

Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen

Differentielle Expression und prognostische Relevanz der
Mucin-1 Proteinexpression beim organbegrenzten und
metastasierten klarzelligen Nierenzellkarzinom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Beermann, Johanna

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Bedke

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Kopp

Tag der Disputation: 25.07.2017

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Nierenzellkarzinome	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren	1
1.1.3. Pathogenese.....	2
1.1.4. Klassifikation	4
1.1.5. Klinik.....	6
1.1.6. Diagnostik und Staging	6
1.1.7. Therapie.....	9
1.1.8. Prognose	13
1.2. MUC1	14
1.2.1. Physiologie MUC1	14
1.2.2. MUC1 und Malignome	17
1.2.3. MUC1 und RCC.....	21
1.2.4. MUC1 und mRCC.....	22
1.2.5. Diagnostische und prädiktive Rolle von MUC1	23
1.3. Problem und Fragestellung	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1. Patientenkollektive.....	25
2.2. Untersuchungsmaterial	26
2.3. Tissue Micro Array (TMA)	27
2.4. Immunhistochemie (IHC)	29
2.5. Auswertung TMA	31

2.6.	Statistische Analysen	33
2.6.1.	Klinische Daten	33
2.6.2.	Immunhistochemie	33
2.6.3.	Tests und Software	33
3.	Ergebnisse	34
3.1.	RCC-Kollektiv	34
3.1.1.	Patientenkollektiv und klinische Parameter	34
3.1.2.	Immunhistochemie	35
3.1.3.	Vergleich IHC benignes Nierenparenchym vs. ccRCC-Gewebe.....	47
3.1.4.	Univariate Analysen IHC-Färbung vs. klinische Parameter	48
3.1.5.	Univariate Analysen IHC-Färbung vs. Survival	49
3.1.6.	Multivariate Analysen Survival	52
3.2.	mRCC Kollektiv	52
3.2.1.	Patientenkollektiv und klinische Parameter	52
3.2.2.	Immunhistochemie	54
3.2.3.	Univariate Analysen IHC-Färbung vs. klinische Parameter	60
3.2.4.	Univariate Analysen IHC-Färbung vs. Lokalisation Metastasen.....	62
3.2.5.	Univariate Analysen IHC-Färbung vs. Survival	65
3.2.6.	Multivariate Analysen Survival	67
3.3.	Vergleich Expression MUC1 in RCC und mRCC.....	68
4.	Diskussion.....	72
5.	Zusammenfassung	89
6.	Literaturverzeichnis	91
7.	Erklärung zum Eigenanteil	102
8.	Publikation	103
9.	Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese des ccRCC; modifiziert nach Nelson et al. ⁹⁷	4
Abbildung 2: Überblick über die Signalkaskaden im Rahmen der Pathogenese von RCC und Angriffspunkte einiger zugelassener zielgerichteter Therapien; nach Captanio et al. ²⁵	11
Abbildung 3: TMA-Gerät im urologischen Labor der Universitätsklinik Tübingen mit einem recipient-Block.....	28
Abbildung 4: zytoplasmatische MUC1-Expression mit Skalierung der Intensitäten (0 bis 3) (200fache Vergrößerung)	31
Abbildung 5: membranöse MUC1-Expression mit Skalierung der Intensitäten (0 bis 3) (200fache Vergrößerung)	32
Abbildung 6: rote Markierung: keine zytoplasmatische MUC1-Färbung in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung)	36
Abbildung 7: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 1 in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung).....	36
Abbildung 8: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 2 in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung).....	37
Abbildung 9: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 3 in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung).....	37
Abbildung 10: rote Markierung: keine membranöse MUC1-Färbung in benignem Nierenparenchym (Intensität 0) (200-fache Vergrößerung)	38
Abbildung 11: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 1 in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung).....	38
Abbildung 12: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 2 in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung).....	39
Abbildung 13: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 3 in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung).....	39
Abbildung 14: Korrelation der zytoplasmatischen (Y-Achse) und membranösen (X-Achse) IR-Scores in benignem Nierenparenchym	40
Abbildung 15: rote Markierung: keine zytoplasmatische MUC1-Färbung im RCC-Primärtumor (Intensität 0) (200-fache Vergrößerung)	42
Abbildung 16: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 1 im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung)	42

Abbildung 17: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 2 im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung)	43
Abbildung 18: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 3 im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung)	43
Abbildung 19: rote Markierung: keine membranöse MUC1-Färbung im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung).....	44
Abbildung 20: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 1 im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung).....	44
Abbildung 21: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 2 im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung).....	45
Abbildung 22: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 3 im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung).....	45
Abbildung 23: Korrelation der IR-Scores der zytoplasmatischen (Y-Achse) und der membranösen (X-Achse) MUC1-Expression in primären ccRCC.....	46
Abbildung 24: Boxplot-Darstellung der IR-Scores der MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym.....	48
Abbildung 25: Boxplot-Darstellung der IR-Scores der MUC1-Expression in primären ccRCC.....	48
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurven für zytoplasmatische MUC1-Expression in RCC-Primärtumoren (p=0,387)	50
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven für membranöse MUC1-Expression in RCC-Primärtumoren (p=0,638)	50
Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurven für gesamte MUC1-Expression in RCC-Primärtumoren (p=0,164)	51
Abbildung 29: rote Markierung: fehlende zytoplasmatische MUC1-Färbung in einer RCC-Metastase (Intensität 0) (200-fache Vergrößerung)	54
Abbildung 30: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 1 in einer RCC-Metastase (200-fache Vergrößerung).....	55
Abbildung 31: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 2 in einer RCC-Metastase (200-fache Vergrößerung).....	55
Abbildung 32: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 3 in einer RCC-Metastase (200-fache Vergrößerung).....	56
Abbildung 33: rote Markierung: keine membranöse MUC1-Färbung in einer RCC-Metastase (Intensität 0) (200-fache Vergrößerung).....	56

Abbildung 34: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 1 in einer RCC-Metastase (200-fache Vergrößerung).....	57
Abbildung 35: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 2 in einer RCC-Metastase (200-fache Vergrößerung).....	57
Abbildung 36: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 3 in einer RCC-Metastase (200-fache Vergrößerung).....	58
Abbildung 37: Korrelation der zytoplasmatischen (Y-Achse) und der membranösen (X-Achse) IR-Scores in RCC-Metastasen	58
Abbildung 38: Boxplot-Darstellung der IR-Scores der MUC1-Expression in Metastasengewebe bei mRCC	60
Abbildung 39: zytoplasmatische MUC1-Expression in Abhängigkeit der Metastasenlokalisierung ¹¹⁹	63
Abbildung 40: membranöse MUC1-Expression in Abhängigkeit der Metastasenlokalisierung ¹¹⁹	63
Abbildung 41: zytoplasmatische MUC1-Expression in Abhängigkeit von pulmonaler oder nicht-pulmonaler Lokalisation der Metastasen ¹¹⁹	64
Abbildung 42: membranöse MUC1-Expression in Abhängigkeit von pulmonaler oder nicht-pulmonaler Lokalisation der Metastasen ¹¹⁹	64
Abbildung 43: Kaplan-Meier-Kurven für zytoplasmatische MUC1-Expression oberhalb bzw. unterhalb des Medians (p=0,767)	65
Abbildung 44: Kaplan-Meier-Kurven für membranöse MUC1-Expression oberhalb bzw. unterhalb des Medians (p=0,118)	66
Abbildung 45: Kaplan-Meier-Kurven für die gesamte MUC1-Expression (zytoplasmatisch und/oder membranös) (p=0,518)	66
Abbildung 46: Boxplot-Darstellung der IRS der zytoplasmatischen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym, primären ccRCC und ccRCC-Metastasen ¹¹⁹	68
Abbildung 47: Boxplot-Darstellung der IRS der membranösen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym, primären ccRCC und ccRCC-Metastasen ¹¹⁹	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der UICC	5
Tabelle 2: Empfehlungen der EAU für das Follow-up (US = Ultraschall, CT = Computertomographie) ¹¹⁰	9
Tabelle 3: Therapieempfehlungen gemäß der S3-Leitlinien bei mRCC ⁷⁷ ; (MSKCC = Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Näheres siehe Abschnitt 2.1).....	12
Tabelle 4: Motzer Kriterien (modifiziert nach Powles et al. ¹¹⁰).....	26
Tabelle 5: Charakteristika der Patienten mit ccRCC-Primärtumor (KI = Konfidenzintervall).....	35
Tabelle 6: statistische Analyse der zytoplasmatischen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym.....	40
Tabelle 7: Perzentilen der zytoplasmatischen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym.....	40
Tabelle 8: statistische Analyse der IR-Scores der membranösen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym.....	41
Tabelle 9: Perzentilen der membranösen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym.....	41
Tabelle 10: statistische Analyse der IR-Scores der zytoplasmatischen MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren	46
Tabelle 11: Perzentilen der zytoplasmatischen MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren	46
Tabelle 12: statistische Analyse der IR-Scores der membranösen MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren	47
Tabelle 13: Perzentilen der IR-Scores für die membranöse MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren	47
Tabelle 14: Korrelation der MUC1-Expressionsmuster mit klinisch-pathologischen Parametern in primären ccRCC (n = 61)	49
Tabelle 15: Univariate Cox-Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben bei Patienten mit primärem ccRCC.....	52
Tabelle 16: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben bei Patienten mit primären ccRCC.....	52
Tabelle 17: Charakteristiken der Metastasen/Lokalrezidive (KI = Konfidenzintervall) 53	

Tabelle 18: Statistische Analyse der IR-Scores der zytoplasmatischen MUC1-Expression in ccRCC-Metastasen	59
Tabelle 19: Perzentilen der IR-Scores der zytoplasmatischen MUC1-Expression in ccRCC-Metastasen	59
Tabelle 20: Statistische Analyse der IR-Scores der membranösen MUC1-Expression in RCC-Metastasen.....	59
Tabelle 21: Perzentilen der membranösen MUC1-Expression in RCC-Metastasen.....	60
Tabelle 22: Korrelation der MUC1-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern bei Patienten mit mRCC (n = 76)	61
Tabelle 23: Differentielle Expression von MUC1 in verschiedenen Metastasenlokalisationen (n = 151; SEM = standard error of the mean)	62
Tabelle 24: Assoziation klinisch-pathologischer Parameter mit dem Gesamtüberleben ¹¹⁹	67
Tabelle 25: multivariate Cox-Regressionsanalyse bei mRCC ¹¹⁹	68
Tabelle 26: IR-Scores für zytoplasmatische und membranöse MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym, primärem ccRCC und RCC-Metastasen (*p = aus der Kruksal-Wallis-Analyse; SEM = standard error of the mean) ¹¹⁹	70
Tabelle 27: Direkter Vergleich der MUC1-Expression in primären ccRCC und ccRCC-Metastasen des gleichen Patienten (Abk.: M > T: MUC1-Expression in Metastasengewebe stärker als im Tumorgewebe; T > M: MUC1-Expression in Tumorgewebe stärker als in Metastasengewebe; T = M: MUC1-Expression in Tumorgewebe und Metastasengewebe gleich; T1 > M > T2: MUC1-Expression in Metastasengewebe zwischen beiden Stanzen des Tumors; C: zytoplasmatische MUC1-Expression; M: membranöse MUC1-Expression).....	71

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatöse polyposis coli
BAP1	BRCA1 associated protein 1
Bcl	B-cell lymphoma
BMI	Body-Mass-Index
BRCA1	Breast cancer 1
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CA	Cancer antigen
ccRCC	Clear cell renal cell carcinoma
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMA	European Medicines Agency
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
E α	Östrogenrezeptor α
FDA	Food and Drug Administration
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-colony stimulating factor
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	Hypoxia inducible factor
HR	Hazard Ratio
HRPO	Horseradish peroxidase
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN	Interferon

IHC	Immunhistochemie
IKK β	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IQR	Interquartile range
IRS	Immunhistochemistry reactivity score
ISUP	International Society of Urological Pathology
I κ B	Inhibitor of κ B
I κ B α	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
kDa	Kilo-Dalton
KI	Konfidenzintervall
LDH	Laktatdehydrogenase
LE	Level of evidence
MHC	Major histocompatibility complex
MIP	MUC1 inhibitory peptide
miRNA	Micro-RNA
mRCC	Metastasiertes RCC
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
MUC1-C	MUC1-C-terminales Ende
MUC1-CT	MUC1-cytoplasmatic tail
MUC1-N	MUC1-N-terminales Ende
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zelle	Natural Killer-Zelle
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
NSCLC	Non-small-cell lung cancer
PBRM1	Polybromo 2
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat

PMIP	PTD4 MUC1 inhibitory peptide
PTD4	protein transduction domain 4
RCC	Renal cell carcinoma
RFA	Radiofrequenzablation
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase chain reaction
SE	Standard error
SEM	Standard error of the mean
SETD2	SET domain containing 2
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TGF α	Tumor growth factor α
TMA	Tissue Micro Array
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UCLA	University of California Los Angeles
UICC	Union internationale contre le cancer
UISS	UCLA Intergrated Staging System
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VHL	Von-Hippel-Lindau
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1. Nierenzellkarzinome

1.1.1. Epidemiologie

Nierenzellkarzinome (*renal cell cancer* = RCC) entstehen in der Nierenrinde und machen 80-85% der primären renalen Neoplasien aus.⁷ Der häufigste histopathologische Subtyp des RCC ist mit 80-85% das klarzellige RCC (*clear cell renal cell cancer* = ccRCC). Papilläre RCC machen 10-15% aus und chromophobe RCC 5-10%.⁷ Näheres zur Einteilung nach histopathologischen Kriterien findet sich im Abschnitt 1.1.4.2.

In Deutschland hat das Robert-Koch-Institut (RKI) im Jahr 2016 knapp 15000 RCC-Neuerkrankungen registriert¹²⁴, wobei Männer in etwa 1,5-mal häufiger betroffen sind.⁸¹ Der Altersgipfel liegt zwischen 60 und 70 Jahren.⁸¹ Betrachtet man die Zahlen des RKI, lässt sich eine steigende Inzidenz beobachten.³⁴ Es wird diskutiert, dass die steigende Inzidenz v.a. auf die steigende Anzahl von Zufallsbefunden im Rahmen bildgebender Untersuchungen mit anderer Indikation zurückzuführen ist.^{25,97} Aufgrund der meist geringen Tumorgröße der Inzidentalome sind diese nur selten primär metastasiert. Generell weisen hingegen 17% der Patienten bei Erstdiagnose eines RCC bereits Fernmetastasen auf.¹³³

Bei den meisten neu auftretenden Fällen handelt es sich um sporadische RCC, während 2-4% der RCC hereditär sind. Fast alle hereditären RCC beruhen auf einer vererbten Mutation des VHL (Von-Hippel-Lindau)-Gens.²³

1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Die genaue Ätiologie der RCC ist weitgehend unbekannt. Als einer der wichtigsten Risikofaktoren gilt das Zigarettenrauchen.^{94,97,142}

Auch unter Patienten mit einer arteriellen Hypertonie beobachtet man eine erhöhte Inzidenz renaler Karzinome.³¹ Unklar ist in diesem Kontext jedoch, ob die arterielle Hypertonie selbst prädisponierend ist oder eine mögliche Therapie mit Diuretika.¹⁵⁵

Auffällig ist auch, dass das Risiko ein RCC zu entwickeln mit dem Body-Mass-Index (BMI) steigt. Zum Teil wird vermutet, dass Östrogene in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnten.¹⁵⁵ Allerdings gibt es auch Studien, die Östrogene eher als protektiv einschätzen und sogar als potenzielles Therapeutikum suggerieren.¹⁵⁹ Der

Pathomechanismus ist also noch unklar, aber Adipositas selbst wird als Risikofaktor generell anerkannt.¹⁵ Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie von Haferkamp et al., dass Patienten mit einem BMI <18,5kg/m² zum Zeitpunkt der Nephrektomie im Rahmen der RCC-Therapie im Vergleich zu adipösen Patienten ein schlechteres Outcome hatten.⁴⁷

Als weitere Risikofaktoren gelten der Verzehr von rotem Fleisch¹²⁶ und eine berufliche Karzinogenexposition⁸⁶, wobei insbesondere Arsen, Cadmium¹⁰⁶ und Trichlorethylen¹⁴⁸ in der Diskussion stehen.

Darüber hinaus gelten eine Analgetika-Nephropathie⁸⁷, langjährige Einnahme von NSAR (nicht-steroidale Antirheumatika) außer Aspirin²⁹ und erworbene zystische Nierenerkrankungen bei Dialysepatienten²¹ als prädisponierend für die Entwicklung eines RCC.

