der angefarbten Zellen bzw. Zellkernen. Für die zytoplasmatische Expression von CXCR4 konnte so durch die Multiplikation der Färbeintensität (0 - 3) mit dem Prozentsatz der Zellen, welche eine positive Immunfärbung aufweisen (Anteil der gefärbten Zellen 0 - 100), ein Immunreaktivitäts-Score (IRS) erstellt werden. Der Gesamtscore des IRS bewegt sich demnach zwischen 0 - 300.^{146,147}

$$\text{IRS} = (\text{Intensität der Färbung}) \times (\text{Anteil gefärbter Zellen})$$

Für die nukleäre Expression wurde, ebenfalls in dem zuvor zufällig gewählten Referenzareal, ausschließlich der Anteil der gefärbten Kerne durch Auszählung beurteilt und festgehalten. Dies ergibt eine Expressionsskalierung für die nukleäre CXCR4-Färbung von 0 - 100. Ein IRS-Expressionsscore wurde für die nukleäre CXCR4-Expression nicht erstellt.

Alle erhobenen Werte wurden in die korrespondierenden Patientendatentabellen übertragen und nachfolgend mit den entsprechenden Patientendaten verglichen.

Aufgrund von Gewebeschäden einzelner *Cores* in der Aufbereitung konnten einige der erstellten Proben nicht adäquat beurteilt und dementsprechend nicht in die Analyse eingeschlossen werden.

Die Auszählung wurde von der Doktorandin verblindet durchgeführt und die Resultate unabhängig von einem erfahrenen Untersucher (Doktorvater) validiert. Bei größerer Differenz der Resultate wurde die Auszählung wiederholt. Die Entität der *Cores* war bei der Betrachtung nicht ersichtlich. Beispielhaft ist eine Übersicht eines *Cores* in Abbildung 1 gezeigt.

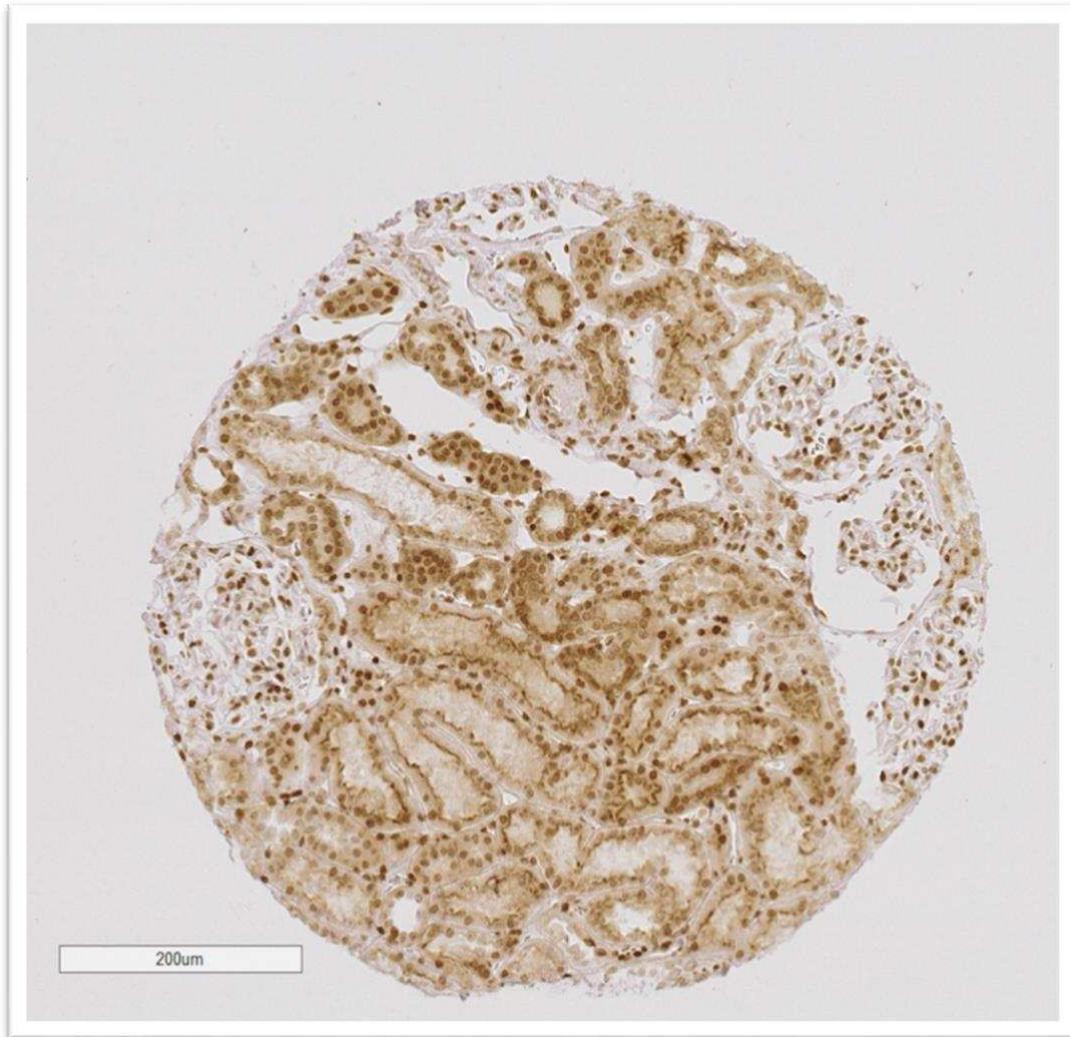


Abbildung 1: Exemplarische Darstellung eines Cores in der Übersichtsaufnahme des Programms Aperio ImageScope ePathology in 10-facher Vergrößerung.

Abbildung 2 zeigt exemplarisch die verschiedenen Intensitäten der zytoplasmatischen Färbung in aufsteigender Intensität.

Abbildung 3 stellt exemplarisch die Kategorien der nukleären Färbung „nicht angefärbt“ und „angefärbt“ dar.

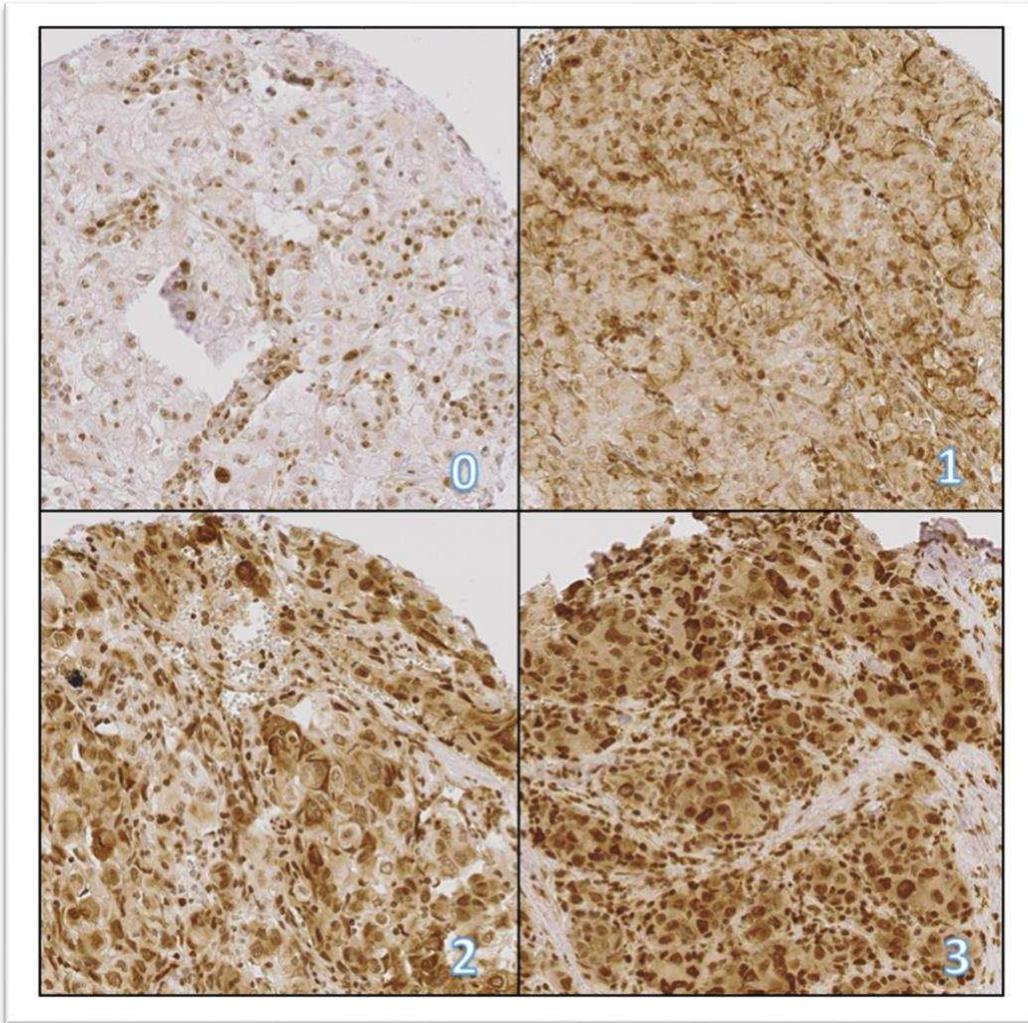


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung der verschiedenen Intensitäten der immunhistochemischen Färbung in aufsteigender Intensität (aus Metastasen-Kollektiv, zytoplasmatische CXCR4-Färbung mit Intensitäten von 0-3, 20-fache Vergrößerung).

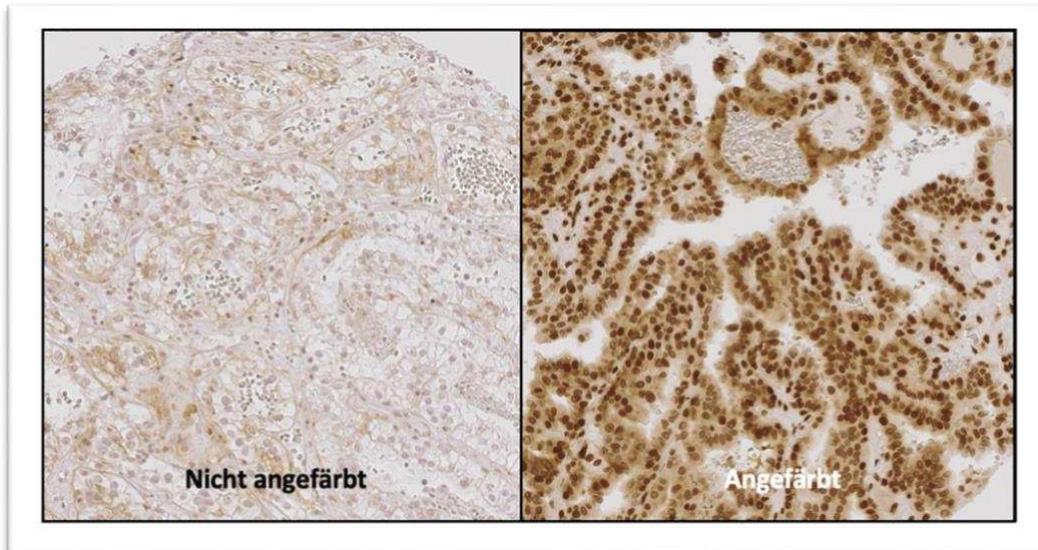


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der nukleären immunhistochemischen Färbung (aus Nierentumor-Kollektiv: nukleäre CXCR4-Färbung, Kategorien: „nicht angefärbt“ und „angefärbt“, 20-fache Vergrößerung).

2.7 Klinische Daten und Statistische Auswertung

2.7.1 Klinische Daten

Die klinischen Daten der Patienten wurden aus dem Krankenhaus internen Informationssystem ISH erhoben und kategorisiert in Datentabellen festgehalten. Das Follow-up wurde durch telefonische Kontaktaufnahme aktualisiert, das Datum des Telefonats fungierte hierbei als Datum des letzten *Follow-ups*. Bei telefonisch nicht kontaktierbaren Patienten wurde der aktuellste dokumentierte Klinikkontakt im ISH als Datum des letzten *Follow-ups* verwendet.

2.7.2 Statistische Auswertung der Tissue Microarrays

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die statistische Auswertung des Kollektiv 1&2 jeweils eine maligne Gewebeprobe und eine benigne Gewebeprobe der untersuchten Resektate in die Analysen mit aufgenommen. Für Kollektiv 3 floss ebenfalls eine Gewebeprobe pro Lokalisation in die Analyse ein. Tabelle 12 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit analysierten Gewebeproben.

Tabelle 12: Übersicht der Kollektive und der analysierten Gewebeproben.

Kollektiv	Kollektiv 1	Kollektiv 2	Kollektiv 3
Untersuchtes Gewebe	Tumorgewebe klarzelliger NZK - 64 Proben verfügbar Benigne Areale - 59 Proben verfügbar	Maligne Primärtumore - 108 Proben verfügbar Benigne Primärtumore - 33 Proben verfügbar Unbekannt: - 5 Proben verfügbar	Metastasengewebe - 137 Proben verfügbar
In Analyse eingeschlossenen Gewebeproben	64 Cores aus malignem Gewebe 59 Cores aus benignem Gewebe	108 Cores aus malignen Primärtumoren 108 Cores aus benignem unverändertem Nierengewebe 33 Cores aus benignen Primärtumoren 33 Cores aus benignem unverändertem Nierengewebe 5 Cores aus nicht identifizierbarem Primärtumor 5 Cores aus benignem Gewebe der nicht identifizierbaren Tumore	Je 1 Core der 137 Metastasen
Insgesamt ausgewertete Cores	123 Cores	292 Cores	137 Cores

Abkürzung: NZK=Nierenzellkarzinom

Für jedes der drei Kollektive wurde zunächst die absolute CXCR4-Expression zytoplasmatisch und nukleär analysiert.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden als positive zytoplasmatische Expression die Kategorien *schwach*, *mittel* und *stark angefärbt* gewertet. Die nukleäre Expression, mit einer Expressionskala von 0 - 100, kann in negative Expression 0 und positive Expression 1 - 100 unterteilt werden. Falls

angegeben wurden zusätzlich Gruppen \geq / $<$ des Mittelwerts erstellt und die CXCR4-Expression zwischen diesen Kohorten verglichen.

2.7.3 Angewendete Tests und Software

Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des Programms *MedCalc* (Version 12.5, Ostend, Belgien) durchgeführt. Der Vergleich der Expression innerhalb verschiedener Gruppen erfolgte beim Vorliegen zweier Vergleichsgruppen mittels Mann-Whitney U Test. Im Falle des Vergleichs mehrerer Gruppen wurde eine Varianzanalyse mittels Kruskal-Wallis Analyse als post-hoc Test durchgeführt. Die Korrelation zwischen Expression und klinisch-pathologischen Parametern erfolgte mittels Chi-Quadrat Test. Die Überlebensanalysen in Abhängigkeit der Expressionsdaten erfolgte mittels Kaplan-Meier-Analysen. Hierbei wurde das Gesamtüberleben sowie das tumorspezifische Überleben der Patienten mit positiver CXCR4-Expression mit Patienten ohne Rezeptor-Expression verglichen. Unterschiede zwischen den Subgruppen wurden mittels Log-rank Test evaluiert. Univariate und multivariate Cox-Regressionsanalysen wurden durchgeführt, um die Korrelation klinischer Parameter mit den Überlebensdaten zu evaluieren. Für alle Tests wurden p-Werte von 0,05 oder kleiner als statistisch signifikant definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Klarzelliges Nierenzellkarzinom Kollektiv (Kollektiv 1)

3.1.1 Patientendaten

Das erste Kollektiv wurde aus Operationsresektaten von 64 Patienten mit ausschließlich klarzelligem Nierenzellkarzinom zusammengestellt. Diese Patienten wurden am Tübinger Universitätsklinikum in kurativer Intention operiert. Von den 64 eingeschlossenen Patienten waren 57,8% männlichen (n = 37) und 42,2% (n = 27) weiblichen Geschlechts. Das mediane Alter bei Resektion lag bei 64,2 Jahren, mit einer Altersspanne zwischen 35,7 und 88,0 Jahren. Der mediane Tumordurchmesser betrug 5,5cm, mit einer Größenvarianz von 1,4cm bis 16,0cm. 53,1% der Patienten (n = 34) hatten eine Tumorausdehnung < T2. 46,9% der Patienten (n=30) zeigten eine Tumorausdehnung \geq T2. 89,1% der resezierten Patienten (n = 57) hatten einen unauffälligen Nodalstatus. 10,9% (n = 7) wiesen bereits einen positiven Lymphknoten-Status auf. Bei 14,1% (n = 9) konnten Fernmetastasen nachgewiesen werden, für einen Patienten war der Metastasenstatus unklar (n = 1; 1,5%). 64,1% (n = 41) der untersuchten Karzinome wiesen ein Grading von G2 auf. 21,8% (n = 14) wurden als G1 und 14,1% (n = 9) als G3/G4 klassifiziert. Eine R0 Resektion erfolgte bei 93,8% Patienten (n = 60), 6,2% der Patienten (n = 4) wurden R1 reseziert. Das mediane *Follow-up* der Patienten betrug 53,34 Monate. Im *Follow-up* Zeitraum verstarben 14 Patienten (21,9%), elf (17,2%) davon tumorbedingt.

Die detaillierten Merkmale des Patientenkollektivs sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Charakteristika des klarzelligen Nierenzellkarzinom Kollektivs (Kollektiv 1).

Kollektiv 1	Charakteristika	Anzahl	%
Geschlecht	Männlich	37	57,8%
	Weiblich	27	42,2%
	Gesamt	64	100%
Alter bei Operation	Median	64,2	
	Range	35,7-88	
T	< T2	34	53,1%
	≥ T2	30	46,9%
T1-4	1a	18	28,1%
	1b	16	25,0%
	2a	5	7,8%
	2b	1	1,6%
	3a	10	15,6%
	3b	14	21,9%
	3c	0	0,0%
	4	0	0,0%
N	0	57	89,1%
	1	7	10,9%
M	0	54	84,4%
	1	9	14,1%
	X	1	1,5%
R	0	60	93,8%
	1	4	6,2%
V	0	46	71,9%
	1	17	26,5%
	2	1	1,6%
L	0	61	95,3%
	1	3	4,7%
Grading	G1	14	21,8%
	G2	41	64,1%
	G3/G4	9	14,1%
Tumornekrose	Ja	9	14,1%
	Nein	55	85,9%
Primärtumor Größe(cm)	Median	5,5	
	Range	1,4 - 16 cm	
Follow up: Zeit in Monaten nach Erstdiagnose	Median	53,34	
	Range	0 - 87,72	
Verstorben	Ja	14	21,9%
	Nein	50	78,1%
	Tumorbedingt	11	17,2%

Abkürzungen: T = Tumorausdehnung; N = Nodalstatus; M = Fernmetastasen, R0 = kein Residualtumor/R1 = mikroskopischer Residualtumor, V = Veneninvasion, L = Lymphgefäßinvasion, cm = Centimeter

3.1.2 Expressionsanalyse

3.1.2.1 Zytoplasmatische Expression

Eine positive zytoplasmatische CXCR4-Expression zeigte sich in 98,0% aller benignen Proben, das maligne Gewebe zeigte in 38,9% der Fälle eine positive zytoplasmatische Expression. Hierbei zeigte sich beim IR-Score des benignen Gewebes eine Ausprägung zwischen 0,0 - 300,0 (Skala der Expressionsanalyse: 0 - 300). Beim malignen Gewebe zeigte sich eine Ausprägung zwischen 0,0 -180,0. Der mittlere zytoplasmatische IR-Score in benignem Nierengewebe lag bei 108,39 im Vergleich zu 27,2 bei malignem Gewebe. Der Median des IR-Scores für das benigne Gewebe lag bei 130,0 und für das maligne Gewebe bei 0,0. Abbildung 4 zeigt die Ausprägung des IRS im Vergleich zwischen benignem und malignem Gewebe.

Tabelle 14 zeigt die tabellarische Aufarbeitung. Der Unterschied in der Ausprägung des IRS zeigte sich statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

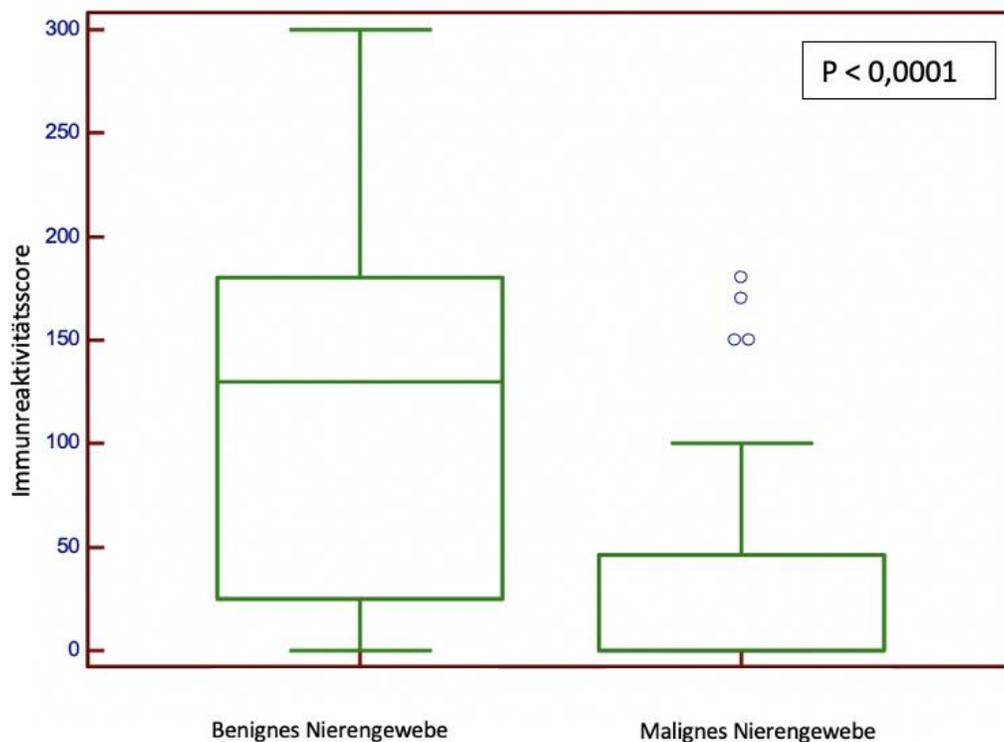


Abbildung 4: Box-Plot Darstellung des zytoplasmatischen IRS im Vergleich des benignen Nierengewebes sowie des malignen NZK Gewebes; Abkürzungen: IRS = Immunreaktivitätsscore, NZK = Nierenzellkarzinom.