Hingegen wird mäßiger Alkoholkonsum von einigen Autoren als Protektivfaktor eingeschätzt.⁵⁷

Die meisten RCC treten sporadisch auf, wobei in Verbindung mit genetischen Syndromen auch eine familiäre Häufung zu beobachten ist.⁹⁷

Insbesondere ccRCC sind mit der VHL-Erkrankung assoziiert. Hierbei handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, bei der die Mutation eines Allels des VHL-Gens bereits vererbt wird. Im Rahmen eines *Loss of Heterozygosity* bekommen betroffene Patienten dann retinale Angiome, Hämangioblastome des ZNS, Phäochromozytome und in 30% der Fälle ccRCC.^{97,155}

Aber auch bei sporadischen RCC ist eine Mutation des VHL-Gens häufig.¹⁹ Näheres dazu findet sich im Abschnitt 1.1.3.

1.1.3. Pathogenese

ccRCC gehen von den Zellen der proximalen Tubuli aus¹⁶⁰, wobei in der Pathogenese des ccRCC das VHL-Gen eine zentrale Rolle spielt. So weisen über 80% aller ccRCC eine VHL-Veränderung im Sinne einer Mutation oder epigenetischer Modifikationen auf.²⁵ Diese Veränderungen wie Mutationen oder Hypermethylierungen des VHL-Gens sind vornehmlich in ccRCC nachzuweisen und nur sehr selten in anderen histologischen Subtypen.⁶⁵

Neben dem VHL-Gen konnten inzwischen weitere Gene identifiziert werden, deren Mutation die Entstehung von RCC verursachen sollen. Diese erklären die Existenz von RCC ohne VHL-Veränderung. Zu diesen Genen gehören z.B. die Tumorsuppressorgene polybromo 1-Gen (PBRM1; in ~50% der Fälle mutiert), *Breast cancer 1* (BRCA1)

associated protein 1-Gen (BAP1; ~15%) und *SET domain containing 2*-Gen (SETD2; ~15%).²²

Das im VHL-Gen kodierte Protein pVHL ist von großer Relevanz für den Abbau des Transkriptionsfaktors HIF-1 α (*hypoxia inducible factor-1 α*): HIF-1 α wird physiologischerweise unter normoxischen Bedingungen ubiquitiniert und durch Proteasomen abgebaut. Die Interaktion zwischen HIF-1 α und dem E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex wird über pVHL vermittelt.⁸ Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α derart modifiziert, dass es nicht mehr ubiquitiniert und somit nicht mehr abgebaut werden kann.⁹⁷ So kumuliert HIF-1 α und bildet einen Komplex mit HIF-1 β . Als Komplex steigern sie als Transkriptionsfaktor die Expression von diversen Proteinen und Wachstumsfaktoren, die unter hypoxischen Bedingungen für das Überleben der Zelle wichtig sind, da sie Prozesse wie die Angiogenese, Zelldifferenzierung, Zellmigration und -proliferation begünstigen.⁹⁷ Beispielsweise werden VEGF (*vascular endothelial growth factor*), TGF α (*transforming growth factor α*) und PDGF (*platelet derived growth factor*) durch HIF-1 α -Akkumulation vermehrt exprimiert und binden somit vermehrt an ihre Rezeptoren an Endothelzellen, wo sie für eine gesteigerte Zellmigration, -proliferation und -permeabilität sorgen.^{8,97}

Bei fehlendem pVHL wird die Interaktion zwischen HIF-1 α und dem E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex verhindert, sodass HIF-1 α nicht abgebaut werden kann. Somit kommt es auch unter normoxischen Bedingungen zur Akkumulation von HIF-1 α und damit einhergehend zur vermehrten Expression von Proteinen und Wachstumsfaktoren.⁹⁷

Des Weiteren kann eine HIF-1 α -Akkumulation durch eine Aktivierung von mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) vermittelt werden. Hierbei wird durch Wachstumsfaktoren oder andere zelluläre Stimuli der PI3K \rightarrow Akt-Signalweg (Phosphoinositide 3-Kinase \rightarrow Proteinkinase B-Signalweg) und darüber dann mTOR aktiviert. Aktiviertes mTOR wiederum phosphoryliert und aktiviert die p70S6-Kinase, was wiederum zur vermehrten Translation verschiedener Proteine, darunter HIF-1 α , führt.⁸

In **Abbildung 1** sind die einzelnen Schritte der beschriebenen Signalwege graphisch dargestellt.

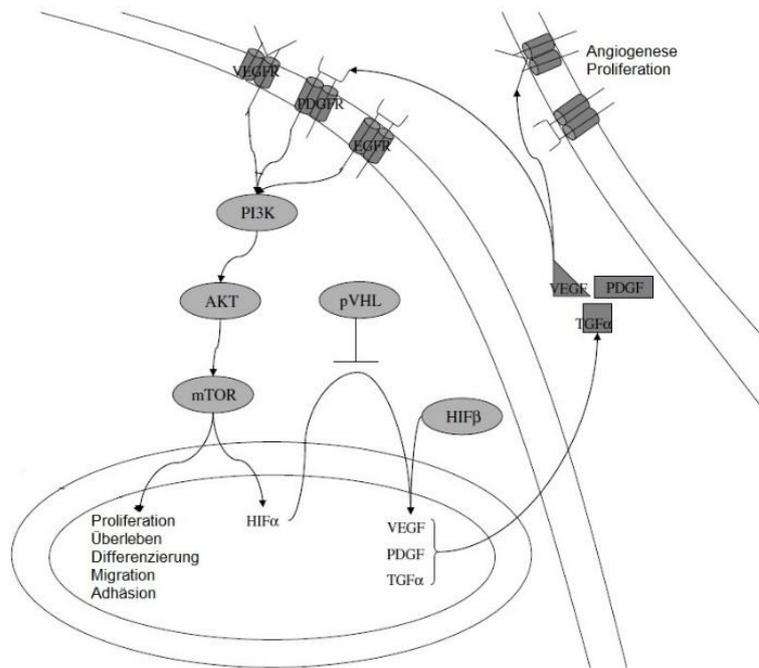


Abbildung 1: Pathogenese des ccRCC; modifiziert nach Nelson et al.⁹⁷

1.1.4. Klassifikation

Zur Klassifikation von Nierentumoren kommen zwei verschiedene, sich ergänzende Klassifikationssysteme zum Einsatz. Zum einen die TNM-Klassifikation und zum anderen die Klassifikation der *World Health Organization* (WHO), die auf histologischen Kriterien beruht.

1.1.4.1. TNM

Für die TNM-Klassifikation gelten die Kriterien der *Union for International Cancer Control* (UICC) aus dem Jahr 2010.

Das T steht für den Primärtumor:¹⁵⁴

- T0 Kein Primärtumor nachweisbar
- T1 Tumor ≤ 7 cm auf die Niere begrenzt
 - T1a Tumor ≤ 4 cm
 - T1b Tumor > 4 cm
- T2 Tumor > 7 cm auf die Niere begrenzt
 - T2a Tumor > 7 bis ≤ 10 cm
 - T2b Tumor > 10 cm
- T3 Tumor infiltriert größere Venen oder perirenales Gewebe, aber nicht in

die ipsilaterale Nebenniere oder über die Gerota-Faszie hinaus

- T3a Invasion der Nierenvene oder perirenale bzw. perihiläre Infiltration
- T3b Invasion der V. cava unterhalb des Zwerchfells
- T3c Invasion der V. cava oberhalb des Zwerchfells
- T4 Durchbruch der Gerota-Faszie und/oder Infiltration der ipsilateralen Nebenniere per continuitatem

Das N steht für Noduli lymphatici, also den Lymphknotenbefall:¹⁵⁴

- Nx Keine Aussage über Lymphknotenstatus möglich
- N0 Keine Lymphknotenmetastasen
- N1 Metastase in einem regionalen Lymphknoten
- N2 Metastasen in mehr als einem Lymphknoten

Das M steht für Metastasen im Sinne einer Fernmetastasierung:¹⁵⁴

- Mx Keine Aussage über Fernmetastasierung möglich
- M0 Keine Fernmetastasen
- M1 Nachweis von Fernmetastasen

Abhängig von dem jeweiligen T-, N- und M-Stadium, werden RCC in die UICC-Stadien I bis IV eingeteilt. Diese sind in **Tabelle 1** dargestellt.¹⁵⁴

Tabelle 1: Stadieneinteilung der UICC

		T			
		1	2	3	4
N	0	I	II	III	IV
	1	III	III	III	IV
	2	IV	IV	IV	IV
M	1	IV	IV	IV	IV

1.1.4.2. WHO-/ ISUP (International Society of Urological Pathology)-Klassifikation

Während die TNM-Klassifikation die Tumorausbreitung beschreibt, nutzt die WHO-/ISUP-Klassifikation histologische Merkmale als Grundlage zur Einteilung der Nierenzelltumore. Dabei werden folgende histologische Typen der Nierenzelltumore unterschieden: klarzelliges RCC, multiloculäres klarzelliges RCC, papilläres RCC, chromophobes RCC, Ductus Bellini Karzinom, Nierenmarkskarzinom, Xp11-

Translokation Karzinom, mit Neuroblastomen assoziiertes Karzinom, *Mucinous tubular and spindle cell carcinoma*, unklassifiziertes RCC, papilläres Adenom und Onkozytom. Neben den Nierenzelltumoren gibt es auch metanephrische Nierentumore, nephroblastische Nierentumore, mesenchymale Nierentumore, gemischt mesenchymal und epitheliale Nierentumore, neuroendokrine Nierentumore, hämatopoetische und lymphoide Nierentumore, Keimzelltumore der Niere und Metastasen der Niere.¹⁵⁵

1.1.5. Klinik

Die klassische Virchow-Symptom-Trias des RCC umfasst Hämaturie, Flankenschmerzen und palpabler Flankentumor. Allerdings handelt es sich bei diesen Symptomen meist um Spätsymptome. Da aktuell ca. 50% der RCC sonographische Zufallsbefunde darstellen und es keine typischen Frühsymptome gibt, bleiben viele Patienten asymptomatisch.³⁰ Unter den Patienten, die bei Erstdiagnose bereits symptomatisch sind, ist Hämaturie mit 50% das häufigste Symptom.⁹⁷

Viele Patienten fallen initial auch durch systemische Symptome wie beispielsweise Müdigkeit, Leistungsminderung, Gewichtsverlust oder Fieber auf.¹⁵⁵ Manchmal schildern die Patienten auch Fatigue oder ein allgemeines Krankheitsgefühl.⁹⁷

Etwa 10% der Patienten mit RCC haben Tumorthromben in der Vena renalis oder der Vena cava, wodurch es zu Symptomen der unteren Einflusstauung kommen kann.²⁵ In fortgeschritteneren Stadien kann es bei Männern so zu einer Varikozele kommen.⁷⁵

Durch die Produktion von hormon- oder zytokinähnlichen Produkten können RCC paraneoplastische Syndrome induzieren.¹²⁷ Im Rahmen dieser kann es beispielsweise zur Hyperkalzämie im Sinne eines Pseudohyperparathyreodimus, einer Erythrozytose durch vermehrte Ausschüttung von Erythropoetin, einer arteriellen Hypertonie durch vermehrte Renin-Sekretion oder einer Gynäkomastie kommen.¹⁵⁵ Die häufigsten Symptome im Rahmen eines paraneoplastischen Syndroms bei RCC sind Hypertonie, Anämie und Kachexie.¹²⁷

Bei manchen Patienten führen auch durch Metastasen bedingte Beschwerden wie Knochenschmerzen bei össären Metastasen oder chronischer Husten bei Lungenmetastasen zur ärztlichen Vorstellung.⁶³

1.1.6. Diagnostik und Staging

Aufgrund der hohen Raten an Zufallsbefunden spielt die klinische Untersuchung eine untergeordnete Rolle. Jedoch sollte insbesondere bei Auftreten einer palpablen

abdominellen Masse, einer neu aufgetretenen Varikozele oder bei unilateralen Ödemen der unteren Extremitäten immer an eine retroperitoneale Neoplasie gedacht werden.²⁵

Auch die Laboruntersuchungen sind in der RCC-Diagnostik meistens nicht richtungsweisend, da mögliche Veränderungen in der Regel unspezifisch sind.²⁵

Häufige Laborbefunde sind beispielsweise eine beschleunigte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG)³³ und ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP).¹³⁹ Häufig zeigt sich im Laborbefund eine Anämie, unabhängig davon ob die Patienten auch eine Hämaturie haben.³⁰ Weitere empfohlene Laboruntersuchungen sind, neben einer Urinanalyse, die Bestimmung von alkalischer Phosphatase (AP), Kreatinin, Calcium und Leberwerten im Serum.¹¹⁰ Etablierte Tumormarker gibt es für das RCC aktuell nicht.^{59,110}

Tumore der Niere können häufig konventionell sonographisch detektiert werden. Da die Sonographie bezüglich Spezifität und Genauigkeit limitiert ist, sollten auffällige Sonographie-Befunde mittels weiterer bildgebender Verfahren abgeklärt werden²⁵, wobei im klinischen Alltag meist zunächst eine Computertomographie (CT) mit Kontrastmittel durchgeführt wird. Dies ist nicht nur in Bezug auf den Primärtumor aussagekräftig, sondern auch relevant für die Suche nach abdominellen Fernmetastasen im Rahmen des Stagings.¹¹⁰

Zum weiteren Staging sollte neben dem CT des Abdomens auch ein CT des Beckens und ab einer Tumorgröße von 3cm ein CT Thorax zum Ausschluss von Lungenmetastasen durchgeführt werden.⁷⁷

Besteht im CT der Verdacht auf einen venösen Tumorthrombus, kann eine Magnetresonanztomographie (MRT) indiziert sein, um die genaue Ausdehnung zu erfassen.^{77,98}

Weitere Untersuchungen sollten nur durchgeführt werden, wenn sie klinisch indiziert sind.^{77,97} So sollte beispielsweise bei klinischem Verdacht auf Hirnmetastasen zusätzlich ein CT des Schädels durchgeführt werden. Bei klinischem Verdacht auf Knochenmetastasen sollten ein low-dose CT oder ein MRT der Skelettszintigraphie zur weiteren Abklärung vorgezogen werden.⁷⁷

Die Relevanz einer Nierenbiopsie im Rahmen der RCC-Diagnostik ist umstritten. Durch die bildgebenden Verfahren können 90% der Läsionen schon vor Erhalt eines histologischen Untersuchungsergebnisses korrekt als benigne oder maligne eingeschätzt werden. Außerdem sind insbesondere kleine Tumoren häufiger benigne.¹²⁹

Zahlreiche Autoren betrachten eine Nierenbiopsie im Vorfeld einer Nierenresektion aufgrund zahlreicher falsch negativer Ergebnisse, potenzieller Stichkanalmetastasen und des Blutungsrisikos als nicht sinnvoll.⁹⁷ Darüber hinaus fehlt häufig die klinische Relevanz einer Nierenbiopsie, da meist ohnehin eine Nierenteilresektion oder Nephrektomie indiziert ist.¹⁴⁴

Dennoch nimmt die Relevanz einer Nierenbiopsie im Rahmen der RCC-Diagnostik aktuell wieder zu. Da immer mehr Tumore zufällig entdeckt werden und diese dann noch sehr klein sind, ist die klinische Relevanz dieser Inzidentalome häufig noch unklar, sodass insbesondere bei älteren und/oder multi-morbiden Menschen die *Active Surveillance* nach Nierenbiopsie eine Alternative zur Nierenteilresektion darstellen kann.^{110,149}

Auch bei Patienten mit metastasiertem RCC (mRCC) kann eine Nierenbiopsie zur Auswahl einer passenden zielgerichteten Therapie (*Targeted Therapy*) eine Alternative zur kompletten Tumorresektion mittels Nephrektomie sein.¹⁴⁹ Zudem werden die Biopsietechniken immer sicherer, sodass es nur noch sehr selten zu Stichkanalmetastasen kommt.¹⁴⁹

Gemäß den Leitlinien der *European Association of Urology* (EAU) ist eine Nierenbiopsie in folgenden Fällen indiziert: Gewinnung von Gewebe für eine histologische Untersuchung bei radiologisch intermediären renalen Raumforderungen, Auswahl von Patienten mit kleinen renalen Raumforderungen, für die eine *Active Surveillance* in Betracht kommt, Gewinnung von Gewebe vor der Applikation von ablativen Verfahren und für die Auswahl des bestmöglichen Therapieansatzes bei metastasierten Krankheitsverläufen.¹¹⁰

Nach erfolgter Therapie sollte ein Follow-up durchgeführt werden. Ziel ist dabei neben der Früherkennung eines Rezidivs und Metastasen die Früherkennung kontralateraler RCC, da 2% der Patienten ein kontralaterales RCC bekommen. Dabei sollte die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv, abhängig von der Pathologie des Tumors, gegen die Invasivität der Untersuchungen abgewogen werden.³⁷

Gemäß den Empfehlungen der EAU sollte je nach Risikogruppe über 5 Jahre jährlich bildgebende Diagnostik durchgeführt werden. Bei niedrigem Risiko kann das Follow-up anschließend beendet werden. Bei intermediärem und hohem Risiko sollte dann weiterhin alle 2 Jahre eine Bildgebung durchgeführt werden. Die genauen Empfehlungen der EAU zum Follow-up finden sich als Übersicht in **Tabelle 2**.¹¹⁰

Tabelle 2: Empfehlungen der EAU für das Follow-up (US = Ultraschall, CT = Computertomographie) ¹¹⁰

Risiko- profil	Behandlung	6 Monate	1 Jahr	2 Jahre	3 Jahre	4 Jahre	5 Jahre	>5 Jahre
Nie- drig	Nephrektomie/Nierenteilresektion	US	CT	US	CT	US	CT	Entlas- sung
Inter- mediär	Nephrektomie/Nierenteilresektion/Kryo- therapie/Radiofrequenzablation	CT	CT	CT	US	CT	CT	Alle 2 Jahre CT
hoch	Nephrektomie/Nierenteilresektion/Kryo- therapie/Radiofrequenzablation	CT	CT	CT	CT	CT	CT	Alle 2 Jahre CT

Die Einteilung in Risikogruppen erfolgt dabei nach den Kriterien der *University of California Los Angeles* (UCLA), dem sogenannten *UCLA Integrated Staging System* (UISS).¹¹⁰ Dieses Staging System bezieht das TNM-Stadium, den allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten und das Grading des Tumors mit ein. Im Rahmen der Risikostratifizierung wird zudem zwischen Patienten mit lokal begrenztem und metastasiertem RCC unterschieden.¹⁴⁶

1.1.7. Therapie

1.1.7.1. Lokale Therapieformen

Therapie der Wahl im lokal begrenzten Stadium des RCC und einziger kurativer Therapieansatz ist eine operative Entfernung des Tumors. Je nach Tumorausdehnung wird eine Nierenteilresektion oder eine Nephrektomie durchgeführt.⁹⁷ Nach älteren Leitlinien war die Nierenteilresektion lediglich für Patienten mit bilateralem Tumor, solitärer Niere oder hereditären Syndromen eine Option.⁹⁷

Eine Nephrektomie geht jedoch in der Regel mit einer Einschränkung der Nierenfunktion und diese wiederum mit einer erhöhten Gesamtmorbidität einher.¹⁴⁰ Da sich die onkologischen Outcomes von Nierenteilresektion und Nephrektomie nicht unterscheiden, ist somit heutzutage eine Nierenteilresektion Therapie der Wahl.¹¹⁰

So wird nach den aktuellen Leitlinien lediglich bei lokal fortgeschrittenem Tumorwachstum oder ungünstiger Tumorlokalisation eine Nephrektomie empfohlen¹¹⁰, also beispielsweise wenn eine Infiltration der Nebenniere, der Vena renalis oder des perirenal Fettgewebes vorliegt.⁸ Des Weiteren ist eine Nephrektomie indiziert, wenn durch eine Nierenteilresektion eine Verschlechterung des Gesundheitszustands des Patienten zu befürchten wäre.¹¹⁰

Aufgrund besserer bildgebender Verfahren ist die standardmäßige Resektion parakavaler und paraaortaler Lymphknoten sowie der ipsilateralen Nebenniere abhängig von der Ausdehnung des Primärtumors heute obsolet.⁹⁷ So lautet die aktuelle Empfehlung eine Lymphadenektomie oder Adrenalektomie nur bei klinischem oder radiologischem Verdacht auf eine Infiltration oder Metastasierung durchzuführen.¹¹⁰

Obwohl eine Operation die Therapie der Wahl beim RCC darstellt, gewinnen auch interventionelle Techniken zunehmend an Bedeutung, v.a. wenn es um die Behandlung kleiner Zufallsbefunde geht. Dabei waren Methoden wie die Kryotherapie oder Radiofrequenzablation (RFA) zunächst nur Patienten mit einer einzelnen Niere oder zu hohem Operationsrisiko vorbehalten.²⁵

Zunehmend an Bedeutung gewinnt auch das Konzept der *Active Surveillance* im Sinne regelmäßiger Kontrolluntersuchungen insbesondere in Bezug auf kleine, zufällig diagnostizierte renale Raumforderungen.¹⁴⁰ Da die mediane Wachstumsrate von kleinen renalen Raumforderungen normalerweise sehr gering ist⁹¹ und auch das Metastasierungsrisiko bei dieser Tumorgröße sehr gering ist¹²¹, stellt *Active Surveillance* immer häufiger eine Alternative dar. Neben einem kleinen Inzidentalom können ein großes Operationsrisiko oder eine stark begrenzte Lebenserwartung mögliche Indikationen sein.^{25,110}

Somit stellen *Active Surveillance*, Kryotherapie und RFA v.a. bei alten und komorbiden Patienten mit kleinen renalen Raumforderungen eine therapeutische Alternative zur Operation dar. Generell empfohlen werden die minimal-invasiven ablativen Verfahren allerdings nicht, da keine Überlegenheit zur Nierenteilresektion belegt ist.¹¹⁰

1.1.7.2. Systemische Therapie

RCC gelten als sehr strahlen- und chemoresistent, sodass klassische Radio- und Chemotherapien keinen Effekt zeigen.⁹⁷ Nach kompletter Resektion eines lokalisierten Tumors sollte, außer im Rahmen von kontrollierten klinischen Studien, keine adjuvante Therapie erfolgen.^{8,110} Auch systemische Therapeutika im Sinne einer zielgerichteten Therapie oder einer Immuntherapie haben adjuvant nach Tumorresektion mit kurativer Intention keine Verbesserung des Gesamtüberlebens gezeigt.⁸

Im Gegensatz dazu hat die systemische Immuntherapie und eine zielgerichtete Therapie im palliativen Setting einen großen Stellenwert.

Im Rahmen der Immuntherapie zeigt die Behandlung mit Zytokinen wie Interleukin-2 (IL-2)⁴³ oder Interferon (IFN)^{54,111}, in der Regel IFN α , vergleichsweise gute Ansprechraten.^{8,43}

Unter anderem aufgrund der schweren Nebenwirkungen einer IL-2-Therapie⁹⁷ und der zeitlich limitierten Wirksamkeit von IFN⁴⁰ wird in der aktuellen S3-Leitlinie jedoch von einer alleinigen Zytokintherapie basierend auf subkutanem IL-2 oder IFN beim mRCC abgeraten.⁷⁷ So ist seit 2006 im Rahmen der palliativen Systemtherapie die Behandlung mit sogenannten zielgerichteten Therapeutika Standard. Aktuell sind 10 Medikamente von der *European Medicines Agency* (EMA) und der *US Food and Drug Administration* (FDA) für die zielgerichtete Therapie von mRCC zugelassen. Dazu gehören die Multikinaseinhibitoren Sunitinib, Sorafenib, Pazopanib, Lenvatinib, Cabozantinib und Axitinib, der anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab, die mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus und der Checkpoint-Inhibitor Nivolumab.^{25,110}

Einen graphischen Überblick über einige verfügbare zielgerichteten Therapeutika und ihre Angriffspunkte bietet **Abbildung 2**.

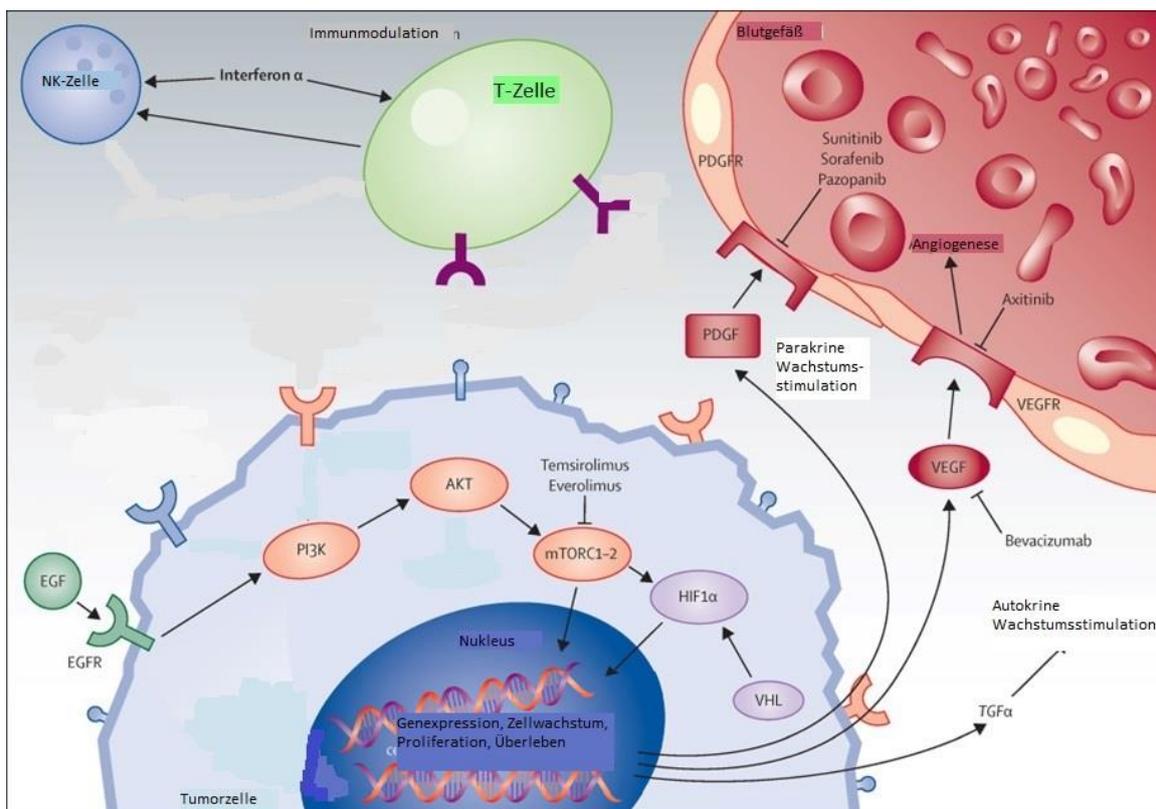


Abbildung 2: Überblick über die Signalkaskaden im Rahmen der Pathogenese von RCC und Angriffspunkte einiger zugelassener zielgerichteter Therapien; nach Captanio et al.²⁵

Die aktuellen Therapieempfehlungen gehen aus **Tabelle 3** hervor. Die Risikostratifizierung bei mRCC erfolgt nach den Motzer-Kriterien, die im Abschnitt 2.1 erläutert werden.

Tabelle 3: Therapieempfehlungen gemäß der S3-Leitlinien bei mRCC⁷⁷; (MSKCC = Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Näheres siehe Abschnitt 2.1)

MSKCC-Risikogruppe	Erstlinientherapie	Option zur Erstlinientherapie	Zweitlinientherapie
Günstig / intermediär	Sunitinib Pazopanib Bevacizumab + IFN	Hochdosiertes IL-2	Nach VEGF-Inhibitor: Everolimus Nach Zytokinen: Axitinib Nach Sunitinib: Axitinib, Everolimus
Schlecht	Temsirolimus	Pazopanib, Sunitinib	Nach Temsirolimus: Axitinib, Pazopanib, Sorafenib, Sunitinib

Während die beschriebenen systemischen Therapien beim mRCC gut etabliert sind, konnte bisher weder für die Immuntherapie noch für die zielgerichtete Therapie eine Wirkung auf das Gesamtüberleben gezeigt werden, wenn sie im Rahmen einer adjuvanten Therapie nach Nephrektomie oder Nierenteilresektion mit kurativer Intention appliziert wurden. Somit wird in den aktuellen Leitlinien der EAU keine adjuvante Therapie empfohlen.¹¹⁰

Im palliativen Setting konnte gezeigt werden, dass eine vorherige Operation zur Zytoreduktion die Wirksamkeit der Immuntherapie verbessert.³⁹ Hiermit einhergehend empfehlen auch Atkins et al. vor Applikation einer Systemtherapie bei mRCC eine zytoreduktive Operation des Primärtumors durchzuführen, sofern eine Reduktion von 75% möglich ist und keine symptomatischen Fernmetastasen vorliegen.⁸

Aufgrund der Strahlen- und Chemoresistenz renaler Karzinome gibt es Ansätze operable Metastasen chirurgisch zu reseziieren. Dabei konnte in mehreren Studien ein verlängertes Gesamtüberleben beobachtet werden, wenn die Metastasen komplett reseziert werden konnten.^{6,50,107} Jedoch weisen die Studien eine eingeschränkte Qualität auf, sodass eine Metastasektomie in den aktuellen Leitlinien der EAU nicht generell empfohlen wird. Stattdessen sollte der Allgemeinzustand des Patienten, das Risikoprofil und der Patientenwunsch in die Entscheidung für oder gegen eine Metastasektomie miteinbezogen werden.¹¹⁰ Bei ausgewählten Patienten mit resektablem Primärtumor und einer einzelnen resektablen Metastase kann eine Metastasenresektion plus Nephrektomie einen kurativen Ansatz darstellen.⁸

Obwohl RCC generell als strahlenresistent gelten, wird zum Teil in palliativer Intention eine Bestrahlung einzelner Metastasen durchgeführt. Für eine Strahlentherapie kommen insbesondere zerebrale und ossäre Metastasen in Betracht. Zudem findet die Bestrahlung Anwendung bei schmerzhaften Lokalrezidiven.⁸

1.1.8. Prognose

Die Prognose ist maßgeblich vom Tumorstadium abhängig. Während lokalisierte RCC in der Regel mit einer guten Prognose einhergehen, sind generalisierte Erkrankungen prinzipiell unheilbar.⁹⁷

Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen bereits 16% der Patienten Metastasen in den regionären Lymphknoten auf.⁵² Da RCC auch früh zur Infiltration von Blutgefäßen wie beispielsweise der Vena renalis oder der Vena cava neigen, kommt es im Verlauf auch frühzeitig zur hämatogenen Metastasierung. So haben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits 16% der Patienten Fernmetastasen und sind somit im IUCC-Stadium IV.⁵²

Die hämatogene Metastasierung von RCC erfolgt bevorzugt in Lunge, Knochen, Leber und Gehirn.¹ Weitere häufige Lokalisationen sind die Nebennieren und die kontralaterale Niere.¹⁷

Wird ein RCC erst im Stadium IV diagnostiziert, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 11,7%.⁵² Zur Verbesserung der Überlebensrate nach Metastasenresektion sind die Daten uneinheitlich. Während manche Autoren nach Metastasenresektion eine Verbesserung des Gesamtüberlebens beobachtet haben^{35,62}, konnten Thomas et al. zumindest in Bezug auf sarkomatoid entdifferenzierte Karzinommetastasen keinen Vorteil zeigen.¹⁴³

Patienten mit Befall der lokalen Lymphknoten haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 65,4%.⁵² Im lokalisierten Stadium eines RCC haben die Patienten eine 5-Jahres-Überlebensrate von 92,5%.⁵²

Neben dem Tumorstadium sind das Grading und der physische Zustand des Patienten (*Performance Status* nach ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) oder Karnowsky-Index) wichtige prognostische Faktoren.⁹⁷

In allen histologischen Subtypen des RCC kann es zur sarkomatoiden Differenzierung kommen. Sarkomatoid aussehende, spindelförmige Tumorzellen sprechen für ein höheres Grading und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert.^{28,93,105,131,145}

Trotz steigender Inzidenz bleibt die Anzahl der Todesfälle weitestgehend konstant.^{34,52} Dies ist vor allem auf die steigenden Überlebensraten bzw. sinkende Mortalitätsraten

zurückzuführen. So hat sich die stadienunabhängige 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland von unter 50% in den 1980er Jahren auf 67% im Jahr 2004 verbessert.³⁴

1.2. MUC1

1.2.1. Physiologie MUC1

Mucine sind Glykoproteine mit hohem Molekulargewicht (bis zu 4200kDa)⁷⁴, die hauptsächlich von epithelialen Zellen synthetisiert werden.²⁶ Man unterscheidet sekretorische Mucine und membran-assoziierte Mucine.⁷⁴ Die sekretorischen Mucine sind Hauptbestandteil von Schleim (Mucus).⁷⁸ Dieser verhindert, dass Mikroorganismen das Epithel erreichen und in den Organismus eindringen. Membran-assoziierte Mucine spielen wie die sezernierten Mucine eine Rolle in der Protektion der epithelialen Zellen. Darüber hinaus können sie über zelluläre Signalkaskaden das Wachstum und Überleben von Epithelzellen unterstützen.⁷⁰ In diesem Zusammenhang fungieren Transmembranmucine als Sensoren der extrazellulären Umgebung. Dies kann entweder über einen an der Extrazellulärdomäne bindenden Liganden oder über Konformationsänderungen durch eine Veränderung der biochemischen Bedingungen, wie beispielsweise pH oder Ionenzusammensetzung, geschehen. Signale können dann über post-translationale Veränderungen in das Zellinnere übertragen werden.¹³⁵

Bei MUC1 handelt es sich um ein Transmembranmucin, welches als einzelnes Polypeptid translatiert und dann durch *Autocleavage* in eine N-terminale (MUC1-N) und eine C-terminale (MUC1-C) Untereinheit gespalten wird. Die Untereinheiten werden anschließend über eine nicht-kovalente Bindung verbunden und bilden so einen Heterodimer.^{26,71}