Tabelle 14: Statistische Analyse der absoluten zytoplasmatischen CXCR4-Expression in benignem Nierengewebe und klarzelligem NZK.

Zytoplasmatische CXCR4-Expression (Skala der Expressionsanalyse: 0 - 300)	Maligne	Benigne
Stichprobengröße	59	59
Kleinster Wert	0,00	0,00
Größter Wert	180,00	300,00
Mittelwert	27,2	108,39
95% KI des Mittelwerts	14,79 – 39,62	87,23 – 129,55
Median	0,00	130,00
95% KI des Medians	0,00 – 2,49	75,00 – 160,00

Abkürzung: IRS = Immunreaktivitätsscore, KI = Konfidenzintervall

3.1.2.2 Nukleäre Expression

Eine positive nukleäre CXCR4-Expression zeigte sich im benignen Nierengewebe in 94,1% der Fälle. Dem gegenüber wiesen 83% der malignen Proben eine positive nukleäre Färbung auf. Die Anzahl der gefärbten Kerne zeigte im benignen Gewebe eine Verteilung von 10,0 - 84,0, im malignen Gewebe von 4,0 - 98,0 (Skala der Expressionsanalyse: 0 - 100). Die mittlere Expression zeigte sich bei 51,04 in benignem Gewebe, sowie bei 61,5 in malignem Gewebe. Der Median der CXCR4-Expression lag bei 56,6 in benignem Gewebe, bei 71,0 in malignem Gewebe. Abbildung 5 stellt die nukleäre CXCR4-Expression in benignem und malignem Gewebe im Vergleich dar. Die tabellarische Aufarbeitung ist in Tabelle 15 dargestellt. Der Unterschied der nukleären Expression zeigte sich signifikant ($p = 0,0291$).

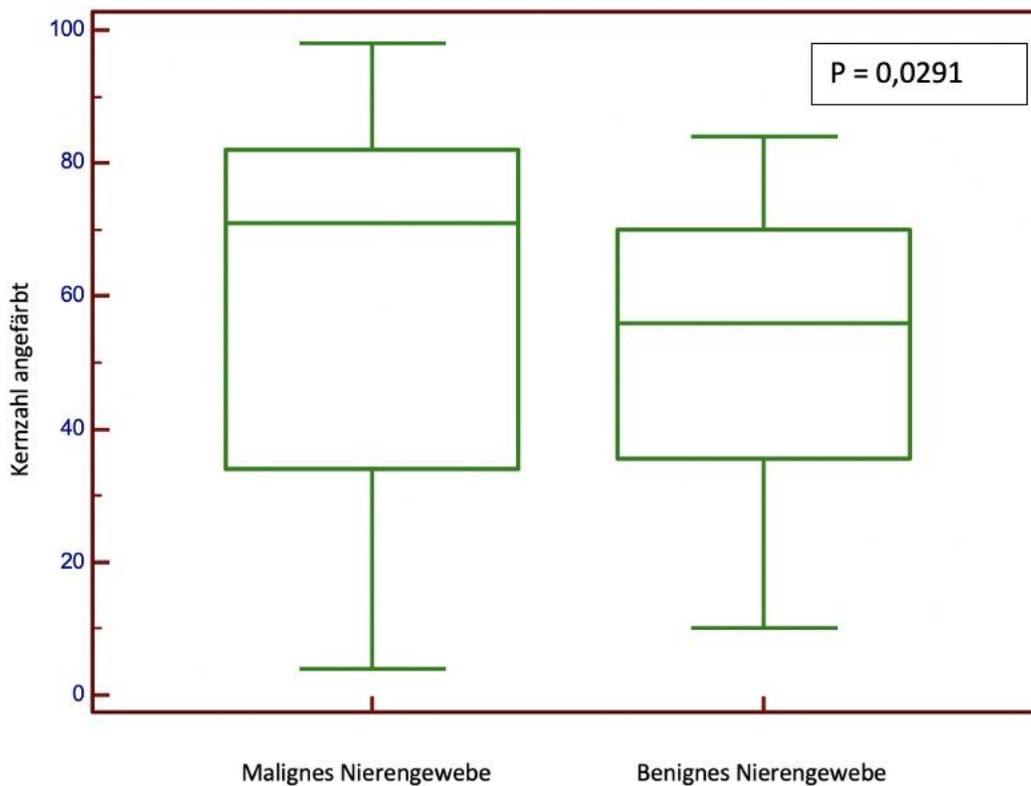


Abbildung 5: Nukleäre CXCR4-Expression in malignem und benignem Nierengewebe.

Tabelle 15: Statistische Analyse der absoluten nukleären CXCR4-Expression in benignem Nierengewebe und klarzelligen NZK.
Abkürzung: KI = Konfidenzintervall

Nukleäre CXCR4-Expression (Skala der Expressionsanalyse: 0 - 100)	Maligne	Benigne
Stichprobengröße	60	53
Minimaler Wert	4,00	10,00
Maximaler Wert	98,00	84,00
Mittelwert	61,50	51,04
95% KI des Mittelwerts	54,39 – 68,63	44,97 – 57,10
Median	71,00	56,00
95% KI des Medians	59,63 – 78,00	42,00 – 60,00

3.1.3 CXCR4-Expression bezogen auf klinisch-pathologische Daten

In der Korrelationsanalyse der CXCR4-Expression mit den klinisch-pathologischen Eigenschaften Tumorstadium \geq T2, positiver LK-Status, positive lymphovaskuläre Invasion, positive venöse Invasion, Grading \geq G2, sarkomatoide Differenzierung sowie Nekrose zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer positiven zytoplasmatischen CXCR4-Expression sowie der lymphovaskulären Invasion ($p = 0,0097$). Für alle anderen Parameter konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (p für alle $> 0,05$). Tabelle 16 fasst die Korrelationsanalyse zusammen.

Tabelle 16 : Chi-Quadrat-Test: Korrelation der CXCR4-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern des klarzelligen Patientenkollektivs.

Klarzellige NZK	T- Stadium: $T \geq T2$	N	L	V	Grading ≥ 2	Sarkomatoide Differenzierung	Nekrose
Positive Kernfärbung	$p =$ 0,2204	$p =$ 0,7859	$p =$ 0,2411	$p =$ 0,5148	$P =$ 0,8787	$p =$ 0,4132	$p =$ 0,9616
Positive Zytoplasma- färbung	$p =$ 0,5809	$p =$ 0,2370	$p =$ 0,0097	$p =$ 0,1298	$p =$ 0,6861	$p =$ 0,6142	$p =$ 0,0634

Abkürzungen: T = Tumorausdehnung; N = Nodalstatus; L = Lymphgefäßinvasion; V = Veneninvasion, NZK = Nierenzellkarzinom

3.1.4 Uni- und multivariate Überlebensanalysen

Der Einfluss der in Tabelle 16 genannten klinisch-pathologischen Parametern auf das tumorspezifische Überleben sowie das Gesamtüberleben wurde durch eine Cox-Regressions-Analyse untersucht. Es konnte eine Abhängigkeit des Gesamtüberlebens für die Parameter T-Stadium \geq T2, sarkomatoide Differenzierung, N-, V- und L- Status, Grading \geq 2 sowie der zytoplasmatischen Expressivität gezeigt werden. Das Risiko zu versterben, zeigte sich ab einem T2-Stadium 6,3-fach erhöht, bei sarkomatoider Differenzierung 9-fach gesteigert, bei positivem Lymphknotenbefall 9,1-fach sowie bei vaskulärer Invasion 2,6-fach und lymphovaskulärer Invasion 19-fach gesteigert. Bei einem Grading \geq 2 ergab sich ein 5,5-fach gesteigertes Risiko zu versterben. Eine positive zytoplasmatische Expressivität größer des Mittelwerts zeigte ebenfalls ein 3-fach erhöhtes Risiko, was die zytoplasmatische CXCR4-Expression in der univariaten Analyse als negativen, prognostischen Marker identifiziert. Auch zwischen dem tumorspezifischen Überleben und den Parametern klinisches T-Stadium \geq T2, sarkomatoide Differenzierung, N-, V- und L- Status sowie das Grading \geq 2 konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich eine zytoplasmatische CXCR4 Expressivität als statistisch signifikant mit einem 4,48-fach erhöhtem Risiko für tumorspezifisches Versterben.

Für die nukleäre CXCR4-Expression wurde keine signifikante Korrelation gefunden. Weitere Informationen der univariaten Cox-Regression zeigt Tabelle 17.

Tabelle 17: Univariate Cox-Regression für das Gesamtüberleben (Overall Survival) und tumorspezifische Überleben (Cancer specific survival) des klarzelligen NZK-Kollektivs.

Gesamtüberleben (Overall Survival)			
Kovariate	p-Wert	HR	95% KI von HR
Klinisches Stadium T2 vs. <T2	0,0046	6,3617	1,7835 – 22,6920
Sarkomatoide Differenzierung vs. keine sarkomatoiden Anteile	0,0014	9,0238	2,3498 – 34,6527
Lymphknoten-Status: N+ vs. N0	<0,0001	9,1089	3,1287 – 26,5202
Vaskuläre Invasion: V+ vs. V0	0,0152	2,6846	1,2140 – 5,9367
Lymphovaskuläre Invasion: L+ vs. L0	<0,0001	19,0835	4,4745 – 81,3896
Grading: G2 vs. <G2	0,0026	5,5545	1,8337 – 16,8248
CXCR4 Expressivität in klarzelligen NZK	p-Wert	HR	95% KI von HR

Zytoplasmatische CXCR4 Expressivität: vs. <Mittelwert	0,0457	3,0454	1,0272 – 9,0290
Zytoplasmatische CXCR4 Expressivität positiv vs. negativ	0,0528	3,0556	0,9921 – 9,4109
Zytoplasmatischer IRS vs. <Mittelwert	0,0859	2,6087	0,8783 – 7,7481
Nukleäre CXCR4-Expression positiv vs. negativ	0,5529	1,8713	0,2388 – 14,6646
Tumorspezifisches Überleben (<i>Cancer specific survival</i>)			
Kovariate	p-Wert	HR	95% KI von HR
Klinisches Stadium T2 vs. <T2	0,0093	7,6407	1,6629 - 35,1085
Sarkomatide Differenzierung vs. keine sarkomatoiden Anteile	0,0003	13,9040	3,4158 - 56,5963
Lymphknoten-Status: N+ vs. N0	<0,0001	15,5824	4,6962 - 51,7044
Vaskuläre Invasion: V+ vs. V0	0,0092	3,2142	1,3412 - 7,70
Lymphovaskuläre Invasion: L+ vs. L0	<0,0001	35,9364	7,0777 - 182,4646
Grading: G2 vs. <G2	0,0004	8,9889	2,6983 - 29,9454
CXCR4 Expressivität in klarzelligen NZK	p-Wert	HR	95% KI von HR
Zytoplasmatische CXCR4 Expressivität positiv vs. negativ	0,0317	4,4826	1,1483 - 17,4993
Nukleäre CXCR4-Expression positiv vs. negativ	0,5092	1,5775	0,4103 - 6,0648

Abkürzung: HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, T = Tumorausdehnung; N = Nodalstatus; L = Lymphgefäßinvasion; V = Veneninvasion, G = Grading, NZK = Nierenzellkarzinom, IRS = Immunreaktivitätsscore, vs. = versus

In der multivariaten Cox-Regression konnten weder den klinisch-pathologischen Parametern noch der zytoplasmatischen CXCR4 Expressivität ein unabhängiger prognostischer Charakter nachgewiesen werden. Die vollständigen Daten der multivariaten Cox-Regression sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Multivariate Cox-Regression für das Gesamtüberleben (Overall Survival) und tumorspezifische Überleben (Cancer specific survival) des klarzelligen NZK-Kollektivs.

Gesamtüberleben (Overall survival)			
Kovariate	p-Wert	HR	95% KI von HR

Klinisches Stadium T2 vs. <T2	0,1071	3,9410	0,7497 – 20,7186
Sarkomatoide Differenzierung vs. keine sarkomatoide Differenzierung	0,8128	1,3192	0,1348 – 12,9154
Lymphknoten-Status: N+ vs. N0	0,4155	2,3116	0,3107 – 17,1968
Vaskuläre Invasion: V+ vs. V0	0,5763	0,6658	3,1610 – 2,7536
Lymphovaskuläre Invasion: L+ vs. L0	0,4900	2,8076	0,1520 – 51,8496
Grading: G2 vs. <G2	0,6026	1,6717	0,2440 – 11,4528
Zytoplasmatische CXCR4 Expression (IRS Mittelwert)	0,5233	1,6381	0,3626 – 7,4002
Tumorspezifisches Überleben (Cancer specific survival)			
Kovariate	p-Wert	HR	95% KI von HR
Klinisches Stadium T2 vs. <T2	0,1386	4,3516	0,6278 - 30,1617
Sarkomatoide Differenzierung vs. keine sarkomatoide Differenzierung	0,8367	0,7732	0,0678 - 8,8149
Lymphknoten-Status: N+ vs. N0	0,1364	6,3868	0,5636 - 72,3807
Vaskuläre Invasion: V+ vs. V0	0,7326	0,7371	0,1292 - 4,2035
Lymphovaskuläre Invasion: L+ vs. L0	0,5824	2,1766	0,1380 - 34,3246
Grading: G2 vs. <G2	0,4745	2,0447	0,2909 - 14,3739
Zytoplasmatische CXCR4 Expression (IRS Mittelwert)	0,1386	4,3516	0,6278 - 30,1617

Abkürzung: HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, T = Tumorausdehnung; N = Nodalstatus; L = Lymphgefäßinvasion; V = Veneninvasion, G = Grading, IRS = Immunreaktivitätsscore, vs. = versus

3.1.5 Kaplan-Meier-Analysen

Für die beobachteten Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom betrug das mediane Gesamtüberleben 71,73 Monate (95% KI 64,33 – 79,12). Die maximale Nachbeobachtungszeit betrug 85 Monate. Das *Follow-up* war für alle 64 Patienten verfügbar. 14 Patienten verstarben innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums. Abbildung 6 stellt dies in einer Kaplan-Meier Kurve dar.

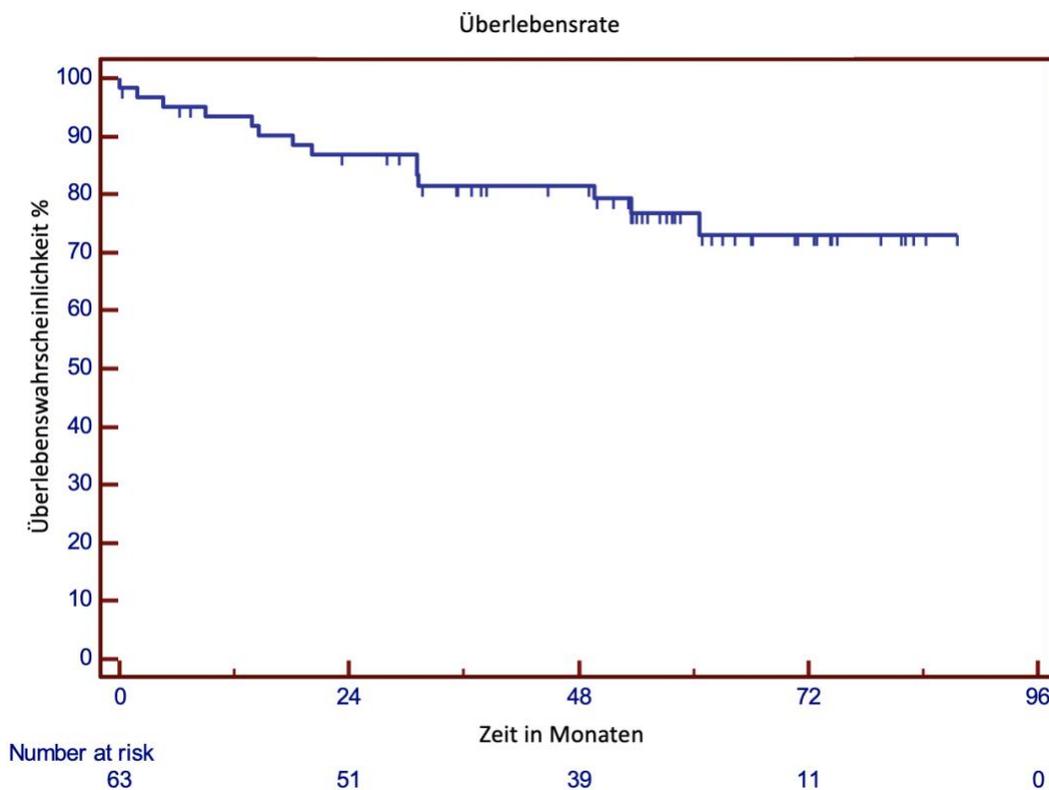


Abbildung 6: Kaplan-Meier Kurve, Überlebensrate des Patientenkollektivs mit klarzelligem NZK.

Abbildung 7 zeigt das Gesamtüberleben in Abhängigkeit der zytoplasmatischen CXCR4-Expression. Es wurden Patienten mit positiver zytoplasmatischer CXCR4-Expression den Patienten ohne Expression gegenübergestellt.

Die Gruppe mit positiver zytoplasmatischen CXCR4-Färbung zeigte ein deutlich kürzeres Gesamtüberleben von lediglich 58,8 Monaten (95% KI 45,5 – 72,0), während die Kohorte ohne CXCR4-Expression ein Gesamtüberleben von 74,8 Monaten (95% KI 66,9 – 82,6) aufwies. Mittels Log-Rank Test konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei gegenübergestellten Gruppen nachgewiesen werden. Der p-Wert lag bei 0,042.

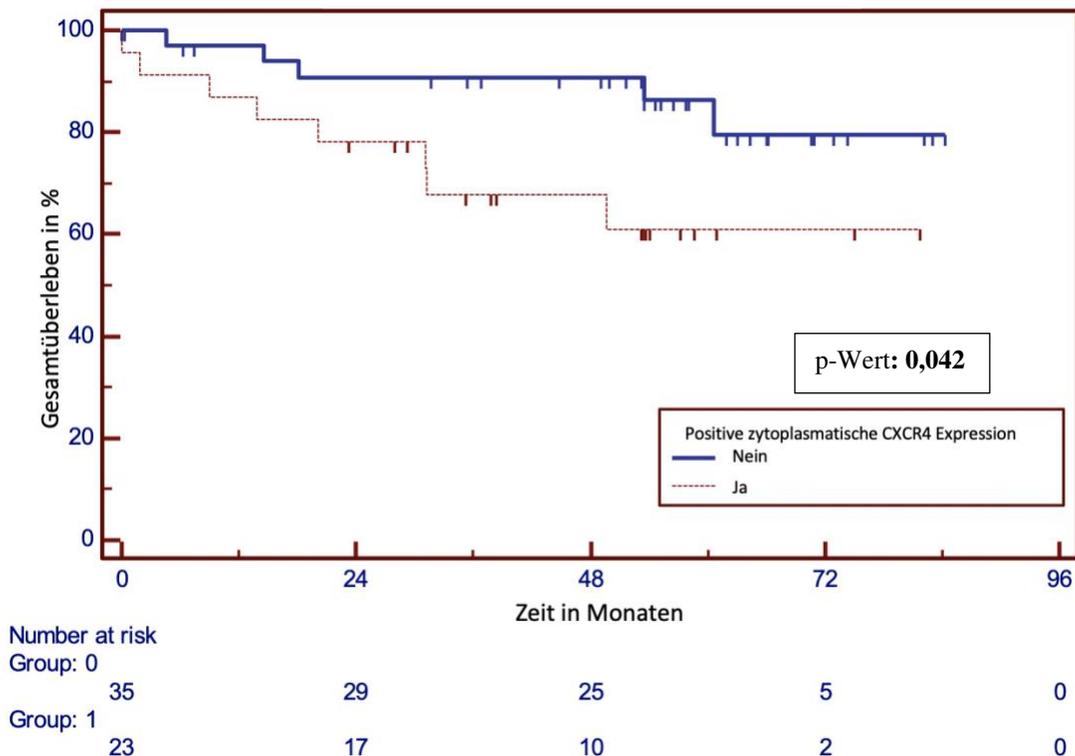


Abbildung 7: Kaplan-Meier Kurven des Gesamtüberlebens mit positiver bzw. negativer zytoplasmatischer CXCR4-Expression. (Group 0 (blaue Kurve) = keine zytoplasmatische Expression; Group 1 (rote Kurve) = mit zytoplasmatischer Expression)

Die Abbildung 8 vergleicht das tumorspezifische Überleben in Abhängigkeit der zytoplasmatischen CXCR4-Expression innerhalb des Kollektivs. Patienten mit positiver zytoplasmatischer CXCR4-Expression zeigen ein kürzeres tumorspezifisches Überleben. Mittels eines Log-Rank Test konnte erneut ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei gegenübergestellten Gruppen nachgewiesen werden. Der p-Wert lag bei 0,019.

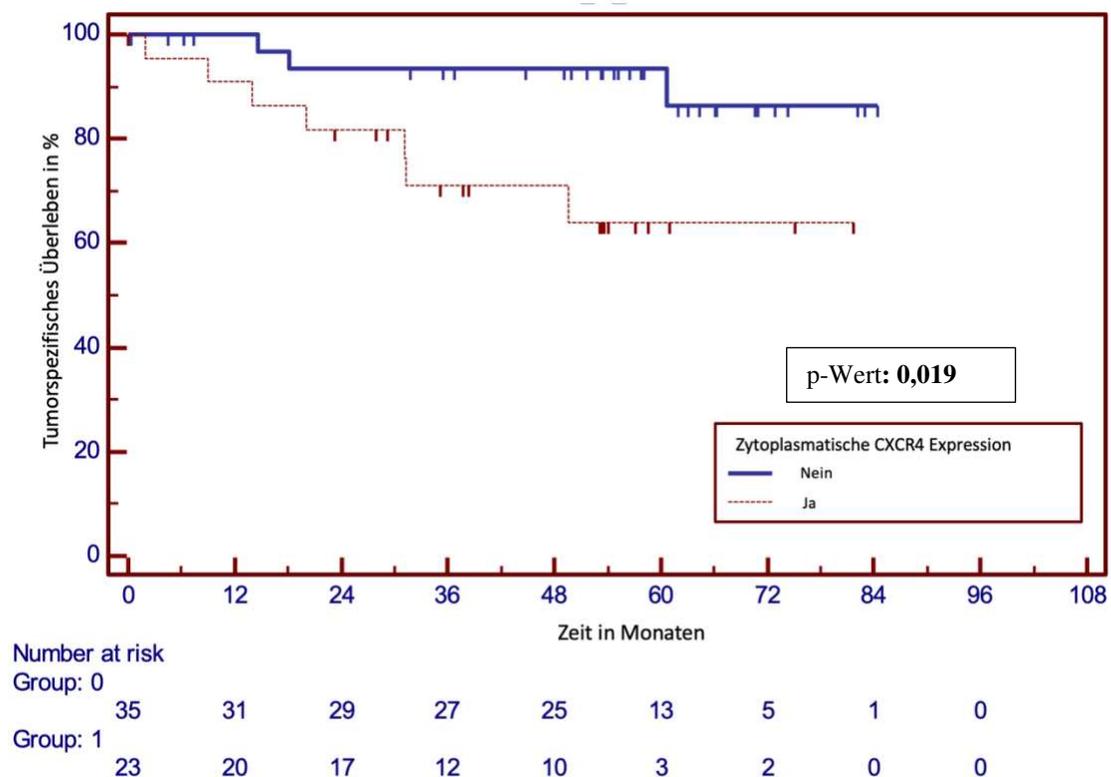


Abbildung 8 : Kaplan-Meier Kurven des tumorspezifischen Überlebens in Abhängigkeit der positiven oder negativen zytoplasmatischen CXCR4-Expression. (Group 0 (blaue Kurve) = keine zytoplasmatische Expression; Group 1 (rote Kurve) = mit zytoplasmatischer Expression)

Zusammenfassend zeigt sich die positive zytoplasmatische CXCR4-Expression sowohl für das Gesamtüberleben sowie für das tumorspezifische Überleben als negativer, prognostischer Faktor in der univariaten Analyse. Dieser Charakter bestätigte sich jedoch in der multivariaten Analyse nicht.

Für die nukleäre CXCR4-Expression konnte kein statistisch signifikanter Einfluss auf das Überleben der Patienten nachgewiesen werden. Die folgenden Kaplan-Meier Kurven vergleichen in Abbildung 9 und Abbildung 10 die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von positiver und negativer CXCR4-Expression. In Abbildung 9 wird das Gesamtüberleben der Kohorte mit positiver nukleärer CXCR4-Expression der Gruppe ohne CXCR4-Expression gegenübergestellt. In Abbildung 10 wird das tumorspezifische Überleben analysiert.

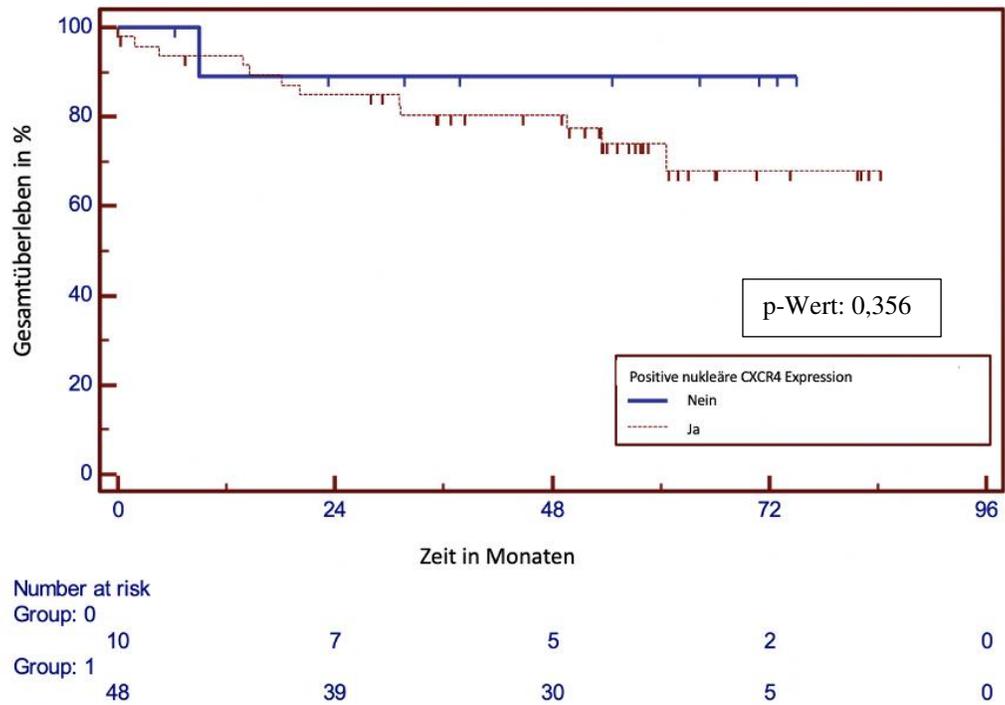


Abbildung 9: Kaplan-Meier Kurven für positive bzw. negative nukleäre CXCR4-Expression. (Group 0 (blaue Kurve) = keine nukleäre Expression; Group 1 (rote Kurve) = mit nukleärer Expression)

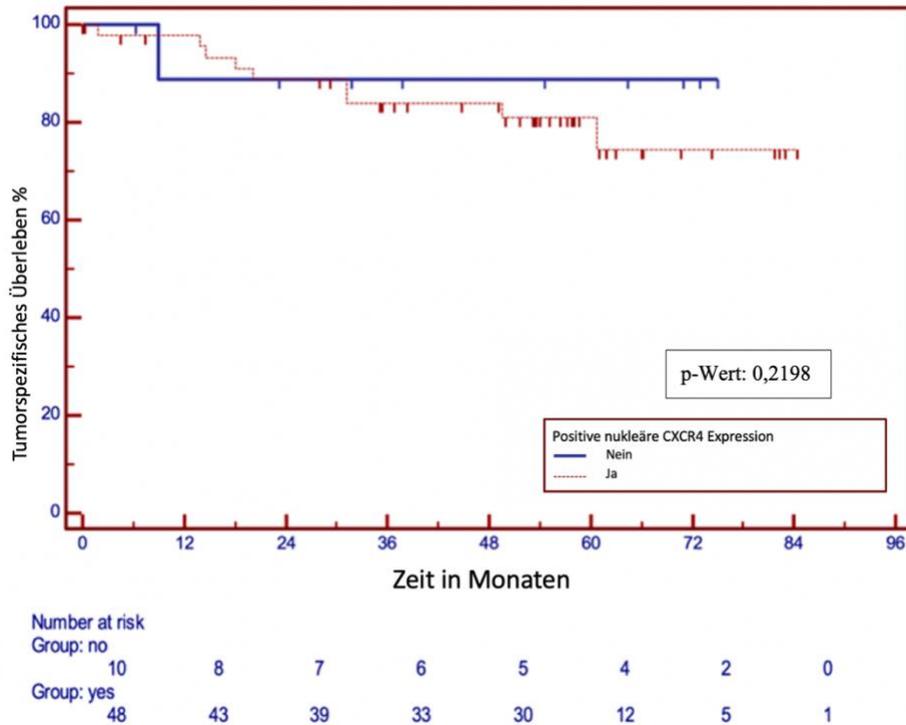


Abbildung 10: Kaplan-Meier Kurven des tumorspezifischen Überlebens für positive bzw. negative nukleäre CXCR4-Expression. (Group no (blaue Kurve) = keine nukleäre Expression; Group yes (rote Kurve) = mit nukleärer Expression)

3.2 Nierentumorkollektiv verschiedener histologischer Genesen (Kollektiv 2)

3.2.1 Patientendaten

Ein weiteres Kollektiv wurde aus Nierentumoren verschiedener benigner und maligner Subtypen zusammengestellt. Eingeschlossen werden konnten Resektate von insgesamt 146 Patienten. Den Fokus der Expressionsanalyse stellten die Subgruppen unterschiedlicher Histologien dar.

Die eingeschlossenen Histologien umfassten klarzellige, papilläre und chromophobe NZK sowie benigne Raumforderungen wie Onkozytome, Angiomyolipome und Zysten. Die genaue Zusammensetzung ist aus Tabelle 19 zu entnehmen.

61,64% (n = 90) der eingeschlossenen Patienten waren männlich, 38,36% (n = 56) weiblichen Geschlechts. Zum Diagnosezeitpunkt betrug das Patientenalter im Median 65,7 Jahre. Das Kollektiv zeigte eine Altersspanne von 24,9 - 92,1 Jahre.

Tabelle 19: Charakteristika des Nierentumorkollektivs.

Parameter			Anzahl			%		
Gesamtkollektiv			146			100		
Männlich			90			61,64		
Weiblich			56			38,36		
Alter bei Operation			Median: 64,08			Range: 24,30–89,82		
Tumordurchmesser in cm			Median: 3,45			Range: 0,4 - 15		
Histologie:	Anzahl	Prozent	Histologie:	Anzahl	Prozent	Histologie:	Anzahl	Prozent
Klarzelliges NZK	87	59,59	Papilläres NZK	14	9,59	Chromophobes NZK	7	4,79
Männlich	53	36,30	Männlich	11	7,53	Männlich	4	2,74
Weiblich	34	23,29	Weiblich	3	2,05	Weiblich	3	2,05
Alter in Jahren	Median: 65,08	Range: 27,66–89,82	Alter in Jahren	Median: 63,38	Range: 37,72 – 81,11	Alter in Jahren	Median: 46,54	Range: 44,70 – 81,15
T Stadium								
T1a	42	28,77	T1a	6	4,11	T1a	2	1,37
T1b	18	12,33	T1b	3	2,05	T1b	3	2,05
T2a	4	2,74	T2a	2	1,37	T2a	2	1,37
T2b	0	0,00	T2b	0	0,00	T2b	0	0,00
T3a	20	13,70	T3a	2	1,37	T3a	0	0,00
T3b	2	1,37	T3b	1	0,68	T3b	0	0,00
T3c	1	0,68	T3c	0	0,00	T3c	0	0,00
T4	0	0,00	T4	0	0,00	T4	0	0,00
Lymphknoten Status								
N0	79	54,11	N0	12	8,22	N0	7	4,79
N1	6	4,11	N1	2	1,37	N1	0	0,00
NX	2	1,37	NX	0	0,00	NX	0	0,00
Metastasen Status								
M0	74	50,68	M0	1	0,68	M0	7	4,79
M1	11	7,53	M1	13	8,90	M1	0	0,00

Mx	2	1,37	Mx	0	0,00	Mx	0	0,00
R-Status								
R0	77	52,74	R0	11	7,53	R0	7	4,79
R1	7	4,79	R1	2	1,37	R1	0	0,00
RX	3	2,05	RX	1	0,68	RX	0	0,00
L-Status								
L0	85	58,22	L0	11	7,53	L0	7	4,79
L1	2	1,37	L1	3	2,05	L1	0	0,00
V-Status								
V0	72	49,32	V0	13	8,90	V0	0	4,79
V1	11	7,53	V1	0	0,00	V1	0	0,00
V2	4	2,74	V2	1	0,68	V2	0	0,00
Fuhrmann Grading								
G1	25	17,12	G1	2	1,37	G1	1	0,68
G2	48	32,88	G2	9	6,16	G2	5	3,42
G3-4	13	8,90	G3-4	2	1,37	G3-4	1	0,68
GX	1	0,68	GX	1	0,68	GX	0	0,00
Sarkomatoid								
Ja	3	2,05	Ja	1	0,68	Ja	0	0,00
Nein	84	57,53	Nein	13	8,90	Nein	7	4,79
Tumor Nekrose								
Ja	21	14,38	Ja	6	4,11	Ja	1	0,68
Nein	66	45,21	Nein	8	5,48	Nein	6	4,11
Größe Primärtumor in cm	Median: 3,5	Range: 0,5 – 15,00	Größe Primärtumor in cm	Median: 3,9	Range: 1,5 – 12,00	Größe Primärtumor in cm	Median: 4,3	Range: 2,00 – 7,80
Histologie:	Anzahl	Prozent	Histologie:	Anzahl	Prozent	Histologie:	Anzahl	Prozent
Onkozytom:	16	10,96	Angiomyo-lipom:	10	6,85	Zyste:	7	4,79
Männlich	9	6,16	Männlich	3	2,05	Männlich	6	4,11
Weiblich	7	4,79	Weiblich	7	4,79	Weiblich	1	0,68
Alter in Jahren	Median: 62,56	Range: 51,38–77,86	Alter in Jahren	Median: 60,88	Range: 24,30–74,13	Alter in Jahren	Median: 61,28	Range: 32,56–78,82
Histologie:	Anzahl	Prozent						

Unbekannt	5	3,42
Männlich	3	2,05
Weiblich	2	1,37
Alter in Jahren	Median: 60,4	Range: 34,32 – 74,85

Abkürzungen: NZK = Nierenzellkarzinom, T = Tumorausdehnung; N = Nodalstatus; M = Metastasenstatus, R0 = kein Residualtumor/R1 = mikroskopischer Residualtumor, L = Lymphgefäßinvasion; V = Veneninvasion, G = Grading, cm = Centimeter

3.2.2 Expressionsanalyse

Innerhalb des gesamten Nierentumorkollektivs unterschiedlicher histologischer Genese (Kollektiv 2) zeigte die Analyse der zytoplasmatischen Expression eine Ausprägung von 0 – 300 (Skala der Expressionsanalyse: 0 - 300). Die Analyse der nukleären Rezeptorexpression zeigte eine Ausprägung von 0 - 100 (Skala der Expressionsanalyse: 0 - 100). Der mittlere zytoplasmatische Score lag bei 38,21, der mittlere nukleäre Score lag bei 39,78. Der Median der zytoplasmatischen CXCR4-Expression lag bei 0, nukleär bei 30.

Tabelle 20 zeigt den Vergleich der zytoplasmatischen und nukleären CXCR4-Expression des gesamten Nierentumorkollektivs:

Tabelle 20: Statistische Analyse der absoluten nukleären und zytoplasmatischen CXCR4-Expression des Nierentumorkollektivs

CXCR4-Expression	Nukleär (Anteil gefärbter Kerne)	Zytoplasmatisch (IRS)
Skala der Expressionsanalyse	0 - 100	0 - 300
Stichprobengröße	125	130
Minimaler Wert	0,00	0,00
Maximaler Wert	100,00	300,00
Mittelwert	39,78	38,21
95% KI des Mittelwerts	33,74 – 45,83	26,17 – 50,25
Median	30,00	00,00
95% KI des Medians	22,00 – 47,87	00,00 – 00,00

Abkürzungen: IRS = Immunreaktivitätsscore, KI = Konfidenzintervall

Die zwei folgenden Box-Plots in Abbildung 11 und Abbildung 12 zeigen die zytoplasmatische und nukleäre CXCR4-Expression in den unterschiedlichen Gewebetypen des Nierentumorkollektivs.

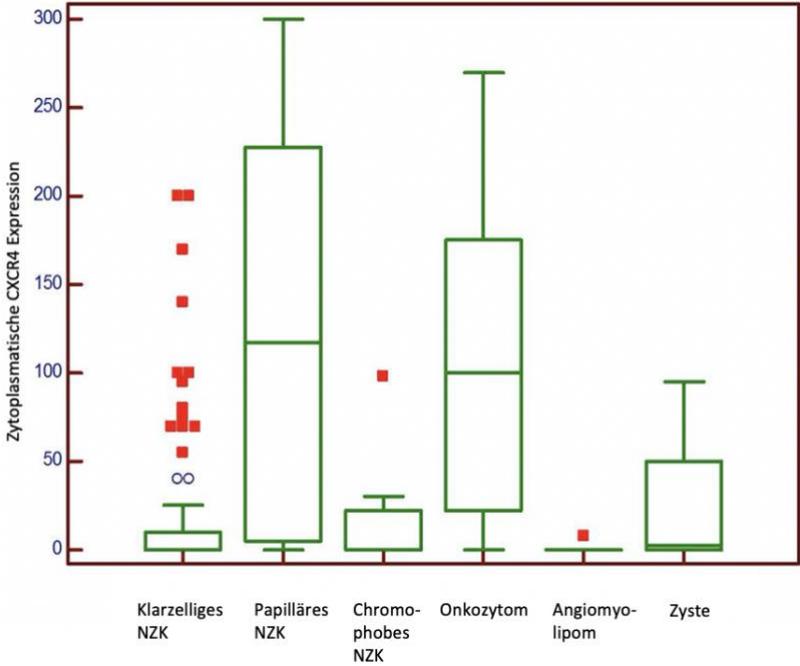


Abbildung 11: Zytoplasmatische CXCR4-Expression im Nierentumorkollektiv.

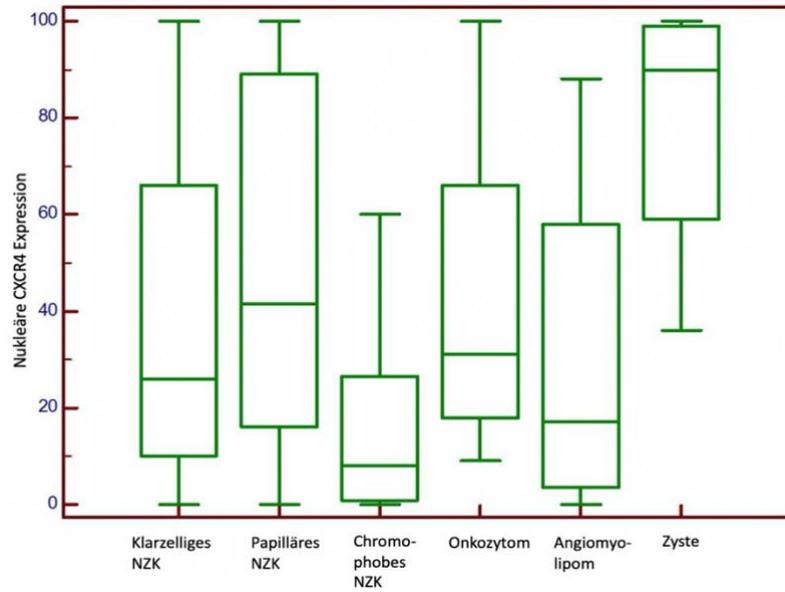


Abbildung 12: Nukleäre CXCR4-Expression im Nierentumorkollektiv.

Die detaillierte zytoplasmatische und nukleäre Expressionsanalyse der jeweiligen histologischen Subgruppen des Nierentumorkollektivs zeigt Tabelle 21.

Tabelle 21: Statistische Analyse der zytoplasmatischen und nukleären CXCR4-Expression in den histologischen Subgruppen.

CXCR4-Expression	Klarzelliges NZK	Papilläres NZK	Chromophobes NZK	Onkozytom	Angiomyolipom	Zyste
Zytoplasmatisch: (Skala der Expressionsanalyse: 0 - 300)						
Stichprobengröße	82	12	7	15	7	4
Minimaler Wert	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Maximaler Wert	200,00	300,00	98,00	270,00	8,00	95,00
Median	0,00	117,50	0,00	100,00	0,00	2,50
95% KI des Medians	0,00 – 0,00	5,00 – 245,50	0,00 – 64,32	24,54 – 173,51	0,00 – 4,04	-
CXCR4-Expression	Klarzelliges NZK	Papilläres NZK	Chromophobes NZK	Onkozytom	Angiomyolipom	Zyste
Nukleär: (Skala der Expressionsanalyse: 0 - 100)						
Stichprobengröße	78	12	7	14	8	4
Minimaler Wert	0,00	0,00	0,00	9,00	0,00	36,00
Maximaler Wert	100,00	100,00	60,00	100,00	88,00	100,00
Median	26,00	41,50	8,00	31,00	17,00	90,00
95% KI des Medians	17,87 – 38,26	16,00 – 92,27	0,00 – 45,14	17,79 – 68,09	2,43 – 70,16	-

Abkürzungen: NZK = Nierenzellkarzinom, KI = Konfidenzintervall

Bei dem Vergleich der histologischen Subgruppen wiesen klarzellige und chromophobe Nierenzellkarzinome, sowie Angiomyolipome die geringste zytoplasmatische Rezeptorausprägung mit einem Median von jeweils 0 auf. Die höchste zytoplasmatische Expression konnte in der Subgruppe der papillären Nierenzellkarzinome beobachtet werden (Median 117,50), welche

ebenfalls eine der stärksten nukleären Expressionen (Median 41,5) zeigte. Das Zystengewebe wies eine hohe nukleäre Expression (Median 90) auf. Zytoplasmatisch zeigte sich eine geringe Rezeptorausprägung im Zystengewebe (Median 2,5). Äquivalent zu den Expressionsergebnissen von Kollektiv 1 mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen, zeigte die klarzellige Subgruppe dieses Kollektivs ebenfalls eine stärkere nukleäre Rezeptorausprägung (Median 26) sowie eine schwache zytoplasmatische Ausprägung (Median 0).

Für die zytoplasmatische Expression der Subgruppen wies ein durchgeführter Kruskal-Wallis Test mit einem p-Wert von 0,000003 auf signifikante Unterschiede in der CXCR4-Expression hin. Ebenso wurde ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte der nukleären CXCR4- Expression zwischen den einzelnen Subgruppen bestätigt. Der p-Wert lag bei 0,035. Die Ergebnisse der zwei Kruskal-Wallis Tests sind in Tabelle 22 und Tabelle 24 dargestellt.

Mittels Post-hoc-Analyse wurde untersucht, welche der einzelnen Subgruppen sich in ihrer CXCR4-Expression signifikant voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse der Post-Hoc-Analyse sind in Tabelle 23 und Tabelle 25 dargestellt. Auffallend ist, dass die papilläre Subgruppe, welche im Vergleich zu den anderen Subgruppen die stärkste zytoplasmatische Expression zeigte, sich in dieser signifikant von den meisten anderen Subgruppen unterscheidet ($p < 0,05$).

Tabelle 22: Kruskal-Wallis-Analyse zur zytoplasmatischen CXCR4-Expression innerhalb der Nierentumor-Subgruppen.

Faktoren: Klarzelliges, papilläres, chromophobes NZK, Onkozytom, Angiomyolipom, Zyste	Zytoplasmatische Färbung in Subgruppen
Stichprobengröße	127
Teststatistik	30,2004
<i>Corrected for ties Ht</i>	38,0557
Freiheitsgrade	7
Signifikanzniveau	p = 0,000003

Abkürzung: NZK = Nierenzellkarzinom

Tabelle 23: Post-hoc-Analyse der zytoplasmatischen CXCR4-Expression.