MUC1-C besteht aus einer kurzen extrazellulären Domäne, einer transmembranösen Domäne und einem zytoplasmatischen Schwanz (MUC1 *cytoplasmatic tail* = MUC1-CT).²⁶

MUC1-N ist physiologischerweise extrazellulär lokalisiert und besteht u.a. aus 20-200 *Tandem Repeats*, welche zu einem Großteil aus den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin bestehen.²⁶ An diesen Aminosäuren wird das Protein stark O-glykosyliert, sodass die Extrazellulärdomäne mit ihren Kohlenhydratketten 200 bis 500nm von der Zelloberfläche absteht.²⁰

MUC1 findet man physiologischerweise auf der apikalen Seite von fast allen Epithelzellen von Drüsen und Gängen. In der Niere hat man MUC1 im Bereich der luminalen Oberfläche der Zellen der distalen Tubuli und der Sammelrohre beobachtet.⁷⁴ MUC1 hat vielfältige Funktionen, wobei ein Großteil der Funktionen über MUC1-C bzw. v.a. MUC1-CT vermittelt werden. Obwohl MUC1 selbst keine Kinaseaktivität hat, ist es aufgrund verschiedener Protein-Protein-Interaktionen im Zytoplasma möglich, dass über MUC1 verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden.⁵¹

MUC1-C kann beispielsweise mit Tyrosinkinase-Rezeptoren wie EGFR (*epidermal growth factor receptor*) interagieren und spielt so eine Rolle in der Signaltransduktion.⁷¹ Außerdem kann es in Verbindung mit bestimmten Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 α , β -Catenin oder NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) in den Nukleus translozieren und dort die Transkription bestimmter Targetgene modulieren.⁴⁵ Da MUC1-C selbst keine bekannte DNA- (Desoxyribonukleinsäure-) bindende Domäne hat, geht man davon aus, dass es nicht selbst als Transkriptionsfaktor fungiert, sondern vielmehr die Affinität der Transkriptionsfaktoren zu regulatorischen DNA-Sequenzen reguliert.¹³⁵ MUC1-C fungiert also als Co-Transkriptionsfaktor.⁴⁵

Da MUC1 in verschiedenen weiteren zellulären Signalwegen eine Rolle spielt, wird vermutet, dass MUC1 als Verbindungsstück zwischen zellulären Signalnetzwerken fungiert.¹³⁵ Beispielsweise ist die EGFR-Signalkaskade über MUC1-CT mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg assoziiert: Die Stimulation von EGFR bewirkt die Phosphorylierung von MUC1. Phosphoryliertes MUC1 wiederum steigert die Affinität von MUC1 zu β -Catenin und dem Protein APC (*adenomatous polyposis coli*) aus dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg.⁸⁵ Auch dieser Signalweg reguliert die Expression verschiedener Gene. So wird β -Catenin im Rahmen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs normalerweise ubiquitiniert und abgebaut, sodass es seine Wirkung als Transkriptionsfaktor nicht entfalten kann. Diese Degradation wird beispielsweise durch die Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) und das Protein APC unterstützt. Bindet Wnt, ein sekretiertes Glykoprotein, an den Wnt-Rezeptor, wird die Degradation von β -Catenin verhindert, sodass es zur vermehrten Transkription seiner Targetgene und somit beispielsweise zur vermehrten Expression von Zellzyklus-Regulatoren wie Cyclin D1 und c-myc kommt.⁸

MUC1 kann auch direkt mit verschiedenen Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs interagieren.¹³⁵ Beispielsweise binden MUC1-Homodimere an β -Catenin und stabilisieren dieses, indem sie den Abbau durch GSK-3 β vermittelte

Phosphorylierung hemmen.⁷¹ Außerdem bildet MUC1 im Nukleus mit β -Catenin einen Komplex. Dieser bindet an den Cyclin D1-Promotor und co-aktiviert so die Expression von Cyclin D1.¹¹⁷

Außerdem aktiviert MUC1 den PI3K \rightarrow Akt-Signalweg.⁷¹ Wird die PI3K durch MUC1 aktiviert, kommt es zur Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) und somit zur Entstehung von Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3). Dieses bindet an die Proteinkinase B (Akt), welche dadurch aktiviert wird. Die Akt kann durch Phosphorylierung verschiedenste Prozesse der Zelle aktivieren und inhibieren. Unter anderem wird über die vermehrte Expression des anti-apoptotischen Bcl (*b-cell lymphoma*)-Proteins Bcl-x_L die Apoptose verhindert oder über die Aktivierung von mTOR die Translation verschiedener Proteine gesteigert.¹¹⁴

Auch ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule 1*) interagiert im Rahmen der Signaltransduktion mit MUC1. Es gibt Hinweise, dass über ICAM-1 als Ligand Signale aus dem Extrazellulärraum mittels MUC1 in den Intrazellulärraum übertragen werden.¹¹³

Außerdem wird MUC1 eine Rolle in der Regulation der Zell-Zell-Interaktion zugeschrieben. So kann man beobachten, dass unter MUC1-Überexpression in kultivierten Zellen eine Bildung von Aggregationsverbänden gehemmt wird. Dies wird v.a. darauf zurückgeführt, dass die Zell-Zell-Interaktion durch die große, weit von der Zelloberfläche abstehende Struktur der Mucine beeinträchtigt wird.⁸³ Während die Extrazellulärdomäne von MUC1 mehrere hundert Nanometer aus der Zellmembran herausragt, reichen Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin lediglich ca. 35nm über die Zellmembran hinaus. Somit können die E-Cadherine nicht miteinander interagieren und die Zellkontakte nicht adäquat ausgebildet werden¹⁵², was die Zellmobilität erhöht.⁹

Die Expression von MUC1 selbst wird über mehrere Wege reguliert. Beispielsweise bindet HIF-1 α direkt an den Promoter des MUC1-Gens und induziert so die Transkription von MUC1.⁹

Man geht jedoch davon aus, dass HIF-1 α nicht der einzige Regulator der MUC1-Induktion bei Hypoxie ist. Auch andere Targetgene bei Hypoxie wie VEGF und COX-2 (Cyclooxygenase 2) könnten eine Rolle spielen.⁹ Darüber hinaus wird die MUC1-Expression über den Transkriptionsfaktor STAT1/STAT3, welcher an den MUC1-Promoter bindet, hochreguliert.⁵¹ Auch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor α) und IFN γ ⁷³ sowie Wachstumsfaktoren wie EGF (*epidermal growth factor*) und Heregulin⁷¹ induzieren die MUC1-Expression. Außerdem wird die

MUC1-Expression im Rahmen einer Aktivierung des PI3K -> Akt-Signalwegs hochreguliert.⁷¹

1.2.2. MUC1 und Malignome

MUC1 wurde als Transmembranprotein erstmals aus Mammakarzinomzellen isoliert und geklont⁴⁴, sodass MUC1 in Bezug auf das Mammakarzinom am besten erforscht ist. MUC1, in der Klinik eher bekannt als CA15-3 (*Cancer Antigen 15-3*), wird als etablierter Tumormarker für das Follow-up bei Patientinnen mit Mamma- und auch Ovarialkarzinomen verwendet.⁵¹

Man kann jedoch davon ausgehen, dass viele Erkenntnisse aus der Erforschung von MUC1 in Mammakarzinomen auch auf andere Karzinome übertragbar sind. So wurde eine Überexpression von MUC1-mRNA (*messenger Ribonukleinsäure*) bereits für verschiedene Karzinome, wie z.B. Lunge, Magen, Brust und Prostata beschrieben.⁵⁵

Für die Ursache der Überexpression gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Lacunza et al. sehen eine Gen-Amplifikation als Grundlage der MUC1-Überexpression in Karzinomen.⁷² Weitere Erklärungsansätze gehen eher von einer Autoregulation im Rahmen der Signaltransduktion aus. Wie bereits im Abschnitt 1.2.1 beschrieben, spielt STAT1 als Transkriptionsfaktor in der Regulation der MUC1-Expression eine Rolle. Khodarev et al. haben in diesem Zusammenhang beobachtet, dass die Interaktion zwischen MUC1-C und STAT1 in nicht-malignen Mammazellen durch IFN begünstigt wird. Im Gegensatz dazu ist diese Interaktion in malignen Zellen konstitutiv vorhanden. Dies begünstigt die Expression der Targetgene von STAT1, zu denen auch MUC1 selbst gehört. Somit kommt es zu einer autoaktivierenden Schleife der STAT1/MUC1-Aktivierung.⁶¹

Eine zweite autoregulative Schleife ist über EGFR vermittelt, da die EGFR-Expression ebenfalls über MUC1 reguliert wird. Eine hohe MUC1-Expression verhindert nämlich den Abbau von EGFR.¹⁰⁸ EGFR wiederum stimuliert die MUC1-Transkription indirekt über eine Aktivierung von STAT1/STAT3.^{14,156} Hier spielt also erneut ein positives Feedback eine Rolle in der Hochregulation der MUC1-Expression in Malignomen.⁵¹

Eine weitere autoregulative Schleife wird in Bezug auf MUC1 und RelA, einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B, angenommen: MUC1-C trägt zur Aktivierung der IKK β (I κ B-Kinase) bei. Diese phosphoryliert normalerweise den Inhibitor von NF- κ B, sodass dieser nicht mehr an NF- κ B binden kann und NF- κ B in den Nukleus migrieren kann. Durch die MUC1-vermittelte Aktivierung der I κ B-Kinase

wird NF- κ B also vermindert gehemmt und die entsprechenden Targetgene, darunter auch MUC1, vermehrt exprimiert.⁴ MUC1 selbst hemmt zusätzlich die Bindung von I κ B α (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha*), dem Inhibitor von NF- κ B, an NF- κ B, sodass dieser die Wirkung von NF- κ B ebenfalls nicht adäquat hemmen kann.⁴

Eine vierte autoregulative Schleife läuft über die PI3K -> Akt-Signalkaskade. Während MUC1 einerseits selbst die EGFR-abhängige Aktivierung des PI3K -> Akt-Signalwegs fördert¹¹⁵, ist es andererseits in Malignomen gerade durch die Aktivierung des PI3K -> Akt-Signalwegs und der damit einhergehenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors mTOR hochreguliert.⁷¹

MUC1 als Onkoprotein werden vielfältige Funktionen in der Karzinogenese zugeschrieben, welche u.a. in diversen Tierversuchen erforscht wurden.^{16,38,109,138} Aus diesen Versuchen wurde geschlussfolgert, dass MUC1 als Promoter der Metastasierung fungiert, da eine fehlende MUC1-Expression mit weniger infiltrierenden Zellen, geringeren Metastasierungsraten und damit einhergehend einem erhöhten Gesamtüberleben einherging.^{16,38,109,138}

Außerdem wird MUC1 eine Rolle im Rahmen des Polaritätsverlusts der Tumorzellen und der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) zugeschrieben. In diesem Zusammenhang ist der Einfluss von MUC1 auf die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte von besonderer Bedeutung. Beispielsweise wird die Aggregation der Zellen, wie bereits im Abschnitt 1.2.1 beschrieben, durch die Inhibition von Zell-Zell-Kontakten durch E-Cadherin gehemmt.¹⁵² Zudem hat man bei Zellen mit hoher MUC1-Expression eine reduzierte Interaktion zwischen Integrinen und der Extrazellulärmatrix beobachtet.¹⁵¹ MUC1 fungiert also, indirekt über Hemmung der Zell-Zell-Kontakte, als Anti-Adhäsionsmolekül und begünstigt die Invasion in umliegendes Gewebe.^{66,89}

Wie bereits ausgeführt, führt eine gesteigerte MUC1-Expression zur verlängerten Aktivierung von EGFR, da dieser vermindert abgebaut wird. Auch dies kann pro-metastatische Interaktionen und/oder Regulationen, z.B. von Integrinen und Cadherinen, verursachen. Auch diese können zur Unterbrechung von Zelladhäsionen und Steigerung der Zellmotilität führen. (*reviewed* von Haley et al.⁴⁸) Ebenso konnte im Zusammenhang mit einer MUC1-Überexpression auch eine verminderte Anzahl von *Tight Junctions* beobachtet werden. Auch dies wird wiederum auf eine Interaktion von MUC1 mit EGFR zurückgeführt.¹³⁰

Außerdem ist der Verlust der Zellpolarität durch Überexpression von MUC1 von großer Relevanz für die Invasivität und Metastasierung der Tumorzellen. Wie bereits im Abschnitt 1.2.1 beschrieben, wird MUC1 physiologischerweise v.a. apikal exprimiert. Im Gegensatz dazu ist es bei Tumorzellen diffuser und mit zirkumferenzieller Verteilung exprimiert.⁷⁸ Man geht davon aus, dass dieses aberrante Verteilungsmuster ebenfalls eine Trennung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten begünstigt.^{112,141,151}

Außerdem kommt es durch den Polaritätsverlust der Zellen zur Interaktion zwischen normalerweise apikal lokalisiertem MUC1 und normalerweise basolateral lokalisierten Tyrosinkinase. Somit sind in Tumorzellen beispielsweise MUC1 und EGFR unabhängig von der An- oder Abwesenheit von EGF co-lokalisiert.⁸⁵ Durch die EGFR-vermittelte Phosphorylierung von MUC1 wird die Affinität von MUC1 zu anderen Proteinen wie β -Catenin gesteigert.¹³⁵ Man geht davon aus, dass Tumorzellen die Signalwege ausnutzen, um ihr Überleben zu steigern und Prozesse wie Metastasierung und Invasion zu regulieren.¹³⁵

Auch die Interaktionen von MUC1 und PDGFR β (*platelet derived growth factor receptor β*) werden durch die zirkumferenzielle Expression von MUC1 begünstigt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Interaktionen ebenfalls die Invasivität und Metastasierungsneigung steigern können.¹³⁶

Durch die Überexpression von MUC1 kommt es auch vermehrt zur Internalisierung, sodass MUC1 auch zytoplasmatisch nachgewiesen werden kann.⁷¹ Kumuliert MUC1 intrazellulär, kann es Homodimere bilden, welche dann in den Nukleus oder zur Mitochondrienmembran transportiert werden. Im Nukleus interagiert MUC1 mit Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, STAT1/STAT3 und Era (Östrogenrezeptor α), wodurch die Expression der entsprechenden Targetgene unterstützt wird.⁷⁰ In dieser Rolle als Co-Transkriptionsfaktor ist MUC1 im Rahmen der Karzinogenese relevant, da es v.a. an der Transkription von Genen, die mit Invasion, Angiogenese und Metastasierung assoziiert sind, beteiligt ist.¹² Durch die Lokalisation in der äußeren Mitochondrienmembran hemmt MUC1 die Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs.¹²²

Wie bereits im Abschnitt 1.2.1 ausgeführt, aktiviert MUC1 auch den PI3K \rightarrow Akt-Signalweg. Auch dieser spielt eine Rolle in Wachstum, Überleben und Stoffwechsel von Karzinomzellen³⁶, da über ihn diverse Effektoren für das Wachstum und Überleben von Zellen aktiviert werden.⁷¹ Obwohl die Relevanz der MUC1-induzierten PI3K-Aktivierung noch nicht vollends geklärt ist⁷¹, konnte gezeigt werden, dass eine

Überexpression von MUC1 in Mammakarzinomzellen von DA3-Mäusen zu einer PI3K-abhängigen Wachstumssteigerung führt.⁵¹

Wie bereits erwähnt kommt MUC1 des Weiteren eine Rolle in der EMT zu. So führte in Mammakarzinomzellen von DA-Mäusen die Transfektion mit MUC1 zur EMT. Somit zeigten die Zellen eine veränderte Morphologie, veränderte Signalwege und eine veränderte Expression von epithelialen und mesenchymalen Markern.⁵¹ Diese Transition ist ebenfalls auf die Funktion von MUC1 als Co-Transkriptionsfaktor zurückzuführen, da MUC1 neben den bereits erwähnten Targetgenen auch die Transkription von Genen, die die Transition von epithelialem zu mesenchyalem Gewebe begünstigen, fördert.⁵¹ Genauer zum Zusammenhang zwischen MUC1 und EMT in RCC findet sich in Abschnitt 1.2.3.