Faktor	Anzahl	Average Rank	Different (p<0,05) from factor nr
1 = klarzelliges NZK	81	55,49	(2)(4)
2 = papilläres NZK	11	102,36	(1)(3)(5)(6)
3 = chromophobes NZK	7	55,29	(2)(4)
4 = Onkozytom	15	95,33	(1)(3)(5)
5 = Angiomyolipom	7	44,57	(2)(4)
6 = Zyste	4	65,00	(2)

Abkürzung: NZK = Nierenzellkarzinom

Tabelle 24: Kruskal-Wallis-Analyse zur nukleären CXCR4-Expression innerhalb der Nierentumor-Subgruppen.

Faktoren: Klarzelliges, papilläres, chromophobes NZK, Onkozytom, Angiomyolipom, Zyste	Kernfärbung in Subgruppen
Stichprobengröße	123
Teststatistik	15,0327
<i>Corrected for ties Ht</i>	15,0628
Freiheitsgrade	7
Signifikanzniveau	p = 0,035

Abkürzung: NZK = Nierenzellkarzinom

Tabelle 25: Post-hoc-Analyse der nukleären CXCR4-Expression.

Faktor	Anzahl	Average Rank	Different (p<0,05) from factor nr
1 = klarzelliges NZK	77	61,02	(6)
2 = papilläres NZK	11	75,32	(3)
3 = chromophobes NZK	7	35,57	(2)(4)(6)
4 = Onkozytom	14	71,18	(3)
5 = Angiomyolipom	8	50,88	(6)
6 = Zyste	4	101,87	(1)(3)(5)

Abkürzung: NZK = Nierenzellkarzinom

3.3 Metastasenkollektiv (Kollektiv 3)

3.3.1 Patientendaten

In einem dritten Kollektiv wurde die CXCR4-Expression in unterschiedlich lokalisierten Metastasen analysiert. Es wurden 92 Patienten in das Kollektiv eingeschlossen. Diese unterzogen sich im Zeitraum zwischen 1990 und 2011 an der Universitätsklinik Tübingen einer onkologischen Operation. Als Primärtumor wiesen 83 Patienten ein klarzelliges, drei Patienten ein papilläres und zwei Patienten ein chromophobes Nierenzellkarzinom auf. Für vier Patienten konnte die Histologie des Primärtumors nicht eruiert werden. Da pro Patienten bis zu drei Metastasen entfernt wurden, konnten insgesamt 137 Metastasen eingeschlossen und analysiert werden. Bei 27 Patienten wurden die Metastasen synchron zu dem Primärtumor chirurgisch reseziert. Bei 62 Patienten erfolgte dies zeitversetzt. Für drei Patienten lagen keine Daten diesbezüglich vor.

Die Mehrzahl der Metastasen war in der Lunge, in den Weichteilen, den Knochen und den Lymphknoten lokalisiert. Eine Übersicht der Kollektiv-Charakteristika, sowie der 137 Metastasen gemäß ihrer Lokalisation, zeigt Tabelle 26:

Tabelle 26: Charakteristika des Metastasenkollektivs.

Metastasenkollektiv:			
Anzahl Patienten mit metastasiertem NZK		92	100%
Metastasierung	synchron	27	29,35%
	metachron	62	67,39%
	unbekannt	3	3,26%
Histologie Primärtumor	Klarzellig	83	90,22%
	Papillär	3	3,26%
	Chromophob	2	2,17%
	Unbekannt	4	4,35%

Anzahl Metastasen insgesamt		137	100%
Ort der Metastasierung	Lunge	35	25,55%
	Leber	5	3,65%
	Pleura	2	1,46%
	Nebenniere	11	8,03%
	Lymphknoten	15	10,95%
	Pankreas	6	4,38%
	Weichteile	21	15,33%
	Haut	1	0,73%
	Larynx	1	0,73%
	Hoden	2	1,46%
	Knochen	18	13,14%
	Lokalrezidiv	4	2,92%
	Grenzstrang	1	0,73%
	Zwerchfell	3	2,19%
	Mesokolon	1	0,73%
	Dünndarm	2	1,46%
	Gehirn	1	0,73%
	Peritoneum	1	0,73%
	Milz	1	0,73%
Unbekannt	6	4,38%	

Abkürzung: NZK = Nierenzellkarzinom

3.3.2 Expressionsanalyse

Es wurden Expressionsanalysen des Metastasenkollektivs durchgeführt. Da teilweise Cores in der Aufbereitung Schaden genommen hatten, konnten nicht alle erstellten Cores in die Expressionsanalyse eingeschlossen werden.

Die zytoplasmatische Rezeptorexpression des Metastasenkollektivs zeigte eine Ausprägung von 0,00 – 300,00 (Skala der zytoplasmatischen Expressionsanalyse: 0 - 300), die nukleäre Expression eine Ausbreitung von 0,00 – 100,00 (Skala der nukleären Expressionsanalyse: 0 - 100). Der mittlere zytoplasmatische Score lag bei 52,19 im Vergleich zu dem mittleren Score der nukleären Expression von 57,75. Der Median der zytoplasmatischen CXCR4-Expression lag bei 0,00, der Median der nukleären Expression bei 60,00. Tabelle 27 zeigt die für das Gesamtkollektiv erhobenen Parameter bezüglich der zytoplasmatischen und nukleären CXCR4-Expression.

Tabelle 27: Statistische Analyse der absoluten zytoplasmatischen und nukleären CXCR4-Expression des Metastasenkollektivs.

CXCR4-Expression	Nukleär (Anteil gefärbter Kerne)	Zytoplasmatisch (IRS)
Skala der Expressionsanalyse	0 - 100	0 - 300
Stichprobengröße	65	64
Minimaler Wert	0,00	0,00
Maximaler Wert	100,00	300,00
Mittelwert	57,75	52,19
95% KI des Mittelwerts	50,29 – 65,21	31,77 – 72,60
Median	60,00	0,00
95% KI des Medians	44,51 – 75,74	0,00 – 43,11

Abkürzungen: IRS = Immunreaktivitätsscore, KI = Konfidenzintervall

Nachfolgend wurden die Metastasen in 17 Gruppen unterschiedlicher Lokalisation unterteilt und das zytoplasmatische und nukleäre Expressionsniveau innerhalb der einzelnen Lokalisationen verglichen. Als Bezugsgröße wurde der Median herangezogen.

Abbildung 13 und Abbildung 14 stellen die Box-Plots der zytoplasmatischen und nukleären CXCR4-Expression in den verschiedenen Metastasenlokalisationen dar.

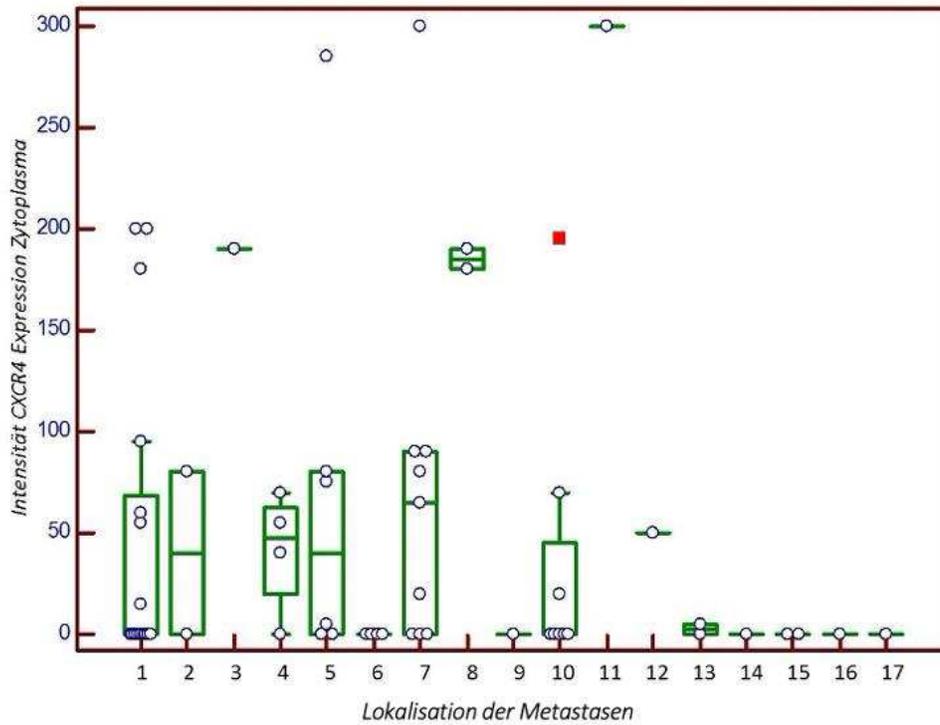


Abbildung 13: Zytoplasmatische CXCR4-Expression in Metastasengewebe unterschiedlicher Lokalisationen.

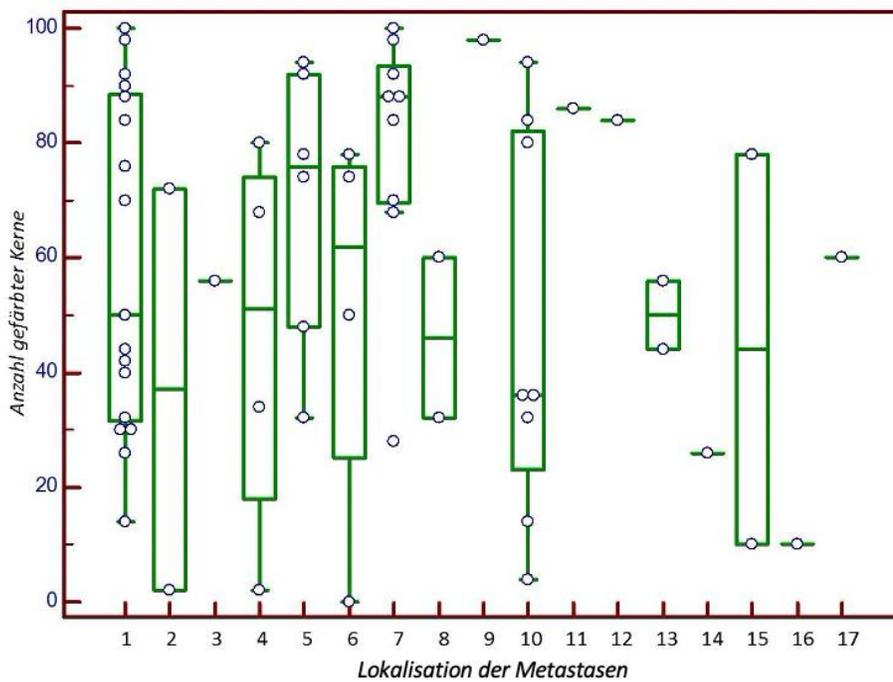


Abbildung 14: Nukleäre CXCR4-Expression in Metastasengewebe unterschiedlicher Lokalisationen.

Metastasenlokalisationen: 1 Lunge; 2 Leber; 3 Pleura; 4 Nebenniere; 5 LK; 6 Pankreas; 7 Weichteile; 8 Haut; 9 Larynx; 10 Knochen; 11 Lokalrezidiv; 12 Grenzstrang; 13 Zwerchfell/M. Psoas; 14 Mesokolon; 15 Dünndarm; 16 sonstige; 17 Peritoneum

Hinsichtlich der unterschiedlichen CXCR4-Expression zwischen den einzelnen Lokalisationen konnte eine deutliche Heterogenität beobachtet werden.

Metastasen der Lokalisation Haut (Median = 185,00), Pleura (Median = 190,00), Lokalrezidiv (Median = 300,00) und Weichteile (Median = 65,00) wiesen die stärkste zytoplasmatische Rezeptorexpression auf. Einige Lokalisationen wiesen einen Median von 0,00 auf. Darunter fielen Lunge, Pankreas, Larynx, Knochen, Mesokolon, Dünndarm, Peritoneum und Sonstige. Die Leber (Median = 40,00), Nebennieren (Median = 47,50), Lymphknoten (Median = 40,00), Grenzstrang (Median = 50,00) und Zwerchfell/M. Psoas (Median = 2,50) wiesen eine moderate zytoplasmatische Expression auf.

Die stärkste nukleäre Färbung konnte in den Lokalisationen Weichteile (Median = 88,00), Larynx (Median = 98,00), Lokalrezidiv (Median = 86,00), Grenzstrang (Median = 84,00) und Lymphknoten (Median = 76,00) beobachtet werden. Die geringste nukleäre Expression lag in den Lokalisationen Sonstige (Median = 10), Mesokolon (Median = 26), Knochen (Median = 36,00) und Leber (Median = 37,00) vor. Eine moderate nukleäre CXCR4-Expression wiesen Lunge und Zwerchfell/M. Psoas (jeweils Median = 50,00) auf, sowie Nebenniere (Median = 51,00), Pleura (Median = 56,00), Pankreas (Median = 62,00), Haut (Median = 46,00) und Dünndarm (Median = 44,00).

In Tabelle 28 und Tabelle 29 ist die detaillierte Expressionsanalyse der zytoplasmatischen und nukleären CXCR4-Expression der verschiedenen Lokalisationen der Metastasen dargestellt.

Tabelle 28: Zytoplasmatische CXCR4-Expression der verschiedenen Metastasenlokalisationen.

Lokalisation	Stichpro- bengröße	Mittelwert	Median	Minimaler Wert	Maximaler Wert
1= Lunge	17	47,35	0,00	0,00	200
2= Leber	2	40,00	40,00	0,00	80,00
3= Pleura	1	190,00	190,00	190,00	190,00
4= Nebenniere	4	41,25	47,50	0,00	70,00
5= LK	6	74,17	40,00	0,00	285,00
6= Pankreas	4	0,00	0,00	0,00	0,00
7= Weichteile	9	71,67	65,00	0,00	300,00
8= Haut	2	185,00	185,00	180,00	190,00
9= Larynx	1	0,00	0,00	0,00	0,00
10= Knochen	8	35,63	0,00	0,00	195,00
11= Lokal-rezidiv	1	300,00	300,00	300,00	300,00
12= Grenz-strang	1	50,00	50,00	50,00	50,00
13= Zwerchfell/M. Psoas	2	2,50	2,50	0,00	5,00
14= Mesokolon	1	0,00	0,00	0,00	0,00
15= Dünndarm	2	0,00	0,00	0,00	0,00
16= Sonstige	1	0,00	0,00	0,00	0,00
17= Peritoneum	1	0,00	0,00	0,00	0,00

Abkürzung: KI = Konfidenzintervall, LK = Lymphknoten, M. = Musculus

Tabelle 29: Nukleäre CXCR4-Expression der verschiedenen Metastasenlokalisationen.

Lokalisation:	Stichprobengröße	Mittelwert	Median	Minimaler Wert	Maximaler Wert
1= Lunge	17	59,18	50,00	14,00	100,00
2= Leber	2	37,00	37,00	2,00	72,00
3= Pleura	1	56,00	56,00	56,00	56,00
4= Nebenniere	4	46,00	51,00	2,00	80,00
5= LK	6	69,67	76,00	32,00	94,00
6= Pankreas	4	50,50	62,00	0,00	78,00
7= Weichteile	9	79,56	88,00	28,00	100,00
8= Haut	2	46,00	46,00	32,00	60,00
9= Larynx	1	98,00	98,00	98,00	98,00
10= Knochen	8	47,50	36,00	4,00	94,00
11= Lokal-rezidiv	1	86,00	86,00	86,00	86,00
12= Grenz-strang	1	84,00	84,00	84,00	84,00
13= Zwerchfell/M. Psoas	2	50,00	50,00	44,00	56,00
14= Mesokolon	1	26,00	26,00	26,00	26,00
15= Dünndarm	2	44,00	44,00	10,00	78,00
16= Sonstige	1	10,00	10,00	10,00	10,00
17= Peritoneum	1	60,00	60,00	60,00	60,00

Abkürzung: KI = Konfidenzintervall, LK = Lymphknoten, M. = Musculus

Wie in Tabelle 30 und Tabelle 31 dargestellt, lieferte die Kruskal-Wallis Analyse keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der jeweiligen Lokalisationen, wobei ob der geringen Stichprobengröße hier relevante methodische Einschränkungen vorliegen.

Tabelle 30: Kruskal-Wallis-Analyse zur zytoplasmatischen CXCR4-Expression innerhalb der Metastasenlokalisationen.

Faktoren: Lokalisation	Zytoplasmatische Färbung in Subgruppen IRS
Stichprobengröße	63
Teststatistik	17,3053
<i>Corrected for ties Ht</i>	20,2150
Freiheitsgrade	16
Signifikanzniveau	p = 0,210694

Abkürzung: IRS = Immunreaktivitätsscore

Tabelle 31: Kruskal-Wallis-Analyse zur nukleären CXCR4-Expression innerhalb der Metastasenlokalisationen.

Faktoren: Lokalisation	Nukleäre Färbung in Subgruppen
Stichprobengröße	63
Teststatistik	16,5841
<i>Corrected for ties Ht</i>	16,6048
Freiheitsgrade	16
Signifikanzniveau	p = 0,411602

3.4 Gegenüberstellung: Primärtumor, benignes Gewebe und Metastase

Abschließend erfolgte die Analyse der unterschiedlichen CXCR4-Rezeptorexpression zwischen klarzelligem Primärtumoren, benignem Nierengewebe und Metastasengewebe. Für die Analyse des Tumorgewebes sowie des benignen Gewebes wurden die Proben des Kollektiv 1 verwendet, die Proben des Metastasengewebes entstammen Kollektiv 3. Anhand der in Abbildung 15 und Abbildung 16 dargestellten Box-plots ist der Vergleich der zytoplasmatischen und nukleären Färbung der drei verschiedenen Gewebetypen dargestellt. Tabelle 32 und Tabelle 35 fassen die Expressionsanalysen zusammen.

Die zytoplasmatische Expression zeigte sich im benignen Gewebe mit einem Median von 130 am stärksten ausgeprägt. Im Vergleich dazu lag das mediane zytoplasmatische Expressionsniveau der Metastasen bei 17,5. Primäre Nierenzellkarzinome wiesen die geringste zytoplasmatische

Rezeptorausprägung mit einem Median von 0 auf (Skala der zytoplasmatischen Expressionsanalyse: 0 - 300). Im benignen Gewebe zeigte die nukleäre Expression einen medianen Wert von 56 und ist hier am geringsten ausgeprägt. Die klarzelligen, primären Nierenzellkarzinome wiesen die stärkste nukleäre CXCR4-Expression mit einem medianen Wert von 72 auf. Der mediane Wert des Metastasengewebes lag mit 68 dazwischen (Skala der nukleären Expressionsanalyse: 0 - 100).

Ein anschließend durchgeführter Kruskal Wallis Test bestätigte einen signifikanten Unterschied der drei Gruppen in ihrem Expressionsniveau sowohl zytoplasmatisch ($p < 0,000001$) als auch nukleär ($p = 0,0338$). Zur Feststellung, zwischen welchen Gruppen ein signifikanter Unterschied in der CXCR4-Expression vorliegt, wurde eine Post-hoc Analyse durchgeführt. Der Test zeigt, dass die zytoplasmatische Expression aller drei Gruppen signifikant unterschiedlich ist. Die Post-hoc-Analyse der nukleären Rezeptorausprägung ergab hingegen, dass sich nur der Mittelwert der benignen Gruppe von den Mittelwerten der beiden anderen Gruppen statistisch signifikant unterscheidet. Die Mittelwerte der malignen Gruppe und der Metastasen-Gruppe unterscheiden sich jeweils nur von dem Mittelwert der benignen Gruppe. In Tabelle 34 und Tabelle 37 sind die Ergebnisse der Post-hoc Analysen dargestellt.

Zytoplasmatische Gegenüberstellung:

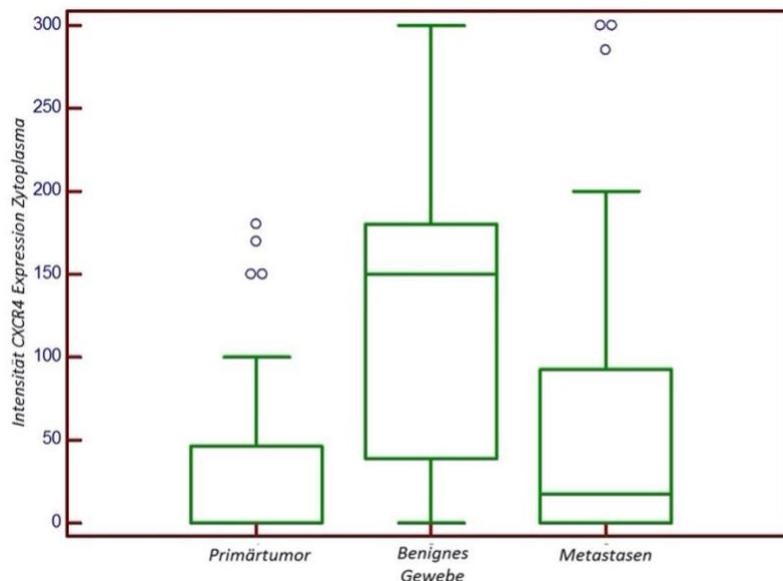


Abbildung 15: Zytoplasmatische CXCR4-Expression in Abhängigkeit des Analysegewebes.

Table 32: Gegenüberstellung der zytoplasmatischen CXCR4-Expression in Primärtumor und benignem Nierengewebe sowie Metastasengewebe.

Zytoplasmatische-CXCR4 Expression	Primärtumor	Benignes Gewebe	Metastasen
Skala der Expressionsanalyse: 0 - 300			
Stichprobengröße	59	59	64
Minimaler Wert	0,00	0,00	0,00
Maximaler Wert	180,00	300,00	300,00
Mittelwert	27,2	108,39	52,19
95% KI des Mittelwerts	14,79 – 39,62	87,23 – 129,55	31,77 – 72,60
Median	0,00	130,00	0,00
95% KI des Medians	0,00 – 2,49	75,00 – 160,00	0,00 - 43,11

Abkürzung: KI = Konfidenzintervall

Table 33: Kruskal-Wallis-Test der zytoplasmatischen CXCR4-Expression innerhalb der Gruppen maligne, benigne und Metastase

Faktoren: Primärtumor, benignes Gewebe, Metastasen	Zytoplasmatische CXCR4-Expression in Subgruppen
Stichprobengröße	208
Teststatistik	41,8844
Corrected for ties Ht	44,8595
Freiheitsgrade	2
Signifikanzniveau	p < 0,000001

Table 34: Post-hoc Analyse der zytoplasmatischen CXCR4-Expression innerhalb der Gruppen Primärtumor, benigne und Metastase.

Faktor	Stichprobengröße	Average Rank	Different (P<0,05) from factor nr
1	59	74,12	(2)(3)
2	53	146,87	(1)(3)
3	96	99,78	(1)(2)

Nukleäre Gegenüberstellung:

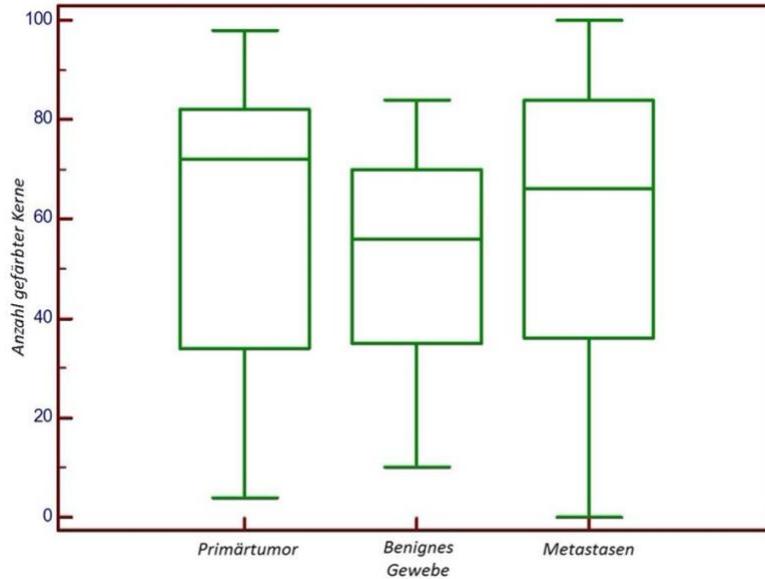


Abbildung 16: Nukleäre CXCR4-Expression in Abhängigkeit des Analysegewebes.

Tabelle 35: Gegenüberstellung der nukleären CXCR4-Expression in Primärtumor und benignem Nierengewebe sowie Metastasengewebe.

Nukleäre CXCR4-Expression	Primärtumor	Benignes Gewebe	Metastasen
Skala der Expressionsanalyse: 0 - 100			
Stichprobengröße	60	53	65
Minimaler Wert	4,00	10,00	0,00
Maximaler Wert	98,00	84,00	100,00
Mittelwert	61,50	51,04	57,75
95% KI des Mittelwerts	54,39 – 68,63	44,97 – 57,10	50,29 – 65,21
Median	71,00	56,00	60,00
95% KI des Medians	59,63 – 78,00	42,00 – 60,00	44,51 – 75,74

Abkürzung: KI = Konfidenzintervall

Tabelle 36: Kruskal-Wallis-Test der nukleären CXCR4-Expression innerhalb der Gruppen maligne, benigne und Metastase

Faktoren: Primärtumor, benignes Gewebe, Metastasen	Nukleäre CXCR4-Expression in Subgruppen
Stichprobengröße	206
Teststatistik	6,7681
Corrected for ties Ht	6,7736
Freiheitsgrade	2
Signifikanzniveau	p = 0,033817

Tabelle 37: Post-hoc Analyse der nukleären CXCR4-Expression innerhalb der Gruppen Primärtumor, benigne und Metastase

Faktor	Stichprobengröße	Average Rank	Different (P<0.05) from factor nr
1	59	111,63	(2)
2	52	85,04	(1)(3)
3	95	108,56	(2)

3.5 Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse

Das Kollektiv der klarzelligen Nierenzellkarzinome zeigte eine signifikant unterschiedliche CXCR4-Ausprägung zwischen malignem Gewebe und benignem Nierengewebe, sowohl in der zytoplasmatischen ($p < 0,0001$) als auch der nukleären ($p = 0,00291$) Expression. Hierbei zeigte sich für die zytoplasmatische Expression ein höherer IRS im benignen Gewebe, malignes Gewebe wies jedoch eine höhere Anzahl gefärbter Kerne auf. In der univariaten Korrelationsanalyse der CXCR4-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern konnte eine erwartbare Abhängigkeit des Gesamtüberlebens und des tumorspezifischen Überlebens der Patienten bezüglich der Parameter Tumorstadium \geq T2, positiver Lymphknoten-Status, positive lymphovaskuläre Invasion, positive venöse Invasion, Grading $>$ G2 sowie mit sarkomatoider Differenzierung beobachtet werden. Ebenso bestätigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen positiver zytoplasmatischer CXCR4-Expression und lymphovaskulärer Invasion ($p = 0,0097$). Dies identifiziert die zytoplasmatische CXCR4-Expression als univariaten negativ-prognostischen

Marker. Für Patienten mit positiver zytoplasmatischen Expression größer des Mittelwerts wurde ebenfalls ein 3,04-fach erhöhtes Risiko zu versterben beobachtet. Das tumorspezifische Überleben korrelierte ebenso statistisch signifikant ($p = 0,0317$) mit positiver zytoplasmatischer CXCR4 Expression. In Überlebenszeitanalysen wiesen Patienten mit positiver zytoplasmatischer CXCR4-Expression, im Vergleich zur Gruppe ohne zytoplasmatische CXCR4-Expression, ein deutlich kürzeres Gesamtüberleben ($p = 0,042$) wie auch ein kürzeres tumorspezifisches Überleben ($p = 0,019$) auf. Die zytoplasmatische CXCR4-Expression zeigte sich in diesen univariaten Analysen als negativer, prognostischer Faktor. Multivariate Analysen am Kollektiv organbegrenzter Nierenzellkarzinome konnten diesen Charakter jedoch nicht bestätigen.

Für das Kollektiv der Nierentumore unterschiedlicher histologischer Genese zeigt die Kruskal-Wallis Analyse mit anschließender post hoc Analyse, dass die verschiedenen Subgruppen signifikant unterschiedliche zytoplasmatische und nukleäre CXCR4 Expressionen aufwiesen, ohne einen klaren Zusammenhang der Expression vom benignen oder malignen Grundcharakter des Gewebes zu zeigen. Hierbei zeigt sich in der zytoplasmatischen Expressionsanalyse für die Gruppe der papillären Nierenzellkarzinomen die ausgeprägtesten Unterschiede zu den anderen Subgruppen, in der nukleären Analyse galt dies für die chromophoben Nierenzellkarzinome.

Die Metastasen wiesen in ihrer zytoplasmatischen und nukleären CXCR4-Expression keinen statistischen Unterschied zwischen den einzelnen Lokalisationen auf.

In der abschließenden Gegenüberstellung von Primärtumor (klarzellige Nierenzellkarzinome), benignem Nierengewebe und Metastasengewebe zeigte sich anhand des Kruskal-Wallis Tests ein signifikanter Unterschied in der zytoplasmatischen ($p < 0,000001$) Expression der drei Gruppen. In der angeschlossenen post hoc Analyse zeigten sich die Gruppen untereinander signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$).

Die nukleäre CXCR4-Expression wies ebenfalls einen signifikanten Unterschied in den Expressionsniveaus zwischen den drei Gruppen auf ($p = 0,033817$), wobei sich in der post-hoc Analyse nur der Mittelwert der benignen Gruppe von den Mittelwerten der beiden anderen Gruppen statistisch signifikant unterschied.

4 Diskussion

Das Nierenzellkarzinom stellt anteilig etwa drei Prozent aller Tumorerkrankungen weltweit dar.¹⁴⁰ Trotz zunehmender Detektion der Karzinome in frühen Stadien, präsentieren sich 25 - 30% aller Patienten bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mit Fernmetastasen. Ein weiteres Drittel der Patienten mit kurativ intendierter Nephrektomie entwickeln im Verlauf Metastasen.⁶ Aufgrund der Strahlen- und Chemotherapie-Resistenz stellt darüber hinaus auch die Therapie des Nierenzellkarzinoms eine besondere Herausforderung dar. Trotz deutlicher Fortschritte der Therapieansätze liegt die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit im fortgeschrittenen Stadium weiterhin bei lediglich 15%.⁴⁶ Auch die prognostischen Modelle zeigen sich limitiert. Nicht selten weisen Patienten mit ähnlichen klinisch-pathologischen Merkmalen unterschiedliche Verläufe und *Outcomes* auf.¹⁴¹ Prognosebestimmende Einflussfaktoren sind noch nicht vollständig verstanden. In dieser Problematik begründet liegt die stetige Forschung und Weiterentwicklung der zielgerichteten Therapien, sowie die Notwendigkeit, die Risikostratifizierung und Verlaufseinschätzung der Patienten durch Identifizierung prognostischer und prädiktiver Marker zu verbessern.

Einer dieser Marker ist CXCR4. Der CXCR4-Rezeptor ist im physiologischen Zustand hauptsächlich an der Chemotaxis, Zellproliferation sowie der Induktion bestimmter Gentranskriptionen beteiligt. In malignen Zellen stellt CXCR4 jedoch einen Promoter für Tumorwachstum, Metastasierungsprozesse und Neoangiogenese dar.^{95,96} Eine Überexpression von CXCR 4 wurde mittlerweile für mehr als 23 Tumorarten nachgewiesen.¹⁰⁴ Einige Studien belegen erhöhte Expressionen des Rezeptors auch in Nierenzellkarzinomen.¹³⁰ Hierbei zeigen die Studien jedoch in Design, Analysemethode und analysierten Zellkompartimenten eine hohe Heterogenität, was die Validierung der tatsächlichen klinischen Bedeutung des Rezeptors für das Nierenzellkarzinom einschränkt.¹³⁰

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CXCR4 mittels immunhistochemischer Färbung auf Proteinebene in verschiedenen histologischen Nierengeweben untersucht. Diese umfassten klarzellige, papilläre und chromophobe Nierenzellkarzinome, benigne Nierentumore (Onkozytome, Angiomyolipome und Zystengewebe) sowie Metastasengewebe der Nierenzellkarzinome. Die Analyse beinhaltete die Untersuchung der nukleären und

zytoplasmatischen Proteinexpression. Es erfolgte weiterhin die Korrelation der Resultate mit klinischen und pathologischen Parametern sowie die Korrelation der Expression mit Überlebensdaten, um so die prognostische Relevanz des CXCR4-Rezeptors zu beurteilen. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit erörtert und im Zusammenhang der aktuellen Studienlage diskutiert werden.

4.1 Klarzelliges Nierenzellkarzinom Kollektiv

4.1.1 CXCR4-Expression und subzelluläre Distribution

Hinsichtlich der CXCR4-Expression wurde zunächst das Expressionsmuster in klarzelligem Nierenzellkarzinomen und dem korrespondierenden benignen Nierengewebe analysiert. Zytoplasmatisch zeigte sich eine positive CXCR4-Färbung in 98% des benignen Gewebes und in 38,9% des malignen Gewebes. Auch die Intensität der Färbung unterscheidet sich signifikant zwischen dem gut- und bösartigen Gewebe: Während sich der mediane IRS im malignen Gewebe bei 0 zeigte, lag er im benignen Gewebe bei 130. Dies bestätigt sich auch im Vergleich der Mittelwerte. Im benignen Gewebe liegt dieser bei 108,39 und im malignen Gewebe bei 27,2.

In der nukleären Färbung gab es ebenfalls Unterschiede: Während sich im benignen Gewebe 94,1% der Kerne gefärbt zeigten, traf dies nur für 83% der Kerne des malignen Gewebes zu. Interessanterweise zeigte sich jedoch in der Analyse der Intensität eine stärkere Ausprägung der Färbung in malignem Gewebe (Mittelwerte & Median der nukleären Färbung benigne vs. maligne 51,04 vs. 61,5 bzw. 56 vs. 71).

Diese heterogenen Ergebnisse sprechen gegen die in der Einleitung aufgestellte, auf Literaturrecherche beruhende Hypothese, dass Nierenzellkarzinome stets eine höhere CXCR4-Expression aufweisen, als benignes Nierengewebe. Insbesondere der Wechsel der Expressionsintensität im Vergleich maligne vs. benigne von zytoplasmatischer zu nukleärer Färbung ist hervorzuheben und deutet auf eine mögliche funktionelle Bedeutung der nukleären CXCR4-Expression hin. Diese lässt sich jedoch im Rahmen dieser immunhistochemischen Arbeit nicht beantworten und unterstreicht die Relevanz der subzellulären Lokalisation des Rezeptors.

Unsere Ergebnisse stehen teils im Widerspruch zur vorhandenen Literatur: Eine 2015 veröffentlichte Metaanalyse von Tang et al. konnte nach Einschluss von 11 Studien und 994 Patienten mit Nierenzellkarzinomen eine signifikant höhere immunhistochemisch nachgewiesene CXCR4-Expression in Nierenzellkarzinomen als in benignem Nierengewebe aufzeigen.¹³⁰

Enthalten in der Metaanalyse von Tang et al. ist unter anderem die Studie von Schrader et al., welche als eine der ersten Studien bereits 2002 an zehn Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen eine heterogene, aber konstante Hochregulation von CXCR4 in Tumorgewebe verglichen zu benignem Gewebe festhielt.¹²¹ Die ebenso eingeschlossene Studie von Wehler et al. (2008) beschrieb an 113 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom eine 100% CXCR4-Expressionsrate in malignem Gewebe.

Auffallend ist eine hohe Heterogenität der analysierten Rezeptorlokalisierung in den in diese Metaanalyse einfließenden Studien. Als G-Protein gekoppelter Rezeptor ist eine primär membranöse Lokalisation des Rezeptors zu erwarten. Dies bestätigt sich auch im *Human Protein Atlas*, der eine überwiegende Lokalisation des Rezeptors an der Zelloberfläche und somit membranständig beschreibt.¹⁴⁸ Jedoch beschrieb beispielsweise Wehler et al. die CXCR4-Expression in malignem Gewebe ausschließlich im Zytoplasma. Ob für die malignen Gewebeproben weitere subzelluläre Lokalisationen analysiert wurden, ging aus der Studie nicht hervor. Das benigne Vergleichsgewebe zeigte ebenfalls eine ausgeprägte zytoplasmatische CXCR4-Färbung, hier wurde zusätzlich auch eine teils membranöse Färbung genannt.¹⁴⁹

In einer Studie zur subzellulären Distribution des CXCR4-Rezeptors zeigten Wang et al. 2009, dass CXCR4 in Primärtumoren hauptsächlich membranös lokalisiert sei, in Metastasengewebe jedoch vor allem zytoplasmatisch. Festzuhalten ist jedoch, dass Wang et al. in dieser Studie keine Analyse der nukleären Färbung, sondern ausschließlich der zytoplasmatischen und membranösen Färbung durchführte. Demgegenüber veröffentlichten Wang et al. 2012 eine Studie von 97 Patienten mit Nierenzellkarzinom und fanden, anders als zuvor beschrieben, eine dominierende nukleäre CXCR4-Expression im Tumorgewebe.¹²⁴ In der vorliegenden Arbeit wurde die zytoplasmatische Färbung sowie die nukleäre Färbung evaluiert. Allgemein gilt es kritisch zu hinterfragen, ob das immunhistochemische Verfahren geeignet ist, die subzellulären Lokalisationen voneinander zu unterscheiden. Eine eindeutige Differenzierung zwischen

membranöser und submembranöser, also zytoplasmatischer Rezeptorlokalisierung zeigt sich in der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen schwierig.

Die Internalisierung des CXCR4 - Rezeptors nach Interaktion durch seinen Liganden CXCL12 ist die Initiierung der subzellulären Reise des Rezeptors.¹⁵⁰

Welche genauen subzellulären Lokalisationen der Rezeptor nach Aktivierung durchläuft und welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, ist noch nicht ausreichend erforscht.

Bekannt ist, dass die Aktivierung des CXCR4 Rezeptors durch Ligandenbindung mittels CXCL12 verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden auslöst. Diese fördern in malignem Gewebe die Proliferation, Angiogenese sowie Metastasierung der Tumorzellen.⁹²

Unabhängig davon wird der Rezeptor nach Ligandenbindung von Rezeptor-Kinasen phosphoryliert und internalisiert.^{99,151} Es gibt einige Studien, die auf eine nachfolgende Translokation des CXCR4 Rezeptors in den Zellkern hinweisen und einen Zusammenhang zwischen nukleärer Lokalisation und Tumorprogression bzw. Metastasierung zeigen.¹⁵²⁻¹⁵⁶

Die beschriebene Heterogenität der CXCR4-Rezeptor Lokalisation bringt die Frage auf, ob der CXCR4-Rezeptor zu verschiedenen Zeiten der Tumorgenese unterschiedliche Lokalisationen durchläuft und welche Auswirkungen die Lokalisation des Rezeptors auf die Tumorprogression und damit auf den Verlauf der Erkrankung und die Prognose der Patienten hat. In diesem Zusammenhang ist die 2019 erstellte Studie von Bao et al. interessant. Sie analysierten den Einfluss der nukleären CXCR4-Expression in Nierenzellkarzinomen und kamen zu dem Ergebnis, dass die nukleäre Lokalisation von CXCR4 zu einer Translokation von HIF-1 in den Nukleus führte und so die Transkription der Down-Stream Gene von HIF-1 fördere.¹⁵² Die Akkumulation, beziehungsweise nukleäre Translokation von HIF-1 führt zur Neoangiogenese und der Transkription von Zellwachstum stimulierender Zielgene wie der Tyrosinkinasen VEGF oder PDGF. Diese wiederum sind Angriffspunkt bestimmter Tyrosinkinase-Inhibitoren.⁷³ Die nukleäre Lokalisation von CXCR4 könnte demnach eine wichtige Bedeutung im Malignitätspotenzial der Karzinome haben und durch die Interaktion mit HIF-1 einen ausschlaggebenden Faktor für die Wahl der medikamentösen Therapie darstellen. Auf therapeutische Strategien wird im Verlauf eingegangen. Welche intrazellulären Vorgänge den CXCR4 Rezeptor zum Nukleus führen ist bislang noch nicht geklärt. Größere Proteine, wie beispielsweise der CXCR4 Rezeptor, benötigen

eine „nukleäre Lokalisations-Sequenz“ (NLS - *nuclear localization sequenz*) um zum Zellkern transportiert zu werden und Zugang zu dem Nukleus zu erhalten. Diese nukleäre lokalisations-Sequenz wird von Import-Rezeptoren der Zellkernmembran erkannt und führt zur nukleären Translokation des Proteins.^{153,154}

Bereits 2011 beschrieben Wang et al. eine nukleäre lokalisations-Sequenz in CXCR4, welche die Translokation des Rezeptors in den Zellkern induziere.¹⁵⁵

Eine 2016 veröffentlichte Studie von Xu et al. bestätigte anhand von in vitro Daten einen Zusammenhang der nukleären lokalisations-Sequenz in CXCR4 und seinem nukleären Vorkommen. Durch pharmazeutische Inhibierung der Wechselwirkung zwischen Zellkern und der nukleären lokalisations-Sequenz des CXCR4 zeigte sich die nukleäre Translokation gebremst, sowie auch das Metastasierungspotenzial der Nierentumorzellen erniedrigt.¹⁵⁶

Die in unserem Kollektiv beschriebene höhere Intensität der nukleären CXCR4-Färbung in malignen Nierengeweben könnte ein Hinweis auf die oben beschriebene nukleäre Translokation sein, welche eine wichtige Rolle in den Abläufen der tumorfördernden Prozesse zu spielen scheint.¹⁵² Dennoch stellt die uneinheitliche Analyse der subzellulären Distribution von CXCR4 eine bedeutende Limitation für den Vergleich der unterschiedlichen Studienergebnisse dar.

Des weiteren wurde in einigen Studien postuliert, dass eine hohe CXCR4-Expression in Zusammenhang mit dem Vorgang der Metastasierung steht und demnach als prognostischer Marker fungieren könnte:

In einer Studie von 2012 berichten Gahan et al. in univariater Analyse von einem signifikanten Zusammenhang zwischen CXCR4-RNA Expression und dem Prozess der Metastasierung. Sie berichteten, dass die Patienten, welche entweder zum Zeitpunkt der Operation Metastasen aufwiesen oder innerhalb des *Follow-up* Metastasen entwickelten, bereits höhere CXCR4-Expressionen in dem Primärtumorgewebe zeigten, als die Patienten ohne Metastasierung.¹⁵⁷ Eine Einschränkung der Studie stellt der kurze *Follow-up* Zeitraum mit einem Median von 18 Monaten dar. Wünschenswert wäre demnach eine Studie, welche die CXCR4-RNA-Expression in Primärtumoren und gematchtem Metastasengewebe mit längerem *Follow-up* vergleicht.

Zusammenfassend lässt sich also hinsichtlich der Expression von CXCR4 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen sagen, dass die initial aufgestellte Hypothese der durchgängig höheren CXCR4-Expression in malignem Gewebe im Vergleich zum benignen Gewebe sich bei der Analyse der verschiedenen Zellkompartimente in unseren Auswertungen nicht bestätigt. Insbesondere die höhere nukleäre Expression von CXCR4 in malignem Gewebe könnte aber ein Hinweis für eine funktionelle Bedeutung der Translokation des CXCR4-Rezeptors von der Membran in den Zellkern sein. Die Vergleichbarkeit zu anderen Ergebnissen ist durch die hohe Heterogenität der analysierten Zellkompartimente eingeschränkt. Bemerkenswert ist jedoch die bestehende Evidenz hinsichtlich der funktionellen Bedeutung der nukleären Translokation von CXCR4 für den Progress der Erkrankung.

4.1.2 Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern und Überleben

In Bezug auf die Korrelation der nukleären und zytoplasmatischen CXCR4-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern der Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom konnte in der vorliegenden Arbeit ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer positiven zytoplasmatischen CXCR4-Expression und der lymphovaskulären Invasion ($p = 0,0097$) gezeigt werden. Die lymphovaskuläre Invasion ist als relevanter histologischer Risikofaktor im Nierenzellkarzinom bestätigt.⁸² Die vorliegende positive Korrelation zwischen der zytoplasmatischen CXCR4 Expression und der lymphovaskulären Invasion gibt einen weiteren Hinweis auf die Relevanz von CXCR4 als prognostisch negativen Marker.

Für die Parameter Tumorstadium T2, positiver LK-Status, positive venöse Invasion, Grading G2 und sarkomatoide Differenzierung konnte keine positive Korrelation zur CXCR4-Expression bestätigt werden. Die Unabhängigkeit der CXCR4-Expression von diesen klinisch-pathologischen Markern macht den Chemokin-Rezeptor zu einem unabhängigen, potenziellen Biomarker für das Nierenzellkarzinom.

Motivation dieser Arbeit war auch, die prognostische Relevanz von CXCR4 auf das Überleben der Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom zu ermitteln. Dafür wurden uni- und multivariate Cox-Regressionsanalysen erstellt. Die prognostische Relevanz des CXCR4-Rezeptors konnte in dieser Arbeit hauptsächlich der zytoplasmatischen Lokalisation des Rezeptors zugeschrieben

werden, was basierend auf den oben genannten Ausführungen einer möglichen Internalisierung des membranständigen G-Proteins entspricht.