MUC1 spielt außerdem eine Rolle in der Immunmodulation. Es wird angenommen, dass membran-gebundene Mucine helfen die Erkennung durch das Immunsystem zu verhindern.⁵⁵ Im Rahmen der MUC1-Überexpression könnten Oberflächenantigene maskiert werden und somit die Immunreaktion gegen die Tumorzellen unterdrückt werden.¹⁰⁰

Zudem gehen Agrawal et al. weiterführend davon aus, dass MUC1 ein Downstream-Effektor der T-Zell-Stimulation ist.^{2,3} Daraus schlussfolgern Singh et al., dass eine Funktion von MUC1 im Rahmen der Aktivierung von Immunzellen mit der Motilitätssteigerung zusammenhängen könnte. Dies könne dann ggf. auch den Zusammenhang zwischen MUC1-Expression und Motilität von Tumorzellen erklären.¹³⁵

Weitere Erklärungsansätze wie MUC1 zu einer gesteigerten Zellmotilität führt, involvieren wiederum diverse Signalkaskaden. So konnte beispielsweise beobachtet werden, dass die Phosphorylierung von MUC1-C über EGFR die Zellmotilität steigert.⁵¹

Auch über die Interaktion zwischen ICAM-1 und MUC1 wird die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen gesteigert. Durch Begünstigung der Interaktion zwischen epithelialen und endothelialen Zellen wird es im Blut zirkulierenden Tumorzellen ermöglicht an das Gefäßendothel zu binden und das Blutgefäß wieder zu verlassen.⁵¹

Wie in Abschnitt 1.2.1 in Bezug auf die physiologischen Funktionen von MUC1 beschrieben, begünstigt MUC1 zudem auch selbst die Angiogenese. Über die Interaktion mit HIF-1 α wird VEGF hochreguliert, was wiederum zur Migration von Endothelzellen und zur Gefäßbildung führt.¹⁵⁸

Außerdem kann MUC1, wie bereits in Abschnitt 1.2.1 erwähnt, direkt an verschiedene Bestandteile des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs binden. Obwohl der Einfluss dieser MUC1-Bindung in diesem Zusammenhang noch nicht abschließend geklärt ist, spielen Interaktionen von MUC1 mit verschiedenen Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs eine Rolle für das karzinogene und metastasenbildende Potenzial verschiedener Karzinomzellen.¹³⁵

1.2.3. MUC1 und RCC

Wie für viele andere Karzinome, konnte auch für RCC eine Überexpression von MUC1 gezeigt werden.

Dabei zeigen die verschiedenen RCC-Subtypen in der Immunhistochemie (IHC) unterschiedliche MUC1-Expressionsmuster. Während chromophobe RCC meist eine diffuse zytoplasmatische MUC1-Expression aufweisen, zeigen papilläre und klarzellige RCC in der Regel eine membranständige MUC1-Expression. Dabei kann diese überwiegend apikal oder zirkumferenziell sein. Zum Teil ist die membranständige MUC1-Expression auch mit einer diffusen zytoplasmatischen Expression kombiniert.⁷⁴ Langner et al. beobachteten in einer Studie kein einziges klarzelliges oder papilläres RCC mit diffuser zytoplasmatischer MUC1-Expression ohne zusätzliche membranöse MUC1-Expression.⁷⁴

Auch im Vergleich zum gesunden Nierenparenchym weisen RCC Unterschiede im Expressionsmuster auf. Während MUC1 im normalen Nierenparenchym immunhistochemisch v.a. apikal in den Zellen der distalen Tubuli und der Sammelrohre nachweisbar ist, zeigt sich in RCC eine heterogene Expression von MUC1.⁷⁸ Dabei ist die MUC1-Expression in den Karzinomzellen überwiegend diffuser und zirkumferenziell verteilt. Die apikale Polarität, die bei den benignen Nierenzellen beobachtet wurde, ist also in den Tumorzellen weitgehend verloren gegangen.⁷⁸

Neben dem Expressionsgrad und Expressionsmuster von MUC1 in RCC existieren auch Studien zur funktionellen Bedeutung von MUC1 in RCC. Beispielsweise konnten Aubert et al. zeigen, dass MUC1 in die Migration und Invasivität von RCC-Zellen unter hypoxischen Bedingungen involviert ist. Dabei haben sie einen Zusammenhang zwischen MUC1-Expression und dem pVHL/HIF-1 α -Signalweg, der wichtigsten Kaskade im Rahmen der Entstehung von RCC, gezeigt.⁹ In normalen Zellen baut pVHL als Genprodukt des VHL-Gens verschiedene Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 α in Gegenwart von Sauerstoff ab. Fehlt pVHL oder Sauerstoff, wird HIF-1 α stabilisiert und

kumuliert. Hierüber wird wiederum die Transkription verschiedener Gene aktiviert, welche in der Tumorentstehung eine Rolle spielen.⁵⁶

HIF-1 α bindet als Transkriptionsfaktor u.a. direkt an den Promoter von MUC1 und induziert die Transkription des Onkoproteins.⁹ Dies geht mit der Beobachtung einher, dass neben MUC1 auch HIF-1 α in RCC überexprimiert ist.⁹

Auch Bouillez et al. brachten MUC1 in RCC-Zellen mit einer gesteigerten Invasivität und Migrationsfähigkeit, sowie mit einer Erhöhung der Lebensfähigkeit, der Apoptoseresistenz und dem Tumorwachstum in Verbindung, da sie die Invasivität von RCC-Zellen durch die Inhibition von MUC1-C mittels GO-203, einem Peptid, das die Dimerisierung von MUC1 und seine nukleäre Translokation hemmt, signifikant reduzieren konnten.¹⁹

Auch die Art der Glykosylierung könnte einen Einfluss auf die Klinik und Pathologie der RCC haben. So kam es bei ccRCC-Patienten, deren MUC1 vermehrt eine modifizierte Glykosylierung aufwies, häufiger zum Tumorprogress mit Rezidiv, Metastasierung oder tumorassoziiertem Tod.⁶⁸

Außerdem konnte eine Korrelation zwischen MUC1-Expression und einer sarkomatoiden Komponente in RCC gezeigt werden. Dabei führte eine Überexpression von MUC1 zur Induktion einer EMT.⁴⁵ Zudem wird angenommen, dass MUC1 die Bindung von β -Catenin an den SNAIL-Promoter moduliert. SNAIL wiederum ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription von E-Cadherin inhibiert. Dies ist durch den Verlust der Zell-Zell-Kontakte ein wichtiger Schritt der EMT.⁴⁵

1.2.4. MUC1 und mRCC

MUC1 wurde von Aubert et al. in mRCC im Vergleich zu nicht-metastasierten ccRCC als signifikant stärker überexprimiert beschrieben.⁹ Dabei zeigt sich die MUC1-Expression bei nicht-metastasierten ccRCC meist auf die Membran beschränkt, während mRCC häufiger eine zytoplasmatische MUC1-Expression zeigen. Diese sei oft auch mit einer zirkumferenziellen membranösen MUC1-Expression kombiniert.⁹

Auch Leroy et al. haben publiziert, dass metastasierende Tumore in der MUC1-IHC mehr gefärbte Zellen aufweisen als nicht-metastasierende Tumore.⁷⁹ Mit zunehmender MUC1-Expression zeigte sich auch ein erhöhtes Risiko für eine Metastasierung, woraus geschlussfolgert wurde, dass MUC1 mit einer Tumorprogression assoziiert ist.⁷⁹

Auch Metastasen von mRCC wurden auf ihre MUC1-Expression untersucht. So haben Leroy et al. durch immunhistochemische Untersuchungen festgestellt, dass 86% der

Metastasen eine MUC1-Expression aufweisen. Dabei war diese zumeist zirkumferenziell membranös und zytoplasmatisch.⁸⁰ In zehn Fällen lag Leroy et al. auch Gewebe der korrespondierenden Primärtumore vor. Davon waren 90% MUC1-positiv.⁸⁰

1.2.5. Diagnostische und prädiktive Rolle von MUC1

Wie bereits im Abschnitt 1.2.2 ausgeführt, ist MUC1 unter dem Namen CA15-3 im Serum als Tumormarker in der Diagnostik und Nachsorge des Mammakarzinoms und des Ovarialkarzinoms etabliert.⁵¹ Zwar konnte eine Überexpression von MUC1 auch für viele andere Tumore gezeigt werden⁵⁵, allerdings findet MUC1 hier im klinischen Alltag bisher keine Anwendung.

Für das Mammakarzinom gilt CA15-3 auch als prognostisch relevant.¹³² Dennoch gibt es Daten, dass MUC1 auch für andere Tumorentitäten von prognostischer Relevanz ist. So wurde eine Überexpression von MUC1 in Tumorzellen in diversen Tumorentitäten mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht. Dies ist beispielsweise bei gastrointestinalen Adenokarzinomen^{10,58,64,76,90,96,147}, ösophagealen Plattenepithelkarzinomen¹²⁸, Adenokarzinomen des Endometriums¹³⁷ und NSCLC (*non small cell lung cancer*)⁴⁶ der Fall.

Auch in Bezug auf ccRCC wird eine vermehrte Expression häufig mit einer schlechteren Prognose und einer vermehrten Metastasierung in Verbindung gebracht.^{68,74,79} Zudem konnte in einigen Studien eine signifikante Korrelation zwischen dem Level der MUC1-Expression und dem Tumorgrading, dem T-Stadium und der Tumorprogression festgestellt werden. Allerdings liegen in diesem Zusammenhang verschiedene Studien mit teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnissen vor.^{41,68,79}

Langner et al. haben keinen Zusammenhang zwischen dem MUC1-Expressionsgrad und dem T-Stadium und Grading zeigen können. Stattdessen wurde ein Zusammenhang zwischen dem MUC1-Expressionsmuster und dem T-Stadium und dem Grading gezeigt.⁷⁴ Während Tumore mit niedrigem pT-Stadium (pT1, pT2) und niedrigem Grading (G1, G2) eher ein apikales membranöses MUC1-Expressionsmuster zeigten, wurde bei Tumoren mit hohem pT-Stadium (pT3) und hohem Grading (G3, G4) vorwiegend ein zirkumferenziell membranöses Expressionsmuster mit oder ohne diffuse zytoplasmatische Expression beobachtet.⁷⁴

Ähnliche Assoziationen zeigten sich auch in anderen Studien.^{68,79} Dieser Unterschied im Expressionsmuster war außerdem mit dem metastasenfrem Überleben assoziiert.⁷⁴

Auch in Bezug auf das Gesamtüberleben konnten Langner et al. ähnliche Ergebnisse zeigen: Die schlechteste Prognose hatten dabei Patienten mit einer zirkumferenziell membranösen MUC1-Expression, die zusätzlich eine zytoplasmatische MUC1-Expression zeigten. Im Gegensatz dazu war die Korrelation mit dem MUC1-Expressionsgrad allenfalls von geringer Signifikanz.⁷⁴

Außerdem korreliert der Grad der MUC1-Expression umgekehrt mit dem postoperativen Überleben nach Tumorresektion.⁴¹

Auch die Metastasierungstendenz korreliert mit der MUC1-Expression. So zeigten Patienten mit Metastasen eine signifikant stärkere MUC1-Expression als Patienten ohne Metastasen.^{9,74,79}

Abgeleitet von diesen Untersuchungsergebnissen, ist MUC1 ein potenzieller prognostischer Marker. Um dies zu verifizieren, bedarf es jedoch weiterer größer angelegter Studien.⁷⁹

1.3. Problem und Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der differentiellen Expressionsmuster von MUC1 in primären ccRCC und ccRCC-Metastasengewebe. Besonderes Augenmerk soll hier auf die Bewertung der tumorbiologischen und prognostischen Relevanz der MUC1-Expression in den unterschiedlichen Geweben fallen. Dabei soll die MUC1-Expression in normalem Nierenparenchym, ccRCC-Gewebe und ccRCC-Metastasengewebe jeweils auf Assoziationen mit klinisch-pathologischen Parametern und dem Gesamtüberleben untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die zytoplasmatische und die membranöse Expression von MUC1 unabhängig voneinander bestimmt und auch ausgewertet, während in anderen Studien zumeist nur die Anzahl der MUC1-positiven und MUC1-negativen Zellen insgesamt bestimmt wurde.

Darüber hinaus soll geprüft werden, ob die MUC1-Expression im Metastasengewebe abhängig von der Lokalisation der Metastasen ist.

Im Hinblick auf die aktuellen Entwicklungen der Systemtherapie mit MUC1 als Angriffspunkt, könnten die Ergebnisse dieser Arbeit die Selektion der Patienten für entsprechende Therapien beeinflussen.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektive

Für das Kollektiv mit primären ccRCC wurden die Daten von Patienten mit verfügbarem Nierengewebe, die zwischen Mai 2007 und April 2010 an der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen aufgrund eines ccRCC komplett oder partiell nephrektomiert wurden, gesammelt.

Für das Kollektiv der ccRCC-Metastasen wurden Patientendaten von Patienten gesammelt, die sich zwischen September 1990 und Juni 2011 an der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen einer Metastasenresektion bei metastasiertem ccRCC unterzogen haben.

Für beide Kollektive wurden die klinischen und pathologischen Daten in einer Datenbank erfasst. Hierzu gehörten folgende Daten:

- Alter
- OP-Datum, OP-Dauer
- Tumorausdehnung (T-Stadium, Fettgewebsinfiltration (pelvin, perirenal), Kapselinfiltration, Infiltration der Nebennieren)
- Regionäre Lymphknotenmetastasen
- Fernmetastasen (Lokalisation)
- Resektionsstatus
- Veneninvasion
- Grading nach Fuhrmann
- Tumordurchmesser
- Tumorlokalisation (rechts, links, beidseits)
- Tumormorphologie (Nekrose, sarkomatoide Differenzierung)
- Rezidiv (metachron, synchron, Datum des Auftretens)
- Follow-up (letztes follow-up, Todesdatum, RCC-abhängiger Tod)
- Körpergröße, Körpergewicht
- Diabetes mellitus (insulinpflichtig ja/nein, nüchtern BZ)
- Präoperative Laborwerte (Leukozyten, Hb, Thrombozyten, Kreatinin, Harnstoff, LDH, Calcium, CRP, GOT, GPT, GGT, AP)

- Glukosurie, Proteinurie
- Karnowsky *Performance Status*
- Nikotin
- Alkohol
- Hyperlipidämie
- ASA-Risikoklassifikation
- MSKCC-Score (Motzer-Kriterien, siehe unten)
- OP-Verfahren (Nephrektomie, Nierenteilresektion, offen-lumbal, offen-abdominal, laparoskopisch)

Die Motzer-Kriterien wurden vom *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (MSKCC) entwickelt und erlauben eine Risikostratifizierung von Patienten mit mRCC.¹¹⁰ **Tabelle 4** zeigt die Motzer-Kriterien.

Tabelle 4: Motzer Kriterien (modifiziert nach Powles et al.¹¹⁰)

Risikofaktor	Grenzwert
Karnofsky-Index	<80%
Zeit zwischen Diagnose und Therapiebeginn	<12 Monate
Hämoglobin	<unterer Grenzwert des laborspezifischen Referenzbereichs
LDH	>1,5-faches des oberen Grenzwerts des laborspezifischen Referenzbereichs
Korrigiertes Serumcalcium	>10,0mg/dl (2,4mmol/L)

Ein niedriges Risiko besteht sofern kein Risikofaktor vorliegt. Ein intermediäres Risiko besteht bei Vorliegen von ein oder zwei Risikofaktoren und ein hohes Risiko beim Vorliegen von drei oder mehr Risikofaktoren.⁹⁵

Nach Überprüfung des vorgeschlagenen Studiendesigns stimmte die Ethikkommission der Universität Tübingen den geplanten Untersuchungen zu (078/2012B02).

2.2. Untersuchungsmaterial

Die Operationsresektate wurden in Paraffin fixiert und im Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie in Tübingen gelagert. Die Paraffinblöcke mit Nierengewebe der Studienteilnehmer wurden aus dem Archiv herausgesucht. Insgesamt

konnten 90 Patienten mit RCC-Metastasen und 61 Patienten mit primären ccRCC in die Studie einbezogen werden.

Da bei den Patienten im Metastasen-Kollektiv zum Teil mehrere Metastasen reseziert wurden, umfasste dieses Kollektiv letztendlich 151 Metastasen.

Im Rahmen der klinischen Diagnostik wurden bereits Schnitte in Hämatoxylin-Eosin-(HE-) Färbung zu den Blöcken angefertigt, welche ebenfalls im Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie in Tübingen gelagert werden. Die Schnitte wurden mikroskopiert und pro Patient wurden zwei Areale mit Tumorgewebe markiert. Für das Kollektiv mit ccRCC-Primärtumoren wurde, wenn vorhanden, zusätzlich je ein Areal mit benignem Nierenparenchym markiert.

Fragliche Befunde wurden durch den Pathologen Dr. Marcus Scharpf kontrolliert und verifiziert bzw. revidiert. Anschließend wurden Tissue Micro Arrays erstellt.

2.3. Tissue Micro Array (TMA)

Dieses Verfahren wurde bereits 1998 von Kononen et al. als Möglichkeit für einen hohen Durchsatz bei der Gewebeuntersuchung beschrieben.⁶⁷

Zur Erstellung eines TMA werden zylinderförmige Stanzen aus Gewebeproben in Paraffinblöcken, den sogenannten *donor*-Blöcken, entnommen und auf einen sogenannten *recipient*-Paraffinblock übertragen. Nach Übertragung aller Gewebezylinder in den *recipient*-Block wird dieser für 10-20 Minuten im Wärmeschrank inkubiert, sodass die Gewebezylinder fest im Paraffinblock eingeschmolzen sind und die Stabilität für das Schneiden mit dem Mikrotom zur Herstellung der Schnitte gewährleistet ist.