In univariater Cox-Regression konnte den Erwartungen entsprechend eine Abhängigkeit des Gesamtüberlebens und tumorspezifischen Überlebens bezüglich der Parameter Tumorstadium 2, sarkomatoider Differenzierung, positiver Lymphknotenstatus, vaskulärer Invasion, lymphovaskulärer Invasion und dem Grading G2 bestätigt werden. Diese Parameter entsprechen einer Vielzahl der EAU bestätigten prognostischen Faktoren.¹¹ Des Weiteren konnte auch die zytoplasmatische CXCR4-Expression \geq des Mittelwertes statistisch signifikant in Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben der Patienten gebracht werden ($p = 0,0457$) und resultierte in einer 3-fachen Erhöhung der Hazard Ratio ($HR = 3,0454$). Für die nukleäre Expression traf dies bei einem p-Wert von 0,5529 nicht zu.

Dies identifiziert die zytoplasmatische CXCR4-Expression in univariater Analyse als prognostischen Marker. Dieser Charakter bestätigte sich im Rahmen der multivariaten Cox-Regression dieser Arbeit jedoch nicht. Interessanterweise zeigten sich auch die anderen Parameter nicht als unabhängige Prognosefaktoren, was auf einen möglichen Zusammenhang zur limitierten Patientenzahl hinweisen könnte.

In den Kaplan-Meier Analysen bestätigte sich ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben ($p = 0,042$) der Patienten mit positiver zytoplasmatischen CXCR4-Expression verglichen mit Patienten ohne zytoplasmatische CXCR4-Expression. Während Patienten ohne zytoplasmatische CXCR4-Expression ein Gesamtüberleben von 74,8 Monaten (95% KI: 66,9 – 82,6) aufwiesen, lag das Gesamtüberleben der Patienten mit positiver zytoplasmatischen CXCR4-Expression lediglich bei 58,8 Monaten (95% KI: 45,5 – 72,0). Bezüglich des tumorspezifischen Überlebens zeigten die Patienten mit positiver zytoplasmatischen CXCR4-Expression ein signifikant verkürztes Überleben ($p = 0,019$).

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass die zytoplasmatische CXCR4-Expression als negativer prognostischer Faktor für das Gesamt- und tumorspezifische Überleben gilt, sowie als univariater prognostischer Marker herangezogen werden könnte. Die prognostische Relevanz des CXCR4-Rezeptors sollte jedoch in Studien größerer Stichproben weiter untersucht werden.

Die erhobenen Resultate stehen in Übereinstimmung der 2015 erstellten Metaanalyse von Du et al., welche anhand von 7 eingeschlossenen Studien und insgesamt 1068 Patienten die prognostische Relevanz von CXCR4 in Nierenzellkarzinomen ermittelte. Die Ergebnisse der Metaanalyse zeigten, dass eine hohe Expression ein verkürztes Gesamtüberleben vorhersagt (HR = 2,77, 95% KI = 1,80 - 4,27), sowie mit einem verkürzten progressionsfreien Intervall einhergeht (HR = 4,83, 95% KI = 2,30 - 10,15). Zu erwähnen ist jedoch, dass die sieben eingeschlossenen Studien der Metaanalyse in einigen Aspekten kritisch zu vergleichen sind. Patientencharakteristika wie Geschlecht oder Alter wurden nicht eingeschlossen und die immunhistochemischen Verfahren der verschiedenen Studien unterlagen nicht vereinheitlichten Methoden. Des Weiteren wurde kein Unterschied zwischen unterschiedlichen Subgruppen der Nierenzellkarzinome gemacht, obwohl auch die Histologie des Nierenzellkarzinoms Einfluss auf die Prognose hat.¹¹

Ein prognosebestimmender Charakter von CXCR4 zeigt sich auch in weiteren soliden Tumoren: So konnte für das Magenkarzinom der CXCR4-Rezeptor anhand von Metaanalysen als negativer prognostischer Marker identifiziert werden.¹⁵⁸

In Brusttumoren stellte eine Studie von Yasuoka et al. einen Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen CXCR4-Expression und einem verkürzten Gesamt- und krankheitsfreien Überleben her, und bestätigte in multivariater Analyse die CXCR4-Expression als unabhängigen Prädiktor für das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben.¹⁵⁹

Einen interessanten Fall stellt das Ovarialkarzinom dar: Hier existiert eine Diskrepanz zwischen der prognostischen Bedeutung der mRNA-Expression von CXCR4 und der prognostischen Bedeutung der Proteinexpression (immunhistochemischen Expression). Einerseits wird eine hohe CXCR4-Expression auf mRNA Niveau als prognostisch günstig beschrieben.¹⁴⁸ Andererseits existieren einige Studien, welche bereits zur Metaanalyse zusammengefasst wurden, die anhand von immunhistochemischen Analysen eine hohe CXCR4 Proteinexpression als prognostisch ungünstig bestätigen.¹⁶⁰ Dies ist nicht als widersprüchlich zu sehen: Vielmehr lässt sich anhand dieses Beispiels nachvollziehen, dass mRNA Expressionsergebnisse der tatsächlichen Proteinexpression nicht grundsätzlich gleichgesetzt werden können.¹⁶¹ Das komplexe Zusammenspiel von inhibierenden und stimulierenden Faktoren der mRNA Translation beeinflusst das Protein-Expressionsniveau. Auch post-translationale Mechanismen modifizieren individuell den Proteinaufbau.

Basierend auf mRNA Untersuchungen wird CXCR4 im Human Protein Atlas für das Nierenzellkarzinom als nicht-vorteilhafter prognostischer Marker geführt.¹⁴⁸ Für das Nierenzellkarzinom hingegen zeigt sich demnach sowohl durch immunhistochemische- als auch mRNA-Analysen CXCR4 als prognostisch ungünstiger Marker.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass sich die prognostische Wertigkeit von CXCR4 im Nierenzellkarzinom bestätigt. Unsere Ergebnisse sind hierbei der vorhandenen Evidenz entsprechend. Sie zeigen in der univariaten Analyse, dass die zytoplasmatische CXCR4-Expression in klarzelligen Nierenzellkarzinomen mit einem verkürzten Gesamt- und tumorspezifischen Überleben einhergeht. Da die multivariaten Analysen dies jedoch nicht belegen konnten, ist der prognostische Charakter des CXCR4-Rezeptors in dieser Arbeit nur bedingt bestätigt, was auch durch die limitierte Patientenzahl im Kollektiv 1 bedingt sein könnte.

4.2 Nierentumorkollektiv

In bisherigen Studien galt die CXCR4-Expressionsanalyse hauptsächlich klarzelligen Nierenzellkarzinomen sowie korrespondierenden benignen Gewebearealen. Zum Zweck eines umfassenderen Verständnisses der CXCR4-Expressionsausprägung wurden in der vorliegenden Arbeit darüber hinaus sechs unterschiedliche maligne und benigne Subgruppen auf die differentielle CXCR4-Rezeptorexpression untersucht. Anhand eines Kollektivs von 146 Patienten konnte die nukleäre und zytoplasmatische CXCR4-Expression in 87 klarzelligen, 14 papillären und sieben chromophoben Nierenzellkarzinomen sowie in 16 Onkozytomen, zehn Angiomyolipomen und sieben Zysten verglichen werden. Fünf Gewebeproben waren keiner eindeutigen Lokalisation zuzuordnen. Die Ergebnisse zeigten sich erwartbar in ihrer Ausprägung sehr inhomogen, wobei sich die zytoplasmatische CXCR4-Expression zwischen den Subgruppen in einem durchgeführten Kruskal-Wallis Test mit nachfolgender post hoc statistisch signifikant unterschiedlich zeigte, ebenso die nukleäre Färbung.

Es ließ sich zytoplasmatisch (Median: 117,5) und auch nukleär (Median: 41,50) eine starke CXCR4-Expression in papillären Nierenzellkarzinomen beobachten. Die Subgruppe der

chromophoben Nierenzellkarzinome und der Angiomyolipome zeigten insgesamt die schwächste CXCR4-Ausprägung.

Eine interessante Beobachtung stellt die hohe zytoplasmatische CXCR4 Expression in Onkozytomen dar (Median 100,00), besonders im Vergleich mit der niedrigen zytoplasmatischen Expression der klarzelligen Nierenzellkarzinome (Median 0,00). In der klinisch häufig schwierigen Differenzierung dieser zwei Entitäten könnte eine CXCR4 gerichtete Bildgebung, wie sie beispielsweise mittels PlerixaFor bereits erforscht wird, hier zukünftig Anwendung finden.

Konträr zu der oben diskutierten Annahme, dass eine starke nukleäre CXCR4-Expression mit erhöhter Malignität einhergeht, ist das Ergebnis der nukleären Rezeptorexpression im Zystengewebe. Dies zeigt die Komplexität der tatsächlichen pathophysiologischen Bedeutung von CXCR4: Mit einem Median von 90 stellte dies den höchsten Wert der nukleären Expression in den hier analysierten Subgruppen dar. Jedoch war die Stichprobengröße der Zysten-Subgruppe mit vier Gewebeprobe, die in die Analyse miteinfließen konnten, unzureichend groß für einen repräsentativen Vergleich. Abgesehen der vier Zystengewebeprobe wiesen klarzellige und papilläre Nierenzellkarzinome die höchste nukleäre CXCR4-Expression auf, was wiederum für die Hypothese spricht, dass eine hohe nukleäre CXCR4-Expression mit einem erhöhten Malignitätspotenzial einhergeht.

Einen ähnlichen Ansatz der CXCR4-Expressionsanalyse in verschiedenen Subtypen von Nierentumoren verfolgte eine Studie von Gahan et al. Wenngleich die Expressionsanalyse auf mRNA Ebene erfolgte, sowie neben der CXCR4-Expression noch weitere Chemokine und Chemokinrezeptoren wie unter anderem CXCR7 und IL-8 in ihre Analyse mit eingeschlossen wurden. Ihr Ergebnisse zeigten eine ähnliche Tendenz zu denen der vorliegenden Arbeit.¹⁵⁷ Sie untersuchten Proben von 65 klarzelligen, zehn papillären und fünf chromophoben Nierenzellkarzinomen, sechs Onkozytomen, 17 Metastasen sowie 80 benignen Nierengewebe-Proben. Klarzellige und papilläre Nierenzellkarzinome zeigten eine 2 – 4 -fach höhere CXCR4-Expression im Vergleich zu benignem Nierengewebe, sowie eine 10 – 20 -fach höhere CXCR4-Expression im Vergleich zur Gruppe der Onkozytome. Allerdings lässt sich diese klare Tendenz der zunehmenden CXCR4-Expression in malignem Gewebe im Unterschied zu benignen Tumoren in unserer Analyse nicht vergleichbar eindeutig verifizieren.

Zwei weitere Publikationen untersuchen die differentielle CXCR4-Ausprägung in verschiedenen Subgruppen der Nierenzellkarzinome:

Eine Studie von Rasti et al. analysierte durch immunhistochemische Färbung die CXCR4-Ausprägung in 106 klarzelligen, 35 papillären und 32 chromophoben Nierenzellkarzinomen. Die Rezeptorausprägung beschrieb die Studie hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert. Ihre Ergebnisse zeigten eine signifikant höhere CXCR4-Expression in papillären und chromophoben Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu der klarzelligen Subgruppe. Ebenfalls beschrieben sie eine signifikante Korrelation zwischen einer hohen CXCR4-Expression der Nierenzellkarzinome und einem höheren Tumorstadium, sowie einer höheren Entdifferenzierung auf. Des Weiteren wurde nicht nur die Rezeptorausprägung, sondern auch die Intensität der Rezeptorausprägung mittels Chi-Quadrat-Tests in signifikanten Zusammenhang mit dem Tumorstadium gebracht.¹⁶²

Floranovic et al. untersuchen in einer Studie von 2021 die zytoplasmatische und membranöse CXCR4- und CXCR7-Ausprägung in klarzelligen und papillären Nierenzellkarzinomen. Anhand 85 klarzelligen und 13 papillären Gewebeproben konnten sie mittels immunhistochemischer Analyse eine höhere zytoplasmatische CXCR4-Expression in der papillären Subgruppe nachweisen. Membranös wies die klarzellige Subgruppe höhere Expressionswerte auf. Eine prognostische Wertigkeit des CXCR4-Rezeptors ließ sich in dieser Studie weder für die zytoplasmatische noch für die membranöse Rezeptor-Ausprägung nachweisen.¹⁶³

Die Resultate der Expressionsanalysen dieser Studien, wie auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, bestätigen einen signifikanten Unterschied der CXCR4-Ausprägung zwischen den histologischen Subgruppen der Nierenzellkarzinome.

4.3 Metastasenkollektiv

Zahlreiche Studien ließen eine gerichtete Migration von CXCR4 tragenden Tumorzellen in Abhängigkeit des CXCL12 Gradienten erkennen.^{164,165} Organe mit besonders hohen Expressionsniveaus von CXCL12 wie Lunge, Leber, Skelettmuskel, Gehirn und Knochenmark sind dadurch stärker von der Invasion CXCR4 tragender Tumorzellen betroffen.⁹² Die genannten Lokalisationen stellen einige der häufigsten Metastasierungsorte von Nierenzellkarzinomen dar,

was auf einen CXCR4 gerichteten Vorgang der Metastasierung hinweisen könnte. Zhao et al. untersuchten in diesem Zusammenhang die CXCR4- und CXCL12-Expression in Proben von zehn Nierenzellkarzinomen und 30 Knochenmetastasen mittels Immunhistochemie, Western Blot und RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*). Alle drei Verfahren bestätigten eine signifikant höhere CXCR4-Expression in den Knochenmetastasen verglichen mit den Proben des primären Nierenzellkarzinoms ($p = 0,014$). Ihre Studie lieferte einen wichtigen Hinweis des Einflusses der CXCR4/CXCL12-Achse auf den Metastasierungsprozess in Nierenzellkarzinomen.¹⁶⁶

Dies führte zu der initial erwähnten Hypothese, dass Metastasen - möglicherweise als Hinweis für eine höhere biologische Aggressivität - ein höheres CXCR4-Expressionsniveau zeigen als Primärtumore. Es resultierte die Motivation, in dieser Arbeit ebenfalls eine Expressionsanalyse in den unterschiedlichen Lokalisationen der Metastasen, sowie im Vergleich der Metastasen zum Primärtumorgewebe durchzuführen. Bisher existieren kaum publizierte Daten zur CXCR4-Expression in den unterschiedlichen Lokalisationen der Metastasen von Nierenzellkarzinomen. Es wurden in dieser Arbeit insgesamt 137 Metastasen zur Expressionsanalyse eingeschlossen und in 17 unterschiedlichen Lokalisationen auf ihre jeweilige zytoplasmatische und nukleäre CXCR4-Expression untersucht. Durch teilweise unzureichende Färbung oder Gewebeerlust der TMAs konnten allerdings nicht alle eingeschlossenen Proben ausgewertet werden.

Die nukleäre Expression in den unterschiedlichen Lokalisationen der Metastasen zeigte sich insgesamt stärker ausgeprägt als die zytoplasmatische Expression. Der mittlere nukleäre Expressionsscore lag bei 57,75, zytoplasmatisch etwas darunter bei 52,19.

Innerhalb der unterschiedlichen Lokalisationen der Metastasen zeigte sich die CXCR4-Ausprägung heterogen.

Die höchsten nukleären Expressionsniveaus zeigten Weichteile (Median = 88,00), Larynx (Median = 98,00), Lokalrezidiv (Median = 86,00), Grenzstrang (Median = 84,00) und Lymphknoten (Median = 76,00). Die stärkste zytoplasmatische CXCR4-Rezeptorexpression zeigten Haut (Median = 185,00), Pleura (Median = 190,00), Lokalrezidiv (Median = 300,00) und Weichteile (Median = 65,00). Eine geringe oder gar keine zytoplasmatische Expression wiesen die Lokalisationen Lunge, Pankreas, Larynx, Knochen, Mesokolon, Dünndarm, Peritoneum und Sonstige auf. Einschränkend sind in diesem Vergleich die teils geringe Anzahl des

Metastasengewebes an den einzelnen Lokalisationen zu nennen. Weiterhin zeigten sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Metastasenlokalisationen nicht statistisch signifikant.

Interessanterweise existieren Studien, welche einen günstigen Verlauf von Patienten mit Lungen – und Pankreasmetastasen im Vergleich zu Metastasen anderer Lokalisationen aufweisen.^{167,168} In der vorliegenden Studie konnten für die 17 untersuchten Gewebeprobe von Lungenmetastasen ein zytoplasmatischer Median von 0,00 sowie ein mittlerer zytoplasmatischer Expressionsscore von 47,35 (95% KI: 8,76 – 85,95) beobachtet werden. Für vier Gewebeprobe von Pankreasmetastasen wurde ebenfalls ein Median von 0,00 sowie ein mittlerer Expressionsscore von 0,00 beobachtet. Im Umkehrschluss könnte dies die aufgestellte Hypothese bekräftigen, dass eine höhere biologische Aggressivität mit erhöhter CXCR4-Expression einhergeht. Auch das Ergebnis dieser Arbeit, dass die zytoplasmatische CXCR4-Expression in univariater Analyse als negativer prognostischer Marker fungiert, steht in Übereinstimmung mit einem günstigeren Verlauf bei niedriger zytoplasmatischer CXCR4-Expression in Lungen- und Pankreasmetastasen.

4.4 Gegenüberstellung der 3 Kollektive

Zur strukturierten Übersicht der Expressionsverhältnisse innerhalb der Gruppen von klarzelligen Nierenzellkarzinomen, benignem Nierengewebe sowie Metastasengewebe wurden abschließend die Ergebnisse dieser Arbeit gegenübergestellt. Die Kollektive der Primärtumore und Metastasen sind in dieser Arbeit zwar nicht von den gleichen Patienten gewonnen, jedoch wurden die Gewebeprobe mit demselben immunhistochemischen Verfahren gefärbt und in gleicher Weise ausgewertet und weisen somit gute Voraussetzungen für den Vergleich der Expressionsniveaus der unterschiedlichen Kollektive auf.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben, dass die nukleäre Expression mit einem medianen Score von 56,00 in benignem Gewebe am geringsten ausgeprägt ist. Das Metastasengewebe (Median: 68,00) und das primäre Tumorgewebe (Median: 72,00) zeigten höhere CXCR4-Expressionsniveaus.

Zytoplasmatisch zeigte sich die Rezeptorexpression in umgekehrter Reihenfolge. Das benigne Gewebe wies den höchsten medianen Expressionsscore von 130,00 auf. Für das Metastasengewebe lag der mediane Score bei 17,50. Die klarzelligen Primärtumore wiesen einen medianen Score der

zytoplasmatischen Expression von 0,00 auf. Anhand von Kruskal-Wallis Tests wurde ein signifikanter Unterschied der nukleären und zytoplasmatischen Expression in den drei Gewebetypen bestätigt.

Die Tatsache, dass primäre Nierenzellkarzinome und Metastasengewebe höhere Expressionswerte im nukleären Kompartiment zeigen, bestätigt die Eingangs formulierten Hypothesen und könnte darüber hinaus auf einen *Shift* im Funktionszustand des Rezeptors zurückzuführen sein. Wie bereits erläutert, kommt es bei Aktivierung des Rezeptors durch Ligandenbindung an der Zelloberfläche zur Endozytose und der Transduktion verschiedener Signalwege.¹⁶⁹ Die Translokation des Rezeptors in den Zellkern der Tumorzellen deutet auf eine verstärkte Aktivierung und damit Involvierung des Rezeptors in die Mechanismen der Tumorentstehung und Tumorprogression hin. Diese Ergebnisse stützen die These weiter, dass CXCR4 nicht nur als prognostischer Marker, sondern auch als therapeutisches *Target* dienen könnte.

Einen ähnlichen Aufbau des dargestellten Vergleichs der CXCR4-Expression in den drei Gewebetypen ist in der 2009 erschienenen Publikation von Wang et al. zu finden.¹²³ Es wurden 43 primäre Nierenzellkarzinome, 21 Metastasen von vier verschiedenen Lokalisationen und Proben von benignem Nierengewebe gegenübergestellt. Anhand eines vergleichbaren IHC-Scores der Färbeintensitäten 1 - 4 (*schwach, moderat, stark, sehr stark*) wurden alle Gewebeprobe, in denen über 50% der Zellen eine CXCR4-Färbung von moderat oder höher aufwiesen als positiv gewertet. Die Resultate lieferten eine positive CXCR4-Expression in 50% aller benignen Proben, 81,4% der primären Nierenzellkarzinome und in 95,2% der Metastasen. Die subzelluläre Lokalisation wurde anders als in der vorliegenden Arbeit nicht nukleär und zytoplasmatisch, sondern membranös und zytoplasmatisch bestimmt. Dies schränkt den direkten Vergleich der Expressionsergebnisse ein, zeigt aber einen vergleichbaren Trend der höheren CXCR4-Expressionen in Tumor- und Metastasengewebe im Vergleich zu benignem Nierengewebe.

4.5 Limitationen

Allgemein schränkt die limitierte Anzahl der Gewebeprobe innerhalb der Kollektive und den jeweiligen Subgruppen, sowie der retrospektive Ansatz dieser Studie die Aussagekraft dieser

Arbeit ein. Insbesondere die starke Gewichtung von klarzelligen Tumoren im Verhältnis der relativ geringen Probenanzahl papillärer und chromophober Nierenzellkarzinome und auch benigner Tumorformen, muss erwähnt werden. Die Ergebnisse liefern somit nur einen ersten Hinweis auf die differentielle CXCR4-Expression in unterschiedlichen histologischen Subtypen der Nierentumore. Für ein genaueres Verständnis der Expressionsniveaus innerhalb der einzelnen Subgruppen sollten weitere Analysen anhand von größeren Kollektiven mit möglichst gleich großen Stichproben erfolgen. Zudem ist die Studie durch die inhärenten Einschränkungen der semi-quantitativen Analyse der Tissue Microarrays limitiert. Hier sind die variable Ausprägung der Immunfärbungen der einzelnen TMAs zu erwähnen, wie auch die Inter-Beobachter-Variabilität in der Auswertung.

4.6 Ausblick: Klinische Relevanz

Die Expressionsanalyse von CXCR4 in unterschiedlichen Gewebearten trägt zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie des Tumorgeschehens bei. Klinisch relevant sind jedoch auch die Erforschung und Etablierung neuer Therapien, welche auf den Erkenntnissen aktueller Studien basieren.