Je nach Zylinderdurchmesser, Zylinderabstand und Gerät können so unterschiedlich viele Gewebeproben gleichzeitig gefärbt und ausgewertet werden. Abhängig von den Gewebeeigenschaften können so bis zu 1000 Gewebeproben auf einen *recipient*-Block übertragen werden und simultan untersucht werden.⁹² Da alle Zylinder eines Paraffinblocks parallel immunhistochemisch gefärbt werden, spielen Unterschiede in der Färbequalität oder leichte Abweichungen in der Verarbeitung keine Rolle.⁹²

Für die vorliegende Arbeit wurde das manuelle TMA-Gerät MTA I von Beecher Instruments (Silver Springs, USA) aus dem urologischen Labor des Universitätsklinikums Tübingen verwendet. Dabei wurden Stanzen mit 1mm

Durchmesser in einem Mittelpunkt-zu-Mittelpunkt-Abstand von 2mm eingebracht. In **Abbildung 3** sieht man das manuelle TMA-Gerät aus dem urologischen Labor mit einem *recipient*-Block des Primärtumor-Kollektivs dieser Arbeit.

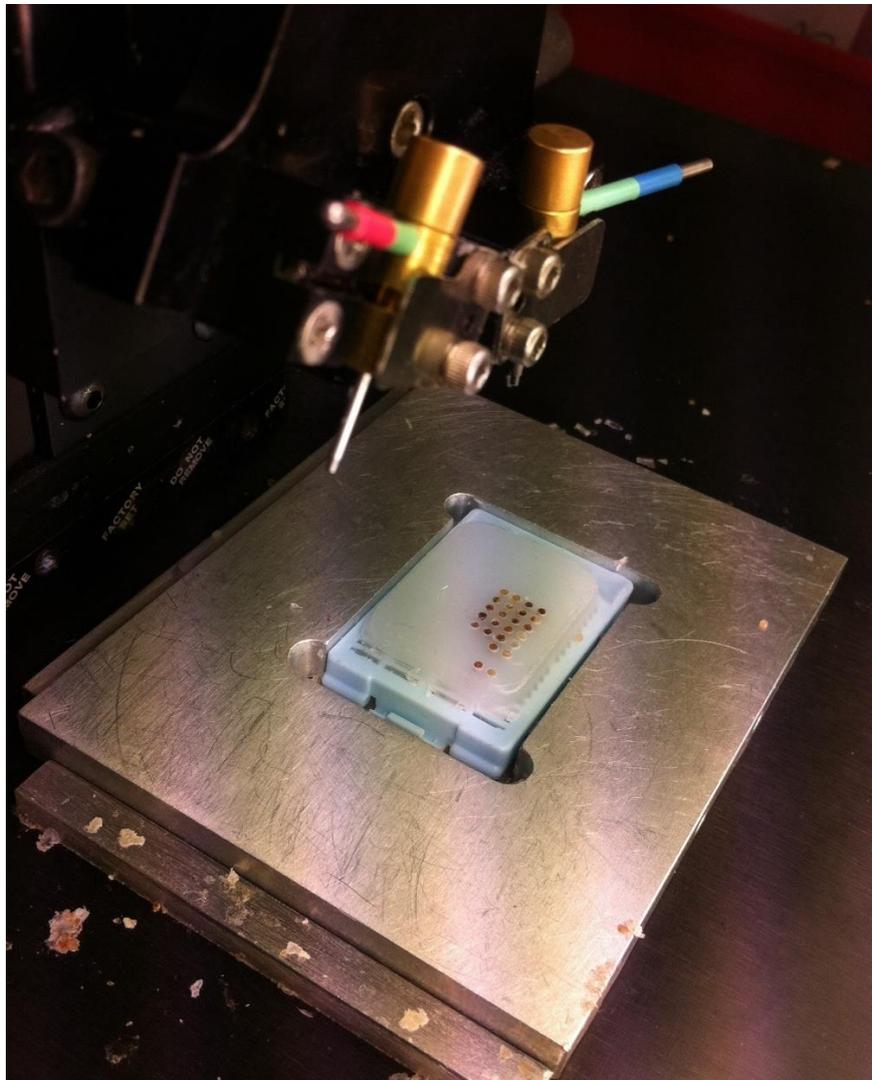


Abbildung 3: TMA-Gerät im urologischen Labor der Universitätsklinik Tübingen mit einem *recipient*-Block

Aus dem Patientenkollektiv mit primären ccRCC wurden pro Primärtumor zwei Stenzen auf den *recipient*-Block übertragen. Zum Vergleich konnte von 50 Patienten aus diesem Kollektiv eine korrespondierende Gewebestanze aus dem gesunden Nierengewebe entnommen und ebenfalls auf den *recipient*-Block übertragen werden. Pro Patient aus dem Kollektiv der primären ccRCC wurden somit insgesamt drei Gewebezylinder auf den *recipient*-Block übertragen. Eine Ausnahme bilden hier beispielsweise Patienten mit besonders kleinen Tumoren und die Patienten, für die kein benignes Nierenparenchym zur Verfügung stand. Aufgrund der geringen Menge an Gewebe, wurden hier zum Teil weniger Stenzen pro Patient angefertigt. Um eine

korrekte Zuordnung von Stanzzylinder und Patient zu gewährleisten, wurden zur besseren Orientierung zum Teil Schweinemuskelproben in den *recipient*-Paraffinblock übertragen.

Für das Patientenkollektiv der mRCC wurden aus jedem Metastasenresektat zwei Gewebestanden entnommen und auf einen *recipient*-Block übertragen. Abhängig von der Anzahl der resezierten Metastasen finden sich also unterschiedlich viele *Dots* pro Patient aus diesem Kollektiv im *recipient*-Block.

2.4. Immunhistochemie (IHC)

Immunhistochemische Analysen sind der Goldstandard für die Untersuchung von Proteinexpression in-situ. Im Rahmen einer immunhistochemischen Untersuchung wird das zu untersuchende Protein zunächst mit einem ersten Antikörper markiert. In einem zweiten Schritt wird dann ein zweiter Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, verwendet. Dieser ist markiert, sodass die Proteinexpression indirekt verdeutlicht wird. Für die Markierung des zweiten Antikörpers kann man beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe nutzen, sodass die Proteinexpression visualisiert werden kann.¹³⁴

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die immunhistochemischen Färbungen maschinell am Institut für Pathologie und Neuropathologie an der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt. Dafür wurde der Färbeautomat Benchmark XT (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) verwendet. In dem Färbeautomaten laufen alle Arbeitsschritte maschinell und standardisiert ab.

Zunächst wurden die Proben zur Entparaffinierung mit EZ Prep™ (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) als Lösungsmittel-freies Agens auf 60°C erhitzt.

Um gleichmäßige Reaktionsbedingungen zu gewährleisten, trägt die Färbemaschine automatisiert eine Pufferlösung auf die Objektträger auf. In diesem Fall wurde Cell Conditioner 1™ (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) auf die Objektträger aufgetragen. Hierbei handelt es sich um eine Tris/Borat/EDTA (*ethylene diamine tetraacetic acid*)-Lösung mit einem pH-Wert von 8,4. Durch die Applikation des Cell Conditioner 1™ wird zudem die Immunreaktion zwischen Primär-Antikörper und Zielantigen verbessert, da die Antigene demaskiert werden. Nach der Applikation des Cell Conditioner 1™ wurden die Gewebeproben über 60 Minuten bei 60°C inkubiert.

Um ein Verdunsten der Pufferlösung und der weiteren Agenzien zu verhindern, wurde zuvor automatisiert ein Ultra LCSTM-Liquid Coverslip (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) aufgetragen. Hierbei handelt es sich um ein aliphatisches Öl, welches einerseits das Austrocknen der Reagenzien verhindert und andererseits durchlässig ist für weitere im Verlauf applizierte Reagenzien.

Anschließend wurden die Antikörper aufgetragen. Als primärer Antikörper, der gegen MUC1 gerichtet ist, wurde der Antikörper Ma695 (NovocastraTM, Produkt Code: NCL-MUC-1, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Dieser wurde im Verhältnis 1:300 mit der kommerziellen Verdünnungslösung Antibody Diluent Grün (Dako, Glostrup, Dänemark) verdünnt.

Als sekundäre Antikörper wurden standardmäßig biotinillierte Immunglobuline von Maus und Kaninchen aus dem iView DAB Detection Kit (Roche, Basel, Schweiz) verwendet. Diese wurden automatisiert für 8 Minuten vom Färbeautomaten inkubiert.

Anschließend fügte der Färbeautomat automatisiert die weiteren Reagenzien zum Nachweis von MUC1 aus dem iView DAB Detection Kit hinzu. So wurde in einem nächsten Schritt die iView Avidin *Horseradish* Peroxidase (Avidin HRPO) hinzugefügt. Dieses Enzym bindet mit hoher Affinität an das Biotin der sekundären Antikörper. Nach weiteren 8 Minuten Inkubationszeit hat der Färbeautomat dann Chromogen als Farbstoff hinzugefügt. Nachdem auch hier 8 Minuten inkubiert worden war, hat der Färbeautomat iView H₂O₂ als Substrat der Avidin HRPO hinzugefügt. Nach erneuten 8 Minuten Inkubationszeit hat der Färbeautomat noch iView Copper hinzugefügt, um die Färbung zu verstärken. Die Gegenfärbung wurde mit Gill's Hämatoxylin durchgeführt. Dieses wird im Institut für Pathologie und Neuropathologie in Tübingen selbst hergestellt und wurde 4 Minuten inkubiert.

Nach Beendigung der Färbeprozesse wurden die Objektträger zunächst in Spülmittel geschwenkt und dann unter fließendem Wasser abgespült. Anschließend wurden sie mit destilliertem Wasser abgespült und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70-100%-igem Ethanol behandelt. Danach wurden die Objektträger in Xylol gebadet um auch den Rest des H₂O zu entfernen. Abschließend wurden die Proben mit Cytoseal (Thermo Scientific, Waltham, USA) eingedeckt.

Da der Antikörper am Institut für Pathologie und Neuropathologie in Tübingen standardisiert und routinemäßig verwendet wird, wurden keine gesonderten Färbungen für die Positiv- und die Negativkontrolle durchgeführt. Stattdessen konnte die Färbespezifität anhand interner Kontrollen überprüft werden.

2.5. Auswertung TMA

Zur digitalen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden die MUC1-gefärbten Objektträger mit dem Leica Slide Scanner SCN400 (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) eingescannt. Mit der Software ImageScope Aperio ePathology (Leico Biosystems, Wetzlar, Deutschland) konnten die Scans dann am Computerbildschirm betrachtet werden.

Für die semi-quantitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten TMAs, wurden die verschiedenen Färbeintensitäten zunächst skaliert (0=ungefärbt, 1=leicht gefärbt, 2=mäßig gefärbt, 3=stark gefärbt). Die verschiedenen Intensitäten zeigen **Abbildung 4** für die Intensitäten der zytoplasmatischen Färbungen und **Abbildung 5** für die Intensitäten der membranösen Färbungen.

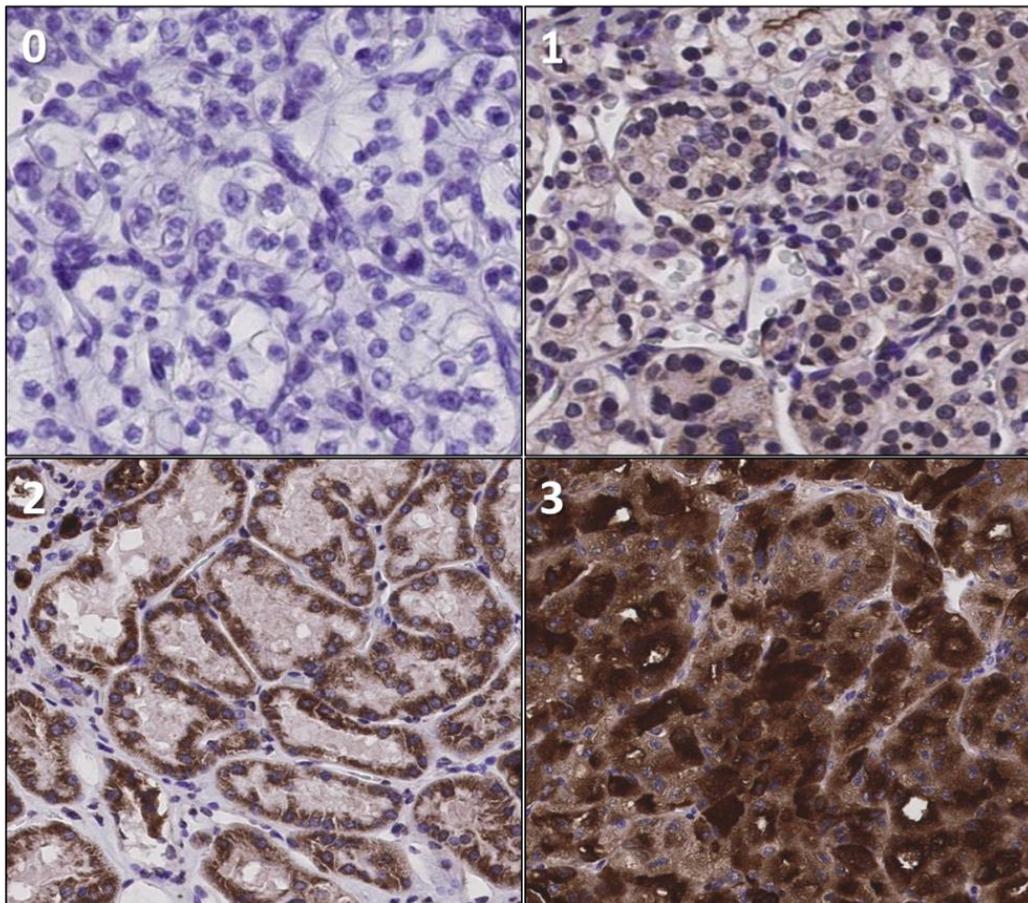


Abbildung 4: zytoplasmatische MUC1-Expression mit Skalierung der Intensitäten (0 bis 3) (200fache Vergrößerung)

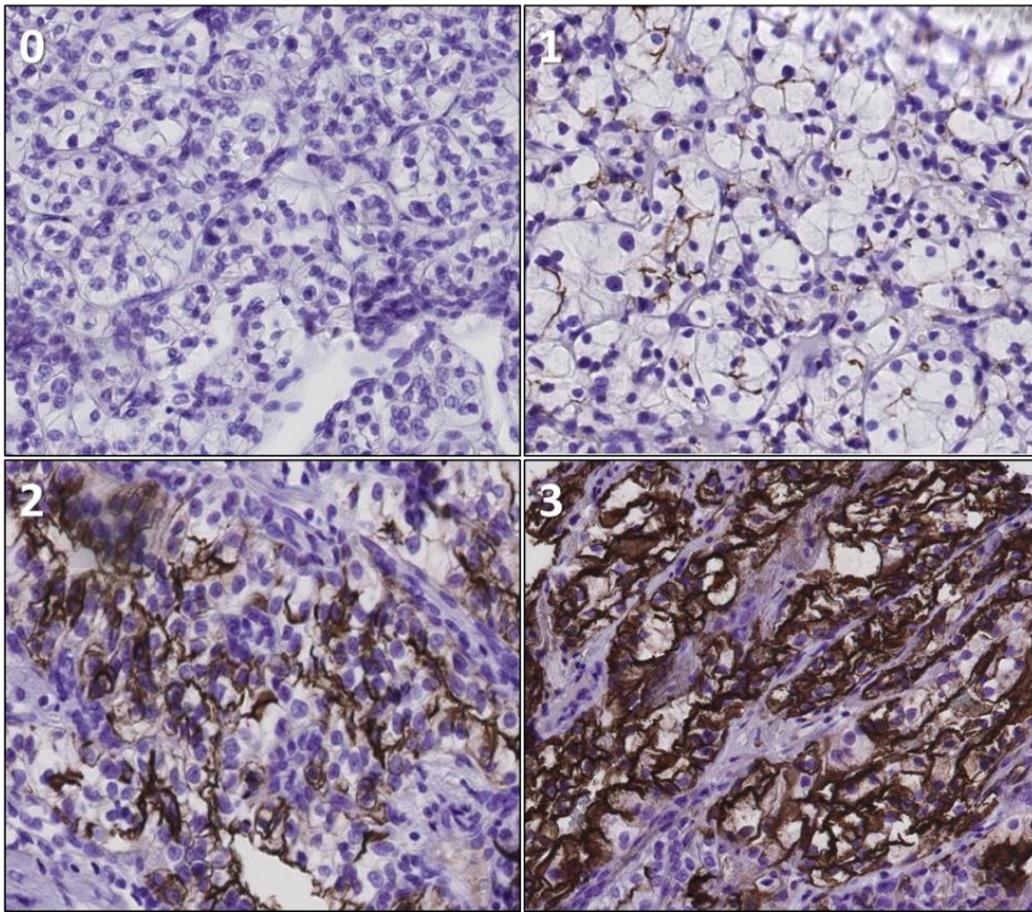


Abbildung 5: membranöse MUC1-Expression mit Skalierung der Intensitäten (0 bis 3) (200fache Vergrößerung)

Anschließend wurden für jede Probe jeweils der Anteil der zytoplasmatisch gefärbten und der Anteil der membranös gefärbten Zellen in einem zuvor markierten Referenzareal ausgezählt. Diese Auszählung haben Dr. Steffen Rausch und cand. med. Johanna Beermann unabhängig voneinander zweimal verblindet vorgenommen. Bei größeren Abweichungen wurde die Auszählung erneut kontrolliert.

Aus dem Anteil der gefärbten Zellen und der Intensität der Färbung konnte dann durch Multiplikation jeweils der IR-Score (*immunohistochemistry reactivity score*, IRS) für die zytoplasmatische und die membranöse Färbung berechnet werden.

Die berechneten IR-Scores wurden zu den korrespondierenden Patienten in die Datentabelle übertragen.

Somit konnten die aus der immunhistochemischen Färbung ermittelten Scores mit den im Abschnitt 2.1 beschriebenen klinischen Daten verglichen werden.

2.6. Statistische Analysen

2.6.1. Klinische Daten

Die klinischen Daten, die aus dem Krankenhaus-Informationssystem ISH der Universitätsklinik Tübingen erhoben wurden, wurden soweit möglich kategorialisiert. Im Rahmen der Erhebung des Follow-ups wurden die Patienten telefonisch kontaktiert und das Datum des Telefonkontakts notiert. Bei Patienten, die telefonisch nicht zu erreichen waren, wurde der aktuellste Klinikkontakt aus dem ISH als Datum des letzten Follow-ups übernommen.

2.6.2. Immunhistochemie

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurde für alle Proben der IR-Score als Produkt des Intensitätsgrads (0 bis 3) und dem relativen Anteil der gefärbten Zellen (0,0 bis 1,0) berechnet. So ergibt sich beispielsweise für eine Gewebeprobe, bei der 70% der Zellen mäßig gefärbt sind ein IR-Score von $0,7 \times 2 = 1,4$.

Bei dem Metastasenkollektiv wurde für jede Metastase aus den mindestens zwei *Dots*, die pro Metastase auf den TMA übertragen wurden, jeweils der arithmetische Mittelwert der Färbeintensitäten, der relativen Anteile der gefärbten Zellen und der IR-Scores berechnet. Außerdem wurden bei diesem Kollektiv jeweils die entsprechenden Mittelwerte aller Metastasen eines Patienten berechnet.

Lagen innerhalb einer Gewebeprobe Färbungen unterschiedlicher Intensitäten vor, wurde die Intensität, in der die meisten Zellen gefärbt waren, für die weitere Analyse verwendet.

2.6.3. Tests und Software

Die statistischen Berechnungen für diese Arbeit wurden mit dem Statistikprogramm MedCalc (Version 12.5, Ostend, Belgien) durchgeführt.

Zum Vergleich der MUC1-Expression zwischen den ccRCC-Metastasen, primären ccRCC und normalem Nierenparenchym wurde eine Varianzanalyse mittels einer Kruskal-Wallis-Analyse als post-hoc-Test durchgeführt. Korrelationen zwischen kategorialen Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test geprüft.

Um Überlebensraten in Abhängigkeit von einer hohen oder niedrigen MUC1-Expression darzustellen, wurden Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt. Dabei wurde eine hohe MUC1-Expression als größer dem medianen MUC1-Färbescore und eine

niedrige MUC1-Expression als kleiner/gleich dem medianen MUC1-Färbescore definiert. Unterschiede im Gesamtüberleben zwischen den Patientenkollektiven wurden mittels Log-rank-Test evaluiert. Zum Vergleich der Expressionsgrade und zur Analyse möglicher Korrelationen von zytoplasmatischer und membranröser Expression von MUC1 erfolgten lineare Regressionsanalysen.

Um die Korrelation zwischen klinischen Parametern und dem Gesamtüberleben zu untersuchen, wurden univariate und multivariate Cox-Regressions-Analysen durchgeführt.

Bei allen Tests wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant definiert.

3. Ergebnisse

3.1. RCC-Kollektiv

3.1.1. Patientenkollektiv und klinische Parameter

Das Kollektiv der ccRCC-Primärtumore umfasste 61 Patienten. Im Durchschnitt hatten die Patienten in diesem Kollektiv zum Zeitpunkt der Diagnose ein Alter von 64,2 Jahren. Dabei waren 55,7% der Patienten männlich und 44,3% der Patienten weiblich.

Von den Patienten in diesem Kollektiv hatten 54,1% eine ccRCC-Erkrankung im T1-Stadium. Nur 9,8% der Tumore waren im Stadium T2 und 36,1% im Stadium T3. Dabei variierten die Tumorgrößen zwischen 1,4cm und 16,0cm.

19,7% der Patienten waren zum Zeitpunkt der Datenauswertung bereits verstorben.

Weitere Charakteristika des Patientenkollektivs finden sich in **Tabelle 5**.

Tabelle 5: Charakteristika der Patienten mit ccRCC-Primärtumor (KI = Konfidenzintervall)

Charakteristika der Patienten mit ccRCC-Primärtumor			
		n	%
Geschlecht	Männlich	34	55,7%
	Weiblich	27	44,3%
Alter (in Jahren) zum Diagnosezeitpunkt des primären ccRCC	Median (Range)	64,18	35,7 bis 87,9
T	1a	17	27,9%
	1b	16	26,2%
	2a	5	8,2%
	2b	1	1,6%
	3a	10	16,4%
	3b	12	19,7%
Grading	G1	14	23,0%
	G2	39	63,9%
	G3/G4	8	13,1%
Lymphknotenstatus	Negativ	56	91,8%
	Positiv	5	8,2%
Metastasenstatus	Negativ	54	88,5%
	Positiv	7	11,5%
Resektionsrand	Negativ	57	93,4%
	Positiv	4	6,6%
Sarkomatoide Differenzierung	Nein	58	95,1%
	Ja	3	4,9%
Tumornekrose	Nein	53	86,9%
	Ja	8	13,1%
Tumorgröße Primärtumor (cm)	Median (Range)	5,5	1,4 bis 16,0
Follow-up Zeit (Monate) ab dem Datum der Erstdiagnose des primären ccRCC	Median (95% KI)	53,30	46,4 bis 56,9
Tod	Nein	49	80,3%
	Ja	12	19,7%

3.1.2. Immunhistochemie

Das benigne Nierenparenchym zeigte sich überwiegend schwach bis nicht MUC1-positiv. Lediglich im Bereich der distalen Tubuli und der Sammelrohre zeigte sich eine zytoplasmatische Anfärbung unterschiedlicher Intensität und eine meist prominente membranöse, apikal lokalisierte Expression von MUC1.

Die **Abbildungen 6 bis 9** zeigen Beispiele für die verschiedenen Intensitäten der zytoplasmatischen Färbung in benignem Nierenparenchym in 200-facher Vergrößerung.

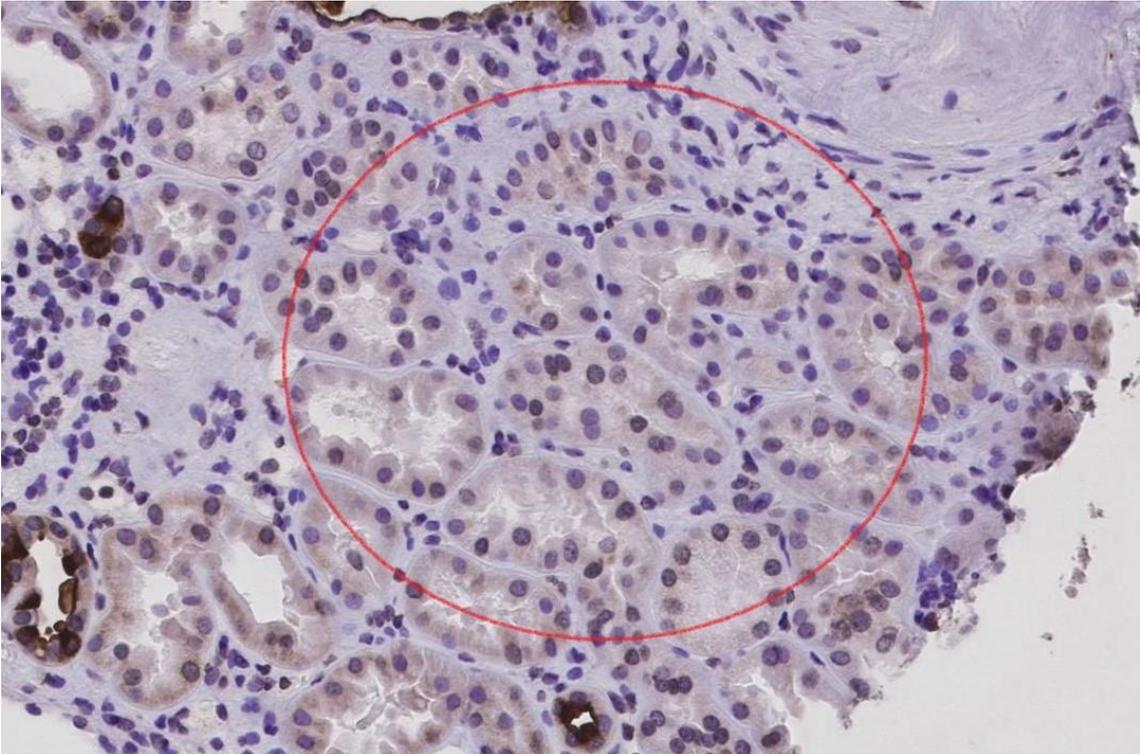


Abbildung 6: rote Markierung: keine zytoplasmatische MUC1-Färbung in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung)

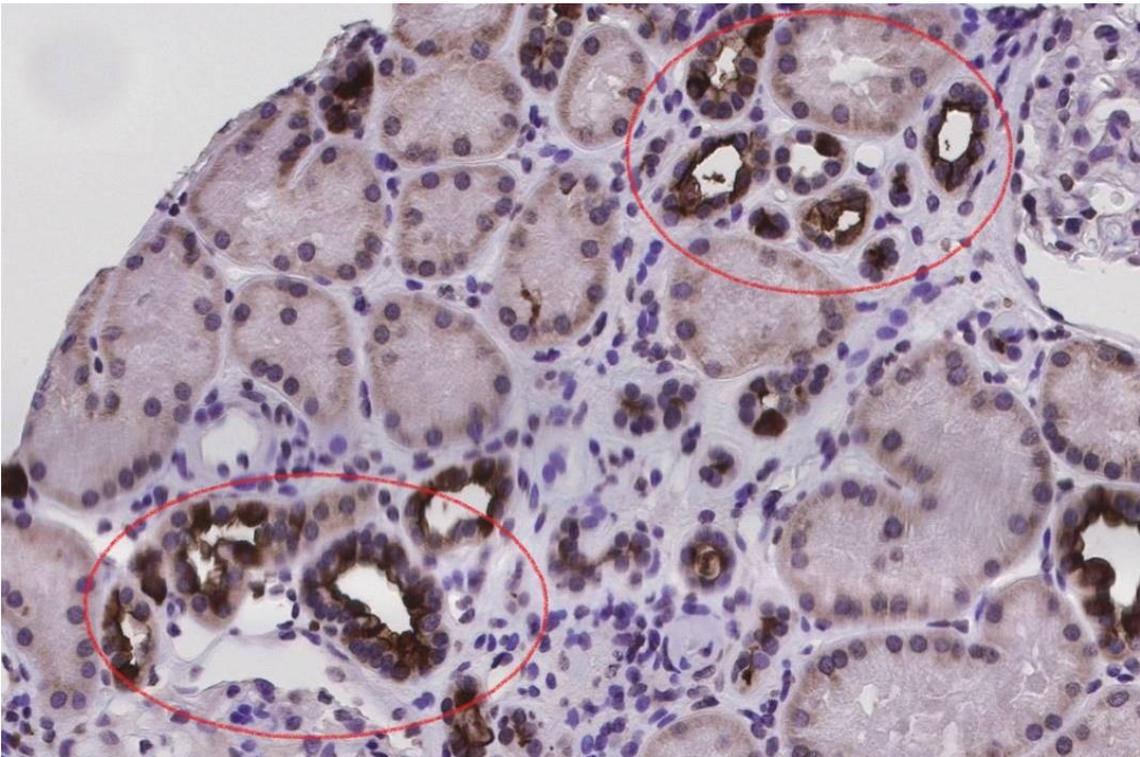


Abbildung 7: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 1 in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung)

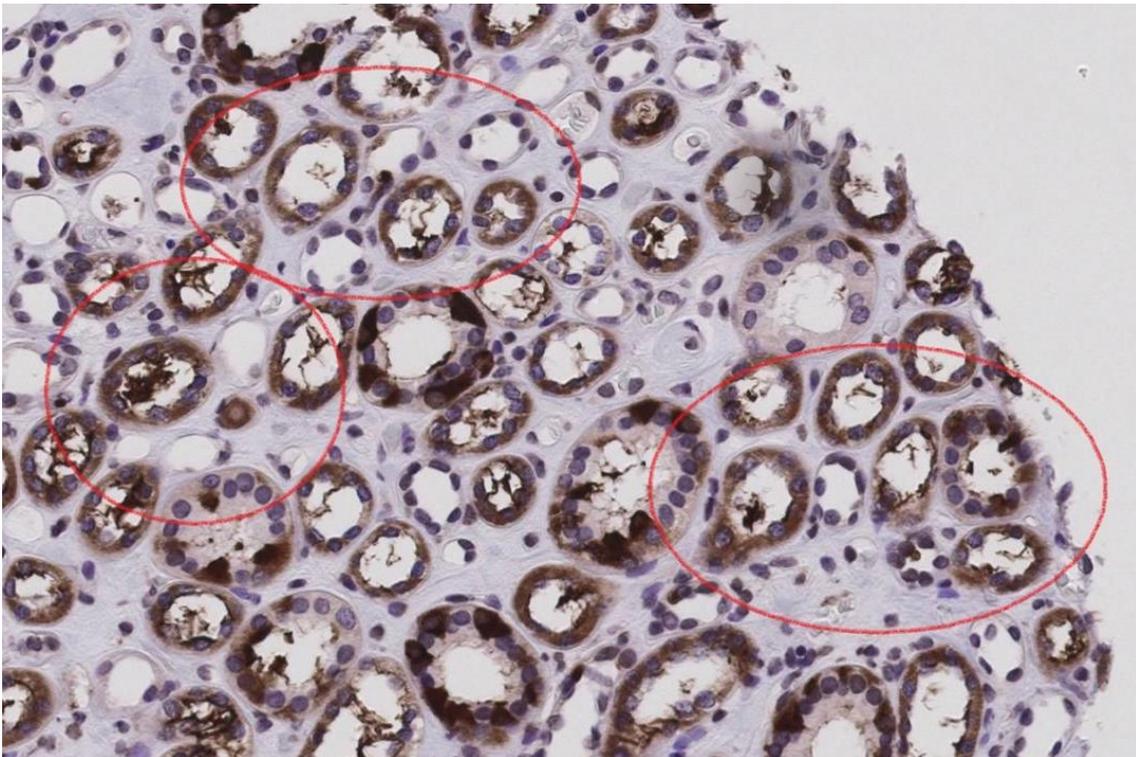


Abbildung 8: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 2 in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung)

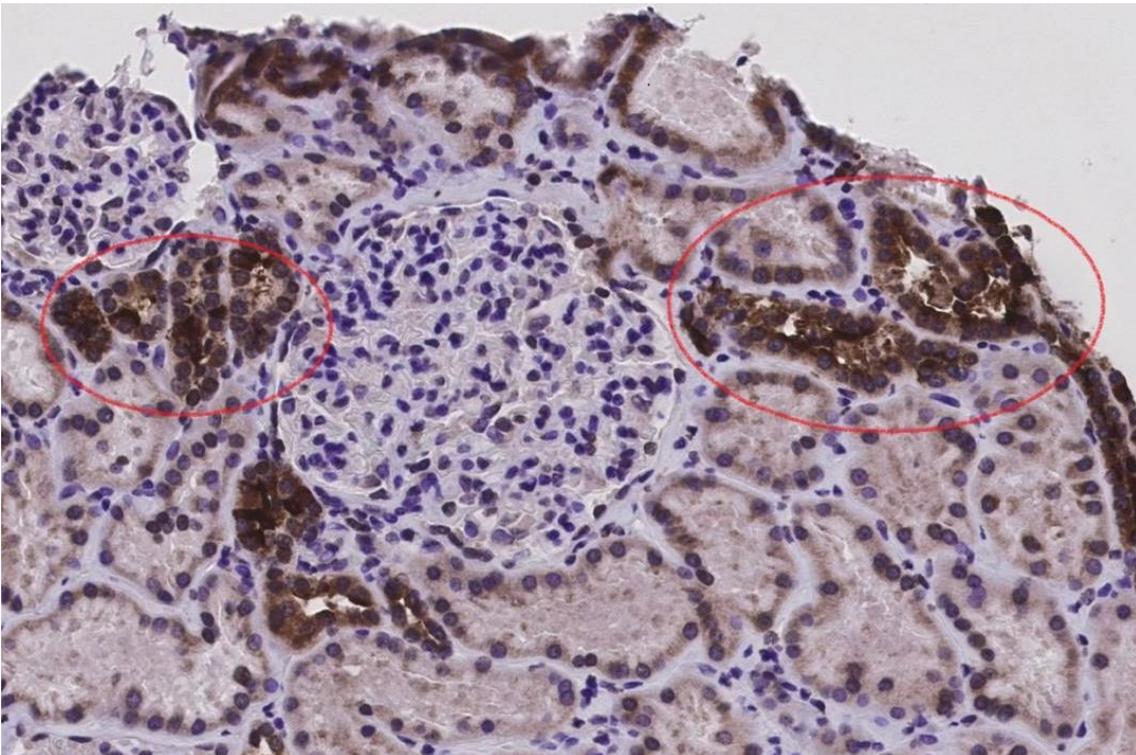


Abbildung 9: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 3 in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung)

Die **Abbildungen 10 bis 13** zeigen membranöse MUC1-Färbungen unterschiedlicher Intensitäten in benignem Nierenparenchym.