Da die CXCR4/CXCL12 Achse an Tumorstadium und Tumorstadium beteiligt ist sowie die Migration von Tumorzellen induzieren kann, stellt sie einen vielversprechenden Angriffspunkt für weitere Therapieentwicklungen dar. Gemeinsam mit der erhöhten Expression von CXCR4 in metastasierten Nierenzellkarzinomen stellt der Chemokinrezeptor einen interessanten Ansatz für mögliche neue Therapiestrategien dar. Einschränkend sind hierbei jedoch die bislang nicht ausreichend entschlüsselten Pathomechanismen des CXCR4-Shifts in den einzelnen Tumorgewebearten, sowie die in verschiedenen Gewebetypen physiologisch ausgeprägte Expression von CXCR4 zu nennen. Insbesondere im Knochenmark sowie in lymphatischem Gewebe zeigt sich eine hohe CXCR4-Expression.¹⁴⁸

Dennoch existieren Therapieansätze, welche CXCR4 involvieren. Ein CXCR4-Antagonist, welcher bereits in klinischem Einsatz ist, ist Plerixafor (AMD3100). Dieser ist von der FDA (*Food and Drug Administration*) zur Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen und multiplen Myelomen zugelassen. Plerixafor (AMD3100) ist ein spezifischer CXCR4-Antikörper, welcher ursprünglich zur Inhibition von HI-Virusreplikation und Stammzellmobilisation entwickelt wurde.^{131,170}

AMD3100 bindet CXCR4 an seiner Ligandentasche und verhindert so die Bindung seines natürlichen Liganden CXCL12 und damit die Aktivierung des Rezeptors und dessen Signaltransduktionsvorgänge.¹⁷¹ Aktuell ist die Hauptindikation für den Einsatz von AMD3100 die Mobilisation hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark für die Transplantation von Patienten mit hämatologischen Neoplasien.¹³¹

Auch in Nierenzellkarzinomen wurde basierend auf der CXCR4 Überexpression und der Rolle der CXCR4/CXCL12-Achse das therapeutische Potential verschiedener CXCR4-Antagonisten evaluiert:

X4P - 001 ist ein oral verfügbarer, allosterischer CXCR4-Antagonist und reduziert in Xenograft-Modellen im Tumormilieu proangiogenetische Signale wie die HIF - 2alpha Konzentration, sowie das Vorhandensein von myeloiden Suppressorzellen, welche zur Unterdrückung der Immunantwort beitragen.¹³² In einer Phase I/II Studie wurden 65 Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom, über einen medianen Zeitraum von 25 Wochen, 400mg X4P-001 oral in Kombination mit 5mg Axitinib oral verabreicht. Die Resultate dieser ersten klinischen Studien deuten auf eine gute Toleranz bei adäquatem Sicherheitsprofil und vielversprechenden progressionsfreien Überlebenszeiten hin.¹³² In einer weiteren Studie wird X4P-001 in unterschiedlicher Dosierung, alleinig oder in Kombination mit Axitinib verabreicht.¹³³ Ebenfalls Gegenstand einer aktuellen Studie ist die Kombinationstherapie von X4P-001 mit Nivolumab für Patienten mit Nierenzellkarzinom.¹⁷²

Eine randomisierte Phase II Studie, welche die Effektivität von einem weiteren CXCR4 Antagonist (LY2510924) in Kombination mit Sunitinib mit der Wirksamkeit von Sunitinib alleine verglich, zeigte jedoch ein negatives Studienergebnis und konnte keine Verbesserung des Gesamt- oder tumorspezifischen Überlebens zeigen.¹³⁴ Eine mögliche Erklärung hierfür könnte durchaus die bereits erwähnte Internalisierung von CXCR4 sein. Bislang kann hier zusammenfassend gesagt werden, dass trotz noch ausstehender Studienergebnisse in Nierenzellkarzinom und anderen Tumorentitäten, die CXCR4-Antagonisten die hohe Erwartung nicht erfüllen konnte.¹⁷³

Die Entwicklung der Forschung zum therapeutischen Wert der CXCR4/ CXCL12 Achse wird maßgeblich von den Ergebnissen der ausstehenden Studien abhängig sein. Diese werden letztlich darüber entscheiden, ob CXCR4 eine Bedeutung über die prognostische Wertigkeit hinaus besitzt

oder auf diese beschränkt bleibt. Unsere Studie hat in diesem Zusammenhang gezeigt, dass die Proklamation von CXCR4 als prognostischer Parameter begründet ist. Darüber hinaus bietet sie durch den Nachweis der zytoplasmatischen und nukleären CXCR4-Expression Hinweise darauf, warum die bisherigen CXCR4 - Antagonisierungsversuche frustriert verliefen: Die Antagonisten richteten sich vor allem gegen membranständige CXCR4-Rezeptoren. Unsere Studie liefert Anhaltspunkte darauf, dass zytoplasmatisch und insbesondere nukleär lokalisierte CXCR4-Rezeptoren eine funktionelle Bedeutung in Nierenzellkarzinomen besitzen. Unserer Ansicht nach sollten sich zukünftige Forschungsarbeiten vor allem auch mit der Rolle der Funktionalität des CXCR4-Rezeptors befassen.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit umfasst die Analyse der zytoplasmatischen und nukleären CXCR4-Expression in primären Nierenzellkarzinomen, in Subtypen maligner und benigner Nierentumore sowie in Metastasengewebe von primären Nierenzellkarzinomen.

Ziel der Arbeit war die Evaluation und der Vergleich der variierenden Rezeptorexpression zwischen den unterschiedlichen Gewebetypen, sowie die Analyse der prognostischen Relevanz des CXCR4-Rezeptors in klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Untersucht wurde ebenfalls der Einfluss klinisch-pathologischer Parameter inklusive der CXCR4-Expression auf das Überleben der Patienten mit klarzelligen Primärtumoren.

Zu diesem Zweck wurden drei Kollektive unterschiedlicher Entitäten zusammengestellt. Das erste Kollektiv besteht aus 64 Gewebeproben von klarzelligen Nierenzellkarzinomen, sowie benignen Gewebeproben für Vergleichsanalysen. Für dieses Kollektiv wurden klinische Verlaufsparemeter erhoben, um diese mit der Rezeptorexpression und dem Überleben der Patienten zu korrelieren.

Das zweite Kollektiv bestand aus Gewebeproben von 146 Patienten mit malignen und benignen Nierentumoren unterschiedlicher Histologien.

Das dritte Kollektiv bestand ausschließlich aus Metastasengewebe mit insgesamt 137 Proben von 92 Patienten mit primären Nierenzellkarzinomen.

Für die Expressionsanalysen wurden die Gewebeproben in Form von TMAs (Tissue Micro Arrays) mittels Antikörper gefärbt. Anschließend erfolgte die mikroskopische Bestimmung der zytoplasmatischen CXCR4-Ausprägung. Anhand einer Intensitäts-Skala (0 - 3) wurden die Proben semiquantitativ kategorisiert, sowie der Anteil der zytoplasmatisch gefärbten Zellen ermittelt, um so einen Immunreaktivitäts-Score zu bilden (Skala der Expressionsanalyse: 0 - 300).

Die nukleäre Ausprägung des CXCR4-Rezeptors wurde in die Kategorien „*gefärbt*“ und „*nicht gefärbt*“ eingeteilt, sowie jeweils der Anteil der gefärbten Kerne bestimmt (Skala der Expressionsanalyse: 0 - 100).

Die Expressionsanalyse des klarzelligen Nierenzellkarzinom-Kollektivs zeigte, dass die zytoplasmatische Expression in benignem Nierengewebe stärker ausgeprägt ist als in klarzelligem Tumorgewebe. Die nukleäre Expression zeigte sich wiederum in malignem Gewebe intensiver als

in benignem Gewebe. Es konnte ein signifikanter Unterschied der CXCR4-Rezeptorausprägung zwischen malignen und benignen Gewebeproben, sowohl für die zytoplasmatische als auch die nukleäre Expression nachgewiesen werden.

Mittels Chi-Quadrat Tests konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der lymphovaskulären Invasion und einer positiven zytoplasmatischen Rezeptorexpression beobachtet werden. In der univariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich eine zytoplasmatische CXCR4 Expression als signifikant negativer Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben der Patienten. In multivariater Cox-Analyse konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden. In Kaplan-Meier Analysen bestätigte sich ein kürzeres Gesamt- und tumorspezifisches Überleben der Patienten, welche eine positive zytoplasmatische CXCR4-Expression aufwiesen, verglichen mit Patienten ohne CXCR4-Expression. Für die nukleäre Expression konnte kein Einfluss auf das Überleben beobachtet werden.

In der Gegenüberstellung der Expressionsergebnisse des Kollektivs von Nierentumoren mit unterschiedlicher Histologie, zeigten papilläre Nierenzellkarzinome und Onkozytome die stärkste zytoplasmatische Rezeptorfärbung. Zystengewebe und papilläre Nierenzellkarzinome wiesen die höchste nukleäre CXCR4-Expression unter den analysierten Subgruppen auf. Es konnten sowohl für die zytoplasmatischen als auch die nukleären CXCR4-Expressionen signifikante Unterschiede der Subgruppen bestätigt werden.

Die nachfolgende Rezeptorexpressionsanalyse des Metastasenkollektivs gab Aufschluss über heterogene Expressionsniveaus innerhalb der 17 Lokalisationsgruppen. Hier ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der jeweiligen Lokalisationen, jedoch zeigten tendenziell Lungen- und Pankreasmetastasen geringe zytoplasmatische Expressionsniveaus, während Weichteile, Larynx, Lokalrezidiv, Grenzstrang und Lymphknoten die stärkste nukleäre CXCR4-Expression boten.

Abschließend wurde die CXCR4-Rezeptorausprägung zwischen klarzelligen Primärtumoren, benignem Nierengewebe und Metastasengewebe gegenübergestellt. Es konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass benignes Gewebe die stärkste zytoplasmatische CXCR4-Rezeptorexpression aufweist, während sich die nukleäre Expression in Primärtumorgewebe und Metastasengewebe stärker als in benignem Gewebe darstellt. Die Unterschiede zeigten sich statistisch signifikant.

Diese Arbeit bestätigt, dass der CXCR4-Rezeptor innerhalb verschiedener Nierentumorgewebe unterschiedlich exprimiert ist und gibt Aufschluss über die differentielle Rezeptorexpression innerhalb der verschiedenen Gewebetypen. Des Weiteren weist die Arbeit darauf hin, dass die subzelluläre CXCR4 Lokalisation Einfluss auf die funktionelle Bedeutung des Rezeptors hat.

Die zytoplasmatische CXCR4-Expression in klarzelligen Nierenzellkarzinomen bestätigte sich in dieser Arbeit als univariat negativer, prognostischer Marker bezüglich des Gesamt- und tumorspezifischen Überlebens der Patienten und unterstreicht somit die Relevanz der CXCR4-Rezeptorausprägung als prognostischen Faktor. Unabhängig von der rein prognostischen und funktionellen Analyse von CXCR4 stellen neu verfügbare medikamentöse Therapieformen mit CXCR4 als therapeutisches Target einen auch für das Nierenzellkarzinom verfügbaren Ansatz dar, für den die vorliegenden Daten relevant sein können.

6 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Steffen Rausch und Dr. Moritz Maas durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Steffen Rausch, leitender Oberarzt der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Tübingen. Die Auswertungen der immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben wurden nach initialer Anleitung von Prof. Rausch von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Rausch.

Die verwendeten klinischen Daten wurden durch mich aus bereits vorhandenen Datenbanken identifiziert und in einer eigenen Datenbank zusammengefasst. Hierbei wurden die vorhandenen Parameter in Umfang und Detail ergänzt und erweitert.

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

Tübingen, den 13.12.2023

7 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit konnten nach einem peer-review Verfahren im *International Journal of Molecular Sciences (IJMS)*, Impact Factor: 6.208) publiziert werden:

„Differential Expression and Clinical Relevance of C-X-C Motif Chemokine Receptor 4 (CXCR4) in Renal Cell Carcinomas, Benign Renal Tumors, and Metastases“

Des Weiteren wurden Auszüge der hier vorliegenden Arbeit im Rahmen des 11. Symposiums der Arbeitsgruppe urologische Forschung (AUF) der deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) am 21.-23.11.2019 in Form einer Posterpräsentation mit dem Titel *„Differentielle Expression und klinische Relevanz von CXCR4 bei malignen und benignen Nierentumoren“* vorgestellt.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne all denen meinen Dank aussprechen, die mich auf vielfältige Weise bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben:

Zunächst möchte ich dem ärztlichen Direktor der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Tübingen, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Stenzl, für die Ermöglichung der vorliegenden Dissertation danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Steffen Rausch, für die Überlassung des Themas und die hervorragende fachliche und verständnisvolle Betreuung während der Promotion.

Herrn Dr. Moritz Maas möchte ich für die stetige Unterstützung und konstruktive Betreuung, sowie für die engagierte Arbeit des Korrektorats der Promotion herzlich danken.

Für das Erstellen der immunhistochemischen Färbungen, sowie der Digitalisierung der erstellten TMAs danke ich dem Labor der Klinik für Urologie Tübingen.

Für die Unterstützung aus dem uro-pathologischen Labor möchte ich Frau Karen Greif und Herrn Dr. Jörg Hennenlotter danken.

Angelika Harter und Marie-Theres Steffen danke ich für ihre Unterstützung im Erstellen des Layouts dieser Arbeit.

Sophie Engelhardt, Franziska Henke, Tina Mittelberger, Marie-Theres Steffen und Pauline Stöhr möchte ich für ihre umfassende Korrektur dieser Arbeit herzlich danken.

Vielen Dank an Frederik Kurcz, für seine geduldigen Hilfestellungen und wertvollen Anregungen, sowie an Andrés Covelli für seinen konstanten Support.

Ganz besonders möchte ich meiner lieben Familie danken, insbesondere meinen Eltern. Für die Ermöglichung meines Studiums und dieser Arbeit, das Korrekturlesen, aber besonders für ihre bedingungslose und liebevolle Unterstützung.

9 Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*. Nov 2018;103:356-387. doi:10.1016/j.ejca.2018.07.005
2. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. Jan 2019;75(1):74-84. doi:10.1016/j.eururo.2018.08.036
3. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Kidney and Renal Pelvis Cancer. Accessed September 22, 2022, <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html#content>
4. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, et al. *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. ; 2021.
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. Mar 1 2015;136(5):E359-86. doi:10.1002/ijc.29210
6. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol*. Oct 2011;60(4):615-21. doi:10.1016/j.eururo.2011.06.049
7. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*. Mar 10 2005;114(1):101-8. doi:10.1002/ijc.20618
8. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JW, La Vecchia C. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol*. Sep 2016;70(3):458-66. doi:10.1016/j.eururo.2015.06.042
9. Hidayat K, Du X, Zou S-Y, Shi B-M. Blood pressure and kidney cancer risk: meta-analysis of prospective studies. *Journal of Hypertension*. 2017;35(7):1333-1344. doi:10.1097/hjh.0000000000001286
10. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The Lancet*. 2008/02/16/ 2008;371(9612):569-578. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60269-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60269-X)
11. Ljungberg B, Albiges L, Bedke J, et al. *EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma*. EAU Guidelines Office; 2022.
12. Weikert S, Boeing H, Pischon T, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol*. Feb 15 2008;167(4):438-46. doi:10.1093/aje/kwm321
13. Al-Bayati O, Hasan A, Pruthi D, Kaushik D, Liss MA. Systematic review of modifiable risk factors for kidney cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2019/06/01/ 2019;37(6):359-371. doi:<https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.12.008>
14. Song J, Luo H, Yin X, et al. Association between cadmium exposure and renal cancer risk: a meta-analysis of observational studies. *Sci Rep*. Dec 11 2015;5:17976. doi:10.1038/srep17976
15. Song DY, Song S, Song Y, Lee JE. Alcohol intake and renal cell cancer risk: a meta-analysis. *Br J Cancer*. May 22 2012;106(11):1881-90. doi:10.1038/bjc.2012.136

16. Lee JE, Männistö S, Spiegelman D, et al. Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(6):1730-1739. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0045
17. Kippenberger M, Duensing S. Hereditäres Nierenzellkarzinom und begleitende Syndrome. In: Jäger D, Zeier M, eds. *Onko-Nephrologie*. Springer-Verlag GmbH; 2020.
18. Heidenreich A, Doehn C, Schenck M, Jakse G. Nierenzellkarzinom. In: Rübber H, ed. *Uroonkologie*. Springer Verlag GmbH; 2014:347-380:chap 20.
19. Ben-Skowronek I, Kozaczuk S. Von Hippel-Lindau Syndrome. *Hormone Research in Paediatrics*. 2015;84(3):145-152. doi:10.1159/000431323
20. Pavlovich CP, Walther MM, Eyer RA, et al. Renal tumors in the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Am J Surg Pathol*. Dec 2002;26(12):1542-52. doi:10.1097/00000478-200212000-00002
21. Petersson F, Gatalica Z, Grossmann P, et al. Sporadic hybrid oncocytic/chromophobe tumor of the kidney: a clinicopathologic, histomorphologic, immunohistochemical, ultrastructural, and molecular cytogenetic study of 14 cases. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2010/04// 2010;456(4):355-365. doi:10.1007/s00428-010-0898-4
22. Gupta N, Sunwoo BY, Kotloff RM. Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Clinics in Chest Medicine*. 2016/09/01/ 2016;37(3):475-486. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.04.010>
23. Riede U-N, Müller K, Werner M. Nervensystem. In: Riede U-N, Werner M, eds. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Springer; 2017:809:chap 74. vol. 2.
24. Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2013;37(10):1469-1489. doi:10.1097/PAS.0b013e318299f2d1
25. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology*. 2016/07/01/ 2016;70(1):93-105. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029>
26. Störkel S, Wild PJ, Moch H. Nierentumoren im Erwachsenenalter. In: Amann K, Kain R, Klöppel G, eds. *Pathologie: Urogenitale und Endokrine Organe, Gelenke und Skelett*. Springer Berlin Heidelberg; 2016:443-485.
27. Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *Int J Urol*. May 2009;16(5):432-43. doi:10.1111/j.1442-2042.2009.02302.x
28. Delecluse S, Zschäbitz S. Klassifikation und medikamentöse Therapie des Nierenzellkarzinoms. In: Jäger D, Zeier M, eds. *Onko-Nephrologie*. Springer; 2020:chap 16.
29. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras*. May-Jun 2015;48(3):166-74. doi:10.1590/0100-3984.2013.1927
30. Amin MB, Crotty TB, Tickoo SK, Farrow GM. Renal Oncocytoma: A Reappraisal of Morphologic Features with Clinicopathologic Findings in 80 Cases. *The American Journal of Surgical Pathology*. 1997;21(1):1-12.

31. Störkel S, Wild P, Moch H. Nierentumoren im Erwachsenenalter. 2016:443-485.
32. McGahan JP, Lamba R, Fisher J, et al. Is segmental enhancement inversion on enhanced biphasic MDCT a reliable sign for the noninvasive diagnosis of renal oncocytomas? *AJR Am J Roentgenol*. Oct 2011;197(4):W674-9. doi:10.2214/ajr.11.6463
33. Riede U-N, Höpker K. Nieren. In: Riede U-N, Werner M, eds. *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Springer Berlin Heidelberg; 2017:569-598.
34. Eissa A, El Sherbiny A, Martorana E, et al. Non-conservative management of simple renal cysts in adults: a comprehensive review of literature. *Minerva Urol Nefrol*. Apr 2018;70(2):179-192. doi:10.23736/s0393-2249.17.02985-x
35. Warren KS, McFarlane J. The Bosniak classification of renal cystic masses. *BJU Int*. May 2005;95(7):939-42. doi:10.1111/j.1464-410X.2005.05442.x
36. Silverman SG, Pedrosa I, Ellis JH, et al. Bosniak Classification of Cystic Renal Masses, Version 2019: An Update Proposal and Needs Assessment. *Radiology*. 2019;292(2):475-488. doi:10.1148/radiol.2019182646
37. Hallscheidt P. Nierenzellkarzinom: Abklärung suspekter renaler Raumforderungen. In: D. Jäger, Zeier M, eds. *Onko-Nephrologie*. Springer Verlag; 2020:115-123:chap 12.
38. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours*. Eighth edition. ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2017.
39. Brierley J, Asamura H, Eycken Ev, Rous BA, Union for International Cancer Control. UROLOGICAL TUMOURS. *TNM Atlas: illustrated guide to the TNM classification of malignant tumors*. Seventh ed. 2021:pgs. 335-407.
40. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.2. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF; 2017.
41. Dagher J, Delahunt B, Rioux-Leclercq N, et al. Clear cell renal cell carcinoma: validation of World Health Organization/International Society of Urological Pathology grading. *Histopathology*. Dec 2017;71(6):918-925. doi:10.1111/his.13311
42. Moch H. WHO-ISUP-Graduierungssystem für Nierenkarzinome. *Der Pathologe*. 2016/07/01 2016;37(4):355-360. doi:10.1007/s00292-016-0171-y
43. Lam JS, Leppert JT, Beldegrun AS, Figlin RA. Novel approaches in the therapy of metastatic renal cell carcinoma. *World Journal of Urology*. 2005/07/01 2005;23(3):202-212. doi:10.1007/s00345-004-0466-0
44. Herold G. Innere Medizin 2021. De Gruyter; 2021.
45. Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. *The Lancet*. 2016/02/27/ 2016;387(10021):894-906. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00046-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00046-X)
46. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF), Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH),; 2017;Langversion 1.2.
47. Volpe A, Finelli A, Gill IS, et al. Rationale for percutaneous biopsy and histologic characterisation of renal tumours. *Eur Urol*. Sep 2012;62(3):491-504. doi:10.1016/j.eururo.2012.05.009
48. Doehn C, Grünwald V, Steiner T, Follmann M, Rexer H, Krege S. The diagnosis, treatment and follow-up of renal cell carcinoma. *Dtsch Arztebl Int* 2016. 2016;doi: DOI: 10.3238/arztebl.2016.0590

49. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. Jan 11 2007;356(2):115-24. doi:10.1056/NEJMoa065044
50. Blom JH, van Poppel H, Maréchal JM, et al. Radical nephrectomy with and without lymph-node dissection: final results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) randomized phase 3 trial 30881. *Eur Urol*. Jan 2009;55(1):28-34. doi:10.1016/j.eururo.2008.09.052
51. Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *The Lancet*. 2009/03/28/2009;373(9669):1119-1132. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60229-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60229-4)
52. Frank I, Blute ML, Chevillie JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. Solid Renal Tumors: An Analysis of Pathological Features Related to Tumor Size. *The Journal of Urology*. 2003/12/01/ 2003;170(6, Part 1):2217-2220. doi:<https://doi.org/10.1097/01.ju.0000095475.12515.5e>
53. Sun M, Abdollah F, Bianchi M, et al. Treatment Management of Small Renal Masses in the 21st Century: A Paradigm Shift. *Annals of Surgical Oncology*. 2012/07/01 2012;19(7):2380-2387. doi:10.1245/s10434-012-2247-0
54. Marconi L, Sun M, Beisland C, et al. Prevalence, Disease-free, and Overall Survival of Contemporary Patients With Renal Cell Carcinoma Eligible for Adjuvant Checkpoint Inhibitor Trials. *Clin Genitourin Cancer*. Apr 2021;19(2):e92-e99. doi:10.1016/j.clgc.2020.12.005
55. Choueiri TK, Tomczak P, Park SH, et al. Adjuvant Pembrolizumab after Nephrectomy in Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(8):683-694. doi:10.1056/NEJMoa2106391
56. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-Alfa as a Comparative Treatment for Clinical Trials of New Therapies Against Advanced Renal Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(1):289-296. doi:10.1200/jco.2002.20.1.289
57. Ko JJ, Xie W, Kroeger N, et al. The International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium model as a prognostic tool in patients with metastatic renal cell carcinoma previously treated with first-line targeted therapy: a population-based study. *Lancet Oncol*. Mar 2015;16(3):293-300. doi:10.1016/s1470-2045(14)71222-7
58. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. Aug 1 2009;27(22):3584-90. doi:10.1200/jco.2008.20.1293
59. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. Nov 5 2015;373(19):1803-13. doi:10.1056/NEJMoa1510665
60. Rini BI, Plimack ER, Stus V, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. Mar 21 2019;380(12):1116-1127. doi:10.1056/NEJMoa1816714
61. Motzer RJ, Hutson TE, Glen H, et al. Lenvatinib, everolimus, and the combination in patients with metastatic renal cell carcinoma: a randomised, phase 2, open-label, multicentre trial. *Lancet Oncol*. Nov 2015;16(15):1473-1482. doi:10.1016/s1470-2045(15)00290-9
62. Mickisch GHJ, Garin A, van Poppel H, de Prijck L, Sylvester R. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa

- alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *The Lancet*. 2001/09/22/2001;358(9286):966-970. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06103-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06103-7)
63. Méjean A, Ravaud A, Thezenas S, et al. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. Aug 2 2018;379(5):417-427. doi:10.1056/NEJMoa1803675
64. Bex A, Mulders P, Jewett M, et al. Comparison of Immediate vs Deferred Cytoreductive Nephrectomy in Patients With Synchronous Metastatic Renal Cell Carcinoma Receiving Sunitinib: The SURTIME Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology*. 2019;5(2):164-170. doi:10.1001/jamaoncol.2018.5543
65. Motzer RJ, Jonasch E, Michaelson MD, et al. NCCN Guidelines Insights: Kidney Cancer, Version 2.2020. *J Natl Compr Canc Netw*. Nov 1 2019;17(11):1278-1285. doi:10.6004/jnccn.2019.0054
66. Bhindi B, Abel EJ, Albiges L, et al. Systematic Review of the Role of Cytoreductive Nephrectomy in the Targeted Therapy Era and Beyond: An Individualized Approach to Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. Jan 2019;75(1):111-128. doi:10.1016/j.eururo.2018.09.016
67. Andrews DW, Scott CB, Sperduto PW, et al. Whole brain radiation therapy with or without stereotactic radiosurgery boost for patients with one to three brain metastases: phase III results of the RTOG 9508 randomised trial. *Lancet*. May 22 2004;363(9422):1665-72. doi:10.1016/s0140-6736(04)16250-8
68. Kwak C, Park YH, Jeong CW, Lee SE, Ku JH. Metastasectomy without Systemic Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Comparison with Conservative Treatment. *Urologia Internationalis*. 2007;79(2):145-151. doi:10.1159/000106329
69. Alt AL, Boorjian SA, Lohse CM, Costello BA, Leibovich BC, Blute ML. Survival after complete surgical resection of multiple metastases from renal cell carcinoma. *Cancer*. Jul 1 2011;117(13):2873-82. doi:10.1002/cncr.25836
70. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. Jul 4 2013;499(7456):43-9. doi:10.1038/nature12222
71. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. Jan 2002;2(1):38-47. doi:10.1038/nrc704
72. Choueiri TK, Motzer RJ. Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. Jan 26 2017;376(4):354-366. doi:10.1056/NEJMra1601333
73. Su D, Stamatakis L, Singer EA, Srinivasan R. Renal cell carcinoma: molecular biology and targeted therapy. *Current opinion in oncology*. 2014;26(3):321-327. doi:10.1097/CCO.0000000000000069
74. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature Reviews Cancer*. 2006/09/01 2006;6(9):729-734. doi:10.1038/nrc1974
75. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017/03/09/ 2017;168(6):960-976. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
76. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):252-264. doi:10.1038/nrc3239
77. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. Mar 15 2007;13(6):1757-61. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-06-2599

78. Motzer RJ, Jonasch E, Agarwal N, et al. Kidney Cancer, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. Jun 2017;15(6):804-834. doi:10.6004/jnccn.2017.0100
79. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. Aug 1999;17(8):2530-40. doi:10.1200/jco.1999.17.8.2530
80. Motzer RJ, Bacik J, Schwartz LH, et al. Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. Feb 1 2004;22(3):454-63. doi:10.1200/jco.2004.06.132
81. Heng DY, Xie W, Regan MM, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol*. Dec 1 2009;27(34):5794-9. doi:10.1200/jco.2008.21.4809
82. Sun M, Shariat SF, Cheng C, et al. Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review. *Eur Urol*. Oct 2011;60(4):644-61. doi:10.1016/j.eururo.2011.06.041
83. Adibi M, Thomas AZ, Borregales LD, et al. Percentage of sarcomatoid component as a prognostic indicator for survival in renal cell carcinoma with sarcomatoid dedifferentiation. *Urol Oncol*. Oct 2015;33(10):427.e17-23. doi:10.1016/j.urolonc.2015.04.011
84. Frank I, Blute ML, Chevillie JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *J Urol*. Dec 2002;168(6):2395-400. doi:10.1097/01.ju.0000035885.91935.d5
85. Ficarra V, Novara G, Galfano A, et al. The 'Stage, Size, Grade and Necrosis' score is more accurate than the University of California Los Angeles Integrated Staging System for predicting cancer-specific survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int*. Jan 2009;103(2):165-70. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.07901.x
86. Zigeuner R, Hutterer G, Chromecki T, et al. External Validation of the Mayo Clinic Stage, Size, Grade, and Necrosis (SSIGN) Score for Clear-Cell Renal Cell Carcinoma in a Single European Centre Applying Routine Pathology. *European Urology*. 2010/01/01/ 2010;57(1):102-111. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.11.033>
87. Cannady SB, Cavanaugh KA, Lee S-Y, et al. Results of whole brain radiotherapy and recursive partitioning analysis in patients with brain metastases from renal cell carcinoma: a retrospective study. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. 2004/01/01/ 2004;58(1):253-258. doi:[https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(03\)00818-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(03)00818-6)
88. Büttner F, Winter S, Rausch S, et al. Survival Prediction of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Based on Gene Expression Similarity to the Proximal Tubule of the Nephron. *European Urology*. 2015/12/01/ 2015;68(6):1016-1020. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.05.045>
89. Zhao H, Zongming M, Tibshirani R, Higgins JP, Ljungberg B, Brooks JD. Alteration of gene expression signatures of cortical differentiation and wound response in lethal clear cell renal cell carcinomas. *PLoS One*. Jun 25 2009;4(6):e6039. doi:10.1371/journal.pone.0006039

90. Büttner F, Winter S, Rausch S, et al. Clinical utility of the S3-score for molecular prediction of outcome in non-metastatic and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *BMC Medicine*. 2018/07/05 2018;16(1):108. doi:10.1186/s12916-018-1088-5
91. Heinrich PC, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Mediatoren. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, eds. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Berlin Heidelberg; 2014:407-410.
92. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(11):2927-2931. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-09-2329
93. Floranović MP, Veličković LJ. Effect of CXCL12 and Its Receptors on Unpredictable Renal Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. Aug 2020;18(4):e337-e342. doi:10.1016/j.clgc.2019.11.004
94. Nagasawa T. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. *Journal of Molecular Medicine*. 2014/05/01 2014;92(5):433-439. doi:10.1007/s00109-014-1123-8
95. Rossi D, Zlotnik A. The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annual Review of Immunology*. 2000;18(1):217-242. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.217
96. Wang JM, Deng X, Gong W, Su S. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *Journal of Immunological Methods*. 1998/11/01/ 1998;220(1):1-17. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00128-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00128-8)
97. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control☆. *Trends in Immunology*. 2004/02/01/ 2004;25(2):75-84. doi:<https://doi.org/10.1016/j.it.2003.12.005>
98. Deutzmann R. Mechanismen der Signaltransduktion. In: Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R, eds. *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage ed. Georg Thieme Verlag; 2016.
99. Pozzobon T, Goldoni G, Viola A, Molon B. CXCR4 signaling in health and disease. *Immunology Letters*. 2016/09/01/ 2016;177:6-15. doi:<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.06.006>
100. Richard CL, Blay J. CXCR4 in Cancer and Its Regulation by PPARgamma. *PPAR Res*. 2008;2008:769413. doi:10.1155/2008/769413
101. Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1994/01/07/ 1994;269(1):232-237. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)42339-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42339-8)
102. Crump MP, Gong JH, Loetscher P, et al. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *Embo j*. Dec 1 1997;16(23):6996-7007. doi:10.1093/emboj/16.23.6996
103. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. May 10 1996;272(5263):872-7. doi:10.1126/science.272.5263.872
104. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Advances in cancer research*. 2014;124:31-82. doi:10.1016/B978-0-12-411638-2.00002-1

105. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*. Nov 2006;20(11):1915-24. doi:10.1038/sj.leu.2404357
106. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 4 1998;95(16):9448-53. doi:10.1073/pnas.95.16.9448
107. Chang F, Steelman LS, Shelton JG, et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol*. Mar 2003;22(3):469-80.
108. Vila-Coro AJ, Rodríguez-Frade JM, Martín De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martínez AC, Mellado M. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *Faseb j*. Oct 1999;13(13):1699-710.
109. Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:289-319. doi:10.1146/annurev.pharmtox.38.1.289
110. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol*. Jul 2007;28(7):299-307. doi:10.1016/j.it.2007.05.007
111. Müller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001/03/01 2001;410(6824):50-56. doi:10.1038/35065016
112. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. May 6 2005;121(3):335-48. doi:10.1016/j.cell.2005.02.034
113. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*. Oct 1 1999;59(19):5002-11. doi:10.1186/bcr138
114. Janowski M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants. *Cell Adh Migr*. Jul-Sep 2009;3(3):243-9. doi:10.4161/cam.3.3.8260
115. Ishikawa T, Nakashiro K, Klosek SK, et al. Hypoxia enhances CXCR4 expression by activating HIF-1 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. Mar 2009;21(3):707-12.
116. Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med*. Nov 3 2003;198(9):1391-402. doi:10.1084/jem.20030267
117. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. Oct 29 1992;359(6398):843-5. doi:10.1038/359843a0
118. Jiang C, Ma S, Hu R, et al. Effect of CXCR4 on Apoptosis in Osteosarcoma Cells via the PI3K/Akt/NF- κ B Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;46(6):2250-2260. doi:10.1159/000489593
119. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. Sep 13 2007;1(3):313-23. doi:10.1016/j.stem.2007.06.002
120. Gatti M, Pattarozzi A, Bajetto A, et al. Inhibition of CXCL12/CXCR4 autocrine/paracrine loop reduces viability of human glioblastoma stem-like cells affecting

- self-renewal activity. *Toxicology*. Dec 15 2013;314(2-3):209-20.
doi:10.1016/j.tox.2013.10.003
121. Schrader AJ, Lechner O, Templin M, et al. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *British journal of cancer*. 2002;86(8):1250-1256.
doi:10.1038/sj.bjc.6600221
122. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*. Sep 18 2003;425(6955):307-11. doi:10.1038/nature01874
123. Wang L, Wang L, Yang B, et al. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by renal cell carcinoma cells correlates with metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26(8):1049-54. doi:10.1007/s10585-009-9294-3
124. Wang L, Chen W, Gao L, et al. High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*. 2012/10/07 2012;10(1):212. doi:10.1186/1477-7819-10-212
125. Li G, Badin G, Zhao A, et al. Prognostic value of CXCR4 expression in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Histol Histopathol*. Sep 2013;28(9):1217-22.
doi:10.14670/hh-28.1217
126. C DA, Portella L, Ottaiano A, et al. High CXCR4 expression correlates with sunitinib poor response in metastatic renal cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. Jul 2012;12(6):693-702. doi:10.2174/156800912801784820
127. D'Alterio C, Consales C, Polimeno M, et al. Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. Nov 2010;10(7):772-81. doi:10.2174/156800910793605839
128. D'Alterio C, Cindolo L, Portella L, et al. Differential role of CD133 and CXCR4 in renal cell carcinoma. *Cell Cycle*. Nov 15 2010;9(22):4492-4500.
doi:10.4161/cc.9.22.13680
129. Li X, Huang Y, Xia J, et al. CXCR4 expression in patients with high-risk locally advanced renal cell carcinoma can independently predict increased risk of disease progression and poor overall survival. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(12):3313-8.
130. Tang B, Tang F, Li Y, et al. Clinicopathological significance of CXCR4 expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. Mar 2015;22(3):1026-31.
doi:10.1245/s10434-014-4019-5
131. De Clercq E. The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem Pharmacol*. Jun 1 2009;77(11):1655-64.
doi:10.1016/j.bcp.2008.12.014
132. Vaishampayan UN, McDermott DF, Matrana MR, et al. A phase 1/2 study evaluating the efficacy and safety of the oral CXCR4 inhibitor X4P-001 in combination with axitinib in patients with advanced renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(15_suppl):4510-4510. doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.4510
133. Good Clinical Practice NETWORK. Trial of X4P-001 in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. <https://ichgcp.net/clinical-trials-registry/NCT02667886>
134. Hainsworth JD, Reeves JA, Mace JR, et al. A Randomized, Open-Label Phase 2 Study of the CXCR4 Inhibitor LY2510924 in Combination with Sunitinib Versus Sunitinib Alone in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma (RCC). *Targeted Oncology*. 2016/10/01 2016;11(5):643-653. doi:10.1007/s11523-016-0434-9

135. Pernas S, Martin M, Kaufman PA, et al. Balixafortide plus eribulin in HER2-negative metastatic breast cancer: a phase 1, single-arm, dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* Jun 2018;19(6):812-824. doi:10.1016/s1470-2045(18)30147-5
136. Hopkins SKCCcaJ. Plerixafor and Cemiplimab in metastatic pancreatic cancer. 2023;NCT04177810
137. Duell J, Krummenast F, Schirbel A, et al. Improved Primary Staging of Marginal-Zone Lymphoma by Addition of CXCR4-Directed PET/CT. *J Nucl Med.* Oct 2021;62(10):1415-1421. doi:10.2967/jnumed.120.257279
138. Buck AK, Serfling SE, Lindner T, et al. CXCR4-targeted theranostics in oncology. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* 2022/10/01 2022;49(12):4133-4144. doi:10.1007/s00259-022-05849-y
139. Werner R, Kircher S, Higuchi T, et al. CXCR4-directed imaging in solid tumors. *Frontiers in Oncology.* 08/01 2019;9doi:10.3389/fonc.2019.00770
140. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* Jan-Feb 2014;64(1):9-29. doi:10.3322/caac.21208
141. An H, Xu L, Zhu Y, et al. High CXC chemokine receptor 4 expression is an adverse prognostic factor in patients with clear-cell renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer.* 2014/04/01 2014;110(9):2261-2268. doi:10.1038/bjc.2014.179
142. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* Jul 1998;4(7):844-7. doi:10.1038/nm0798-844
143. Merseburger AS, Hennenlotter J, Schilling D, Sievert KD, Küfer R, Kuczyk MA. Anwendung von Tissue-Microarrays für die Diagnose, Prognose und Therapieentscheidung beim Nierenzellkarzinom. *Der Urologe.* 2006/03/01 2006;45(3):323-327. doi:10.1007/s00120-006-1005-y
144. Fedor HL, De Marzo AM. Practical methods for tissue microarray construction. *Methods Mol Med.* 2005;103:89-101. doi:10.1385/1-59259-780-7:089
145. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Immunohistochemical Analysis of Tissue Microarrays. In: Simon R, ed. *Tissue Microarrays: Methods and Protocols.* Humana Press; 2010:113-126.
146. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Jr PAB, et al. Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small-Cell Lung Carcinomas: Correlation Between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis. *Journal of Clinical Oncology.* 2003;21(20):3798-3807. doi:10.1200/jco.2003.11.069
147. Gori S, Sidoni A, Colozza M, et al. EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Annals of Oncology.* 2009/04/01/ 2009;20(4):648-654. doi:<https://doi.org/10.1093/annonc/mdn681>
148. The Human Protein Atlas. Human Protein Atlas Summary CXCR4. Accessed Oktober 8, 2022, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000121966-CXCR4>
149. Wehler TC, Graf C, Biesterfeld S, et al. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by renal cell carcinoma correlates with advanced disease. *Journal of oncology.* 2008;2008:626340-626340. doi:10.1155/2008/626340
150. Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta.* Apr 2007;1768(4):952-63. doi:10.1016/j.bbamem.2006.11.002

151. Signoret N, Oldridge J, Pelchen-Matthews A, et al. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol.* Nov 3 1997;139(3):651-64. doi:10.1083/jcb.139.3.651
152. Bao Y, Wang Z, Liu B, et al. A feed-forward loop between nuclear translocation of CXCR4 and HIF-1 α promotes renal cell carcinoma metastasis. *Oncogene.* Feb 2019;38(6):881-895. doi:10.1038/s41388-018-0452-4
153. Mehta TS, Lu H, Wang X, et al. A unique sequence in the N-terminal regulatory region controls the nuclear localization of KLF8 by cooperating with the C-terminal zinc-fingers. *Cell Research.* 2009/09/01 2009;19(9):1098-1109. doi:10.1038/cr.2009.64
154. Poon IK, Jans DA. Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic.* Mar 2005;6(3):173-86. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00268.x
155. Wang LH, Liu Q, Xu B, et al. Identification of nuclear localization sequence of CXCR4 in renal cell carcinoma by constructing expression plasmids of different deletants. *Plasmid.* Jan 2010;63(1):68-72. doi:10.1016/j.plasmid.2009.09.004
156. Xu Z, Li P, Wei D, et al. NMMHC-IIA-dependent nuclear location of CXCR4 promotes migration and invasion in renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* Nov 2016;36(5):2681-2688. doi:10.3892/or.2016.5082
157. Gahan JC, Gosalbez M, Yates T, et al. Chemokine and chemokine receptor expression in kidney tumors: molecular profiling of histological subtypes and association with metastasis. *J Urol.* Mar 2012;187(3):827-33. doi:10.1016/j.juro.2011.10.150
158. Han M, Lv S, Zhang Y, et al. The prognosis and clinicopathology of CXCR4 in gastric cancer patients: a meta-analysis. *Tumour Biol.* May 2014;35(5):4589-97. doi:10.1007/s13277-013-1603-4
159. Yasuoka H, Tsujimoto M, Yoshidome K, et al. Cytoplasmic CXCR4 expression in breast cancer: induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis and poor prognosis. *BMC Cancer.* Nov 23 2008;8:340. doi:10.1186/1471-2407-8-340
160. Liu CF, Liu SY, Min XY, et al. The prognostic value of CXCR4 in ovarian cancer: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(3):e92629. doi:10.1371/journal.pone.0092629
161. Kendrick N. *A gene's mRNA level does not usually predict its protein level.* 2014.
162. Rasti A, Abolhasani M, Zanjani LS, Asgari M, Mehrzama M, Madjd Z. Reduced expression of CXCR4, a novel renal cancer stem cell marker, is associated with high-grade renal cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 2017/01/01 2017;143(1):95-104. doi:10.1007/s00432-016-2239-8
163. Floranović MP, Petrović AR, Veličković LJ. Expression of the CXCR4 and CXCR7 in renal cancers; can “the orphan receptor” predict the mortality? *Annals of Diagnostic Pathology.* 2021/12/01/ 2021;55:151829. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2021.151829>
164. Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G, Balkwill FR. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res.* Jul 1 2001;61(13):4961-5.
165. Kato M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression pattern of CXCR4 chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res.* 2003;5(5):R144-50. doi:10.1186/bcr627
166. Zhao FL, Guo W. Expression of stromal derived factor-1 (SDF-1) and chemokine receptor (CXCR4) in bone metastasis of renal carcinoma. *Mol Biol Rep.* Feb 2011;38(2):1039-45. doi:10.1007/s11033-010-0200-5

167. Gong J, Maia MC, Dizman N, Govindarajan A, Pal SK. Metastasis in renal cell carcinoma: Biology and implications for therapy. *Asian J Urol*. Oct 2016;3(4):286-292. doi:10.1016/j.ajur.2016.08.006
168. Hegde U, Patel V, Kaloudis E. Durable spontaneous regression of lung metastases from renal cell carcinoma after incomplete use of multiple kinase inhibitor sorafenib. *Int J Urol*. Jun 2013;20(6):644-5. doi:10.1111/iju.12011
169. Kucia M, Jankowski K, Reza R, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *Journal of molecular histology*. 04/01 2004;35:233-45. doi:10.1023/B:HIJO.0000032355.66152.b8
170. Schols D, Struyf S, Van Damme J, Esté JA, Henson G, De Clercq E. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med*. Oct 20 1997;186(8):1383-8. doi:10.1084/jem.186.8.1383
171. Jacobi A. *Die Rolle der CXCR4/SDF-1-Achse in FLT3-ITD-positiven humanen hämatopoetischen Stammzellen*. 2011.
172. Choueiri TK, Atkins MB, Rose TL, et al. 1134PD - A phase Ia/Ib trial of the CXCR4 inhibitor X4P-001 and nivolumab for advanced renal cell carcinoma (RCC) that is unresponsive to nivolumab monotherapy. *Annals of Oncology*. 2018/10/01/ 2018;29:viii402-viii403. doi:<https://doi.org/10.1093/annonc/mdy288.007>
173. Nengroo MA, Khan MA, Verma A, Datta D. Demystifying the CXCR4 conundrum in cancer biology: Beyond the surface signaling paradigm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2022/09/01/ 2022;1877(5):188790. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188790>