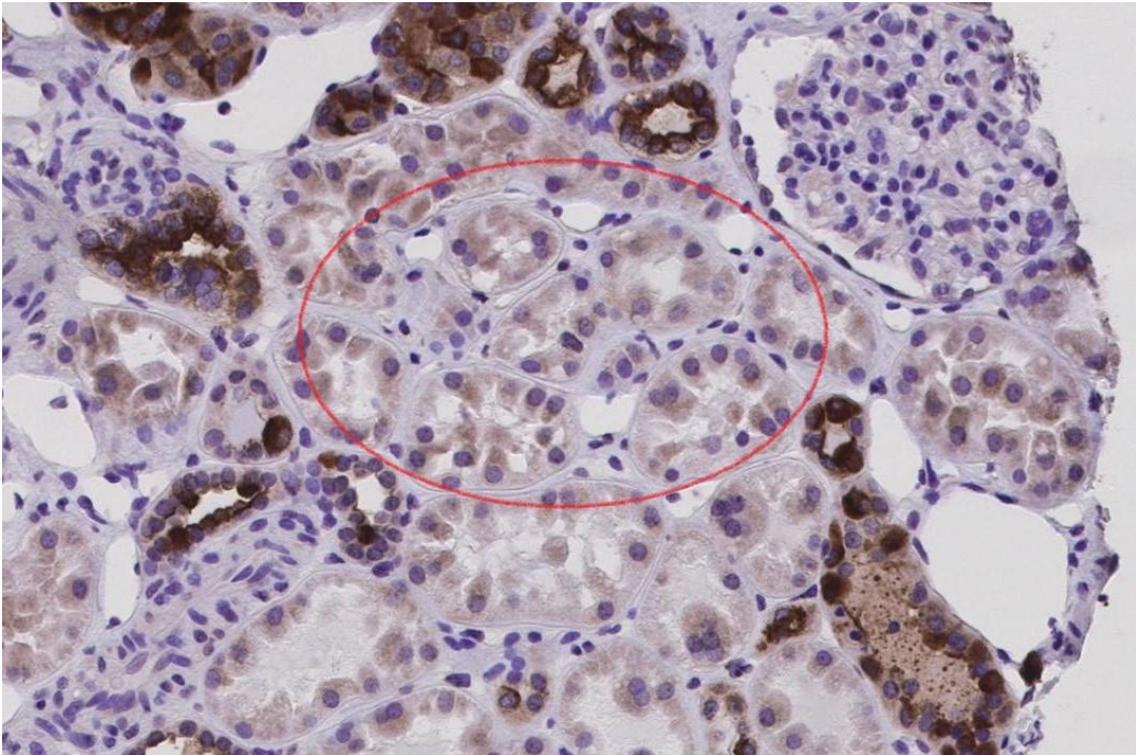


Abbildung 10: rote Markierung: keine membranöse MUC1-Färbung in benignem Nierenparenchym (Intensität 0) (200-fache Vergrößerung)

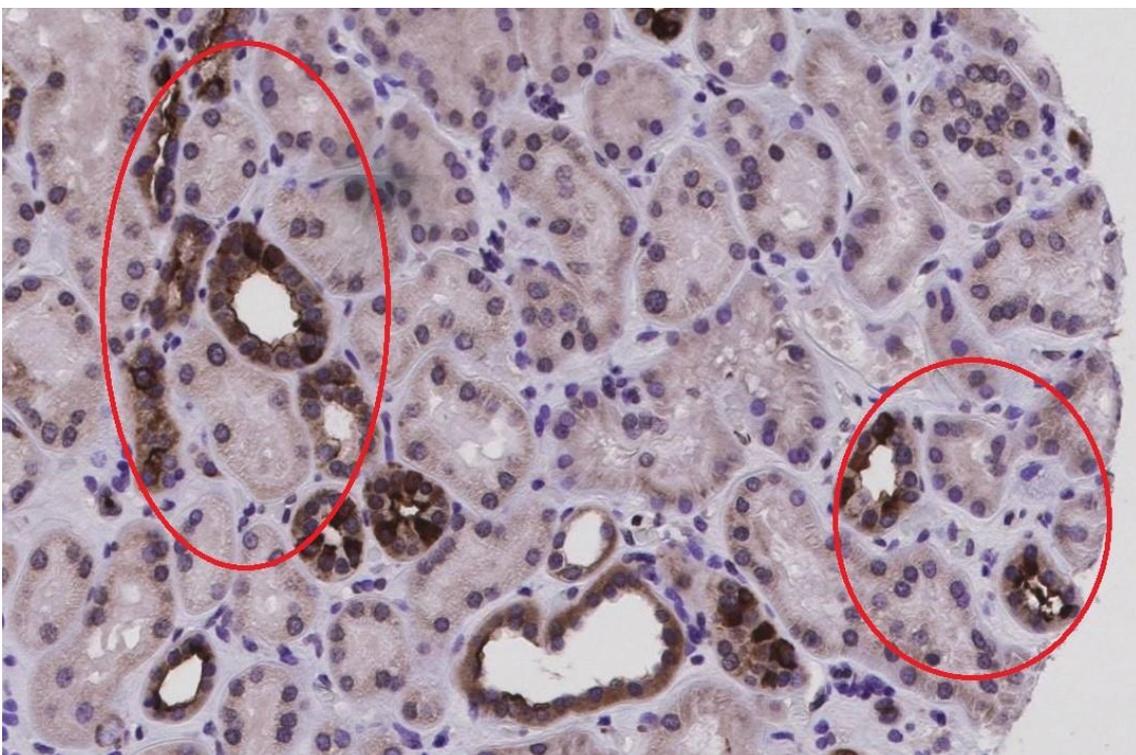


Abbildung 11: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 1 in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung)

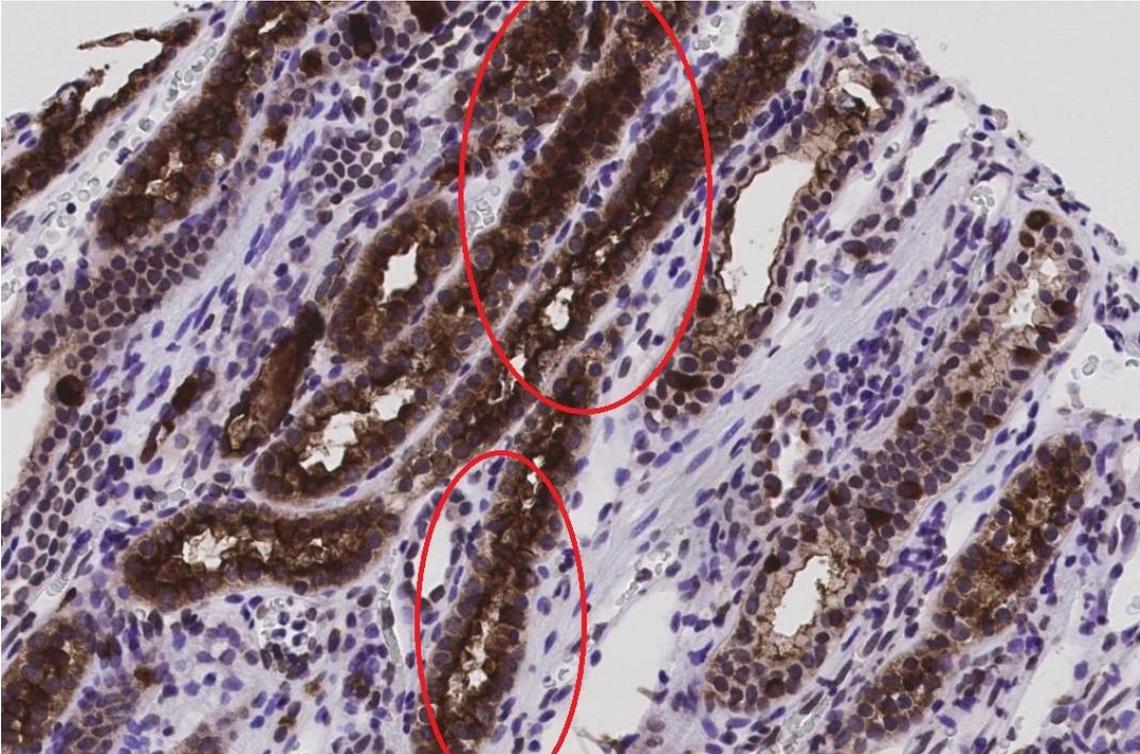


Abbildung 12: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 2 in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung)

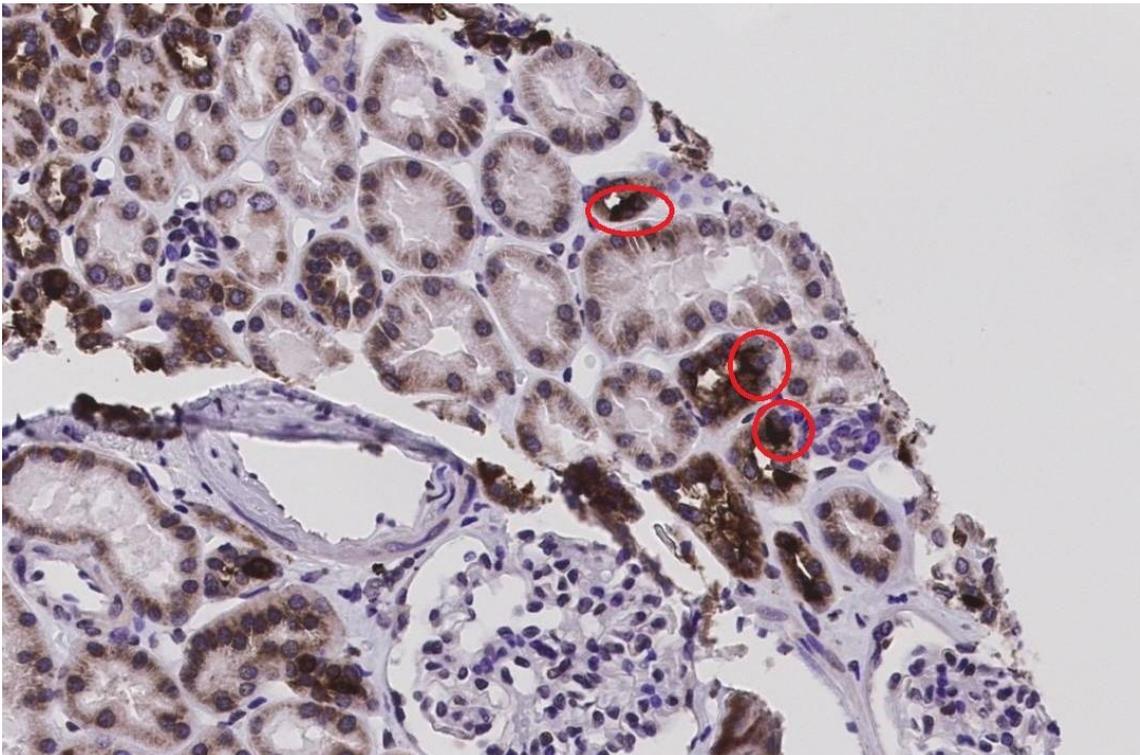


Abbildung 13: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 3 in benignem Nierenparenchym (200-fache Vergrößerung)

Abbildung 14 zeigt die Verteilung der zytoplasmatischen und membranösen IR-Scores der 50 Proben mit benignem Nierenparenchym. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,03 und der p-Wert 0,826.

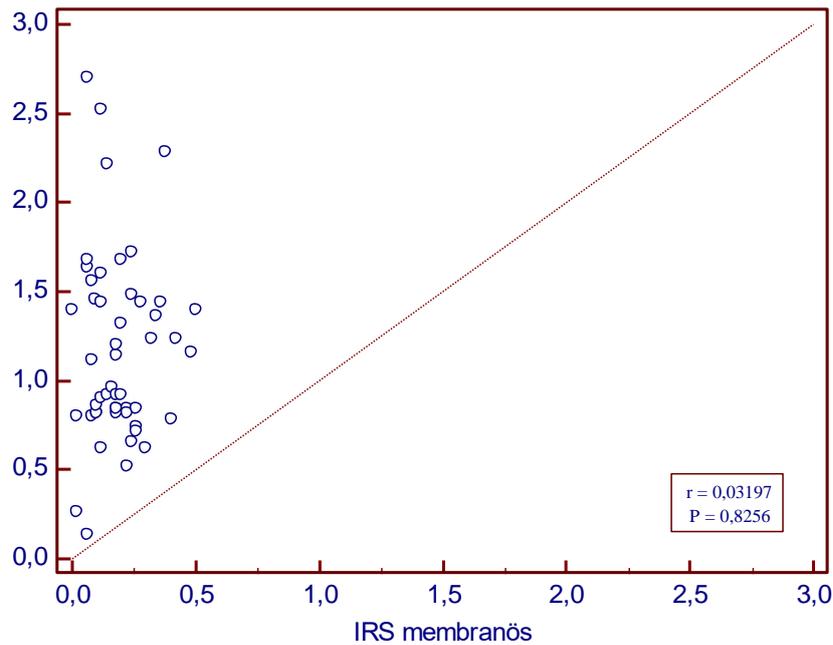


Abbildung 14: Korrelation der zytoplasmatischen (Y-Achse) und membranösen (X-Achse) IR-Scores in benignem Nierenparenchym

Der geringste IR-Score für die zytoplasmatische MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym betrug 0,14 und der höchste IR-Score für die zytoplasmatische MUC1-Expression betrug 2,70. Der Mittelwert lag bei 1,16 und der Median bei 1,04. Weitere Daten zur zytoplasmatischen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym finden sich in den **Tabellen 6 und 7**.

Tabelle 6: statistische Analyse der zytoplasmatischen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym

Anzahl der Proben	50
Minimaler und maximaler IR-Score	0,14– 2,70
Mittelwert ± Standardfehler	1,16 ± 0,07
Median	1,04

Tabelle 7: Perzentilen der zytoplasmatischen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym

Perzentilen	IRS	95% Konfidenzintervall
2,5	0,18	
5	0,28	
10	0,56	0,19 bis 0,69
25	0,76	0,61 bis 0,84
75	1,46	1,17 bis 1,65
90	1,86	1,52 bis 2,28
95	2,21	
97,5	2,28	

Für die membranöse MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym ergab sich ein minimaler IR-Score von 0,0 und ein maximaler IR-Score von 1,0. Der Mittelwert der IR-Scores der membranösen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym lag bei 0,30 und der Median bei 0,21. Weitere Ergebnisse der statistischen Analyse zeigen **Tabellen 8 und 9**.

Tabelle 8: statistische Analyse der IR-Scores der membranösen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym

Anzahl der Proben	50
Minimaler und maximaler IR-Score	0,00 – 1,00
Mittelwert ± Standardfehler	0,30 ± 0,02
Median	0,21

Tabelle 9: Perzentilen der membranösen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym

Perzentilen	IRS	95% Konfidenzintervall
2,5	0,00	
5	0,00	
10	0,04	0,00 bis 0,05
25	0,07	0,04 bis 0,12
75	0,28	0,20 bis 0,40
90	0,45	0,35 bis 0,81
95	0,67	
97,5	0,82	

Im Gegensatz zum benignen Nierenparenchym zeigte sich bei den primären ccRCC eine diffusere MUC1-Expression. Diese zeigte sich zum Teil vornehmlich membranös, aber zum Teil auch vornehmlich zytoplasmatisch. 77 der 111 (69,4%) Stanzeln aus Tumorgewebe zeigten zumindest stellenweise auch eine kombinierte Expression von MUC1, also membranös und zytoplasmatisch.

In den **Abbildungen 15 bis 18** sind beispielhaft ccRCC-Primärtumore mit zytoplasmatischer MUC1-Färbung unterschiedlicher Intensitäten zu sehen.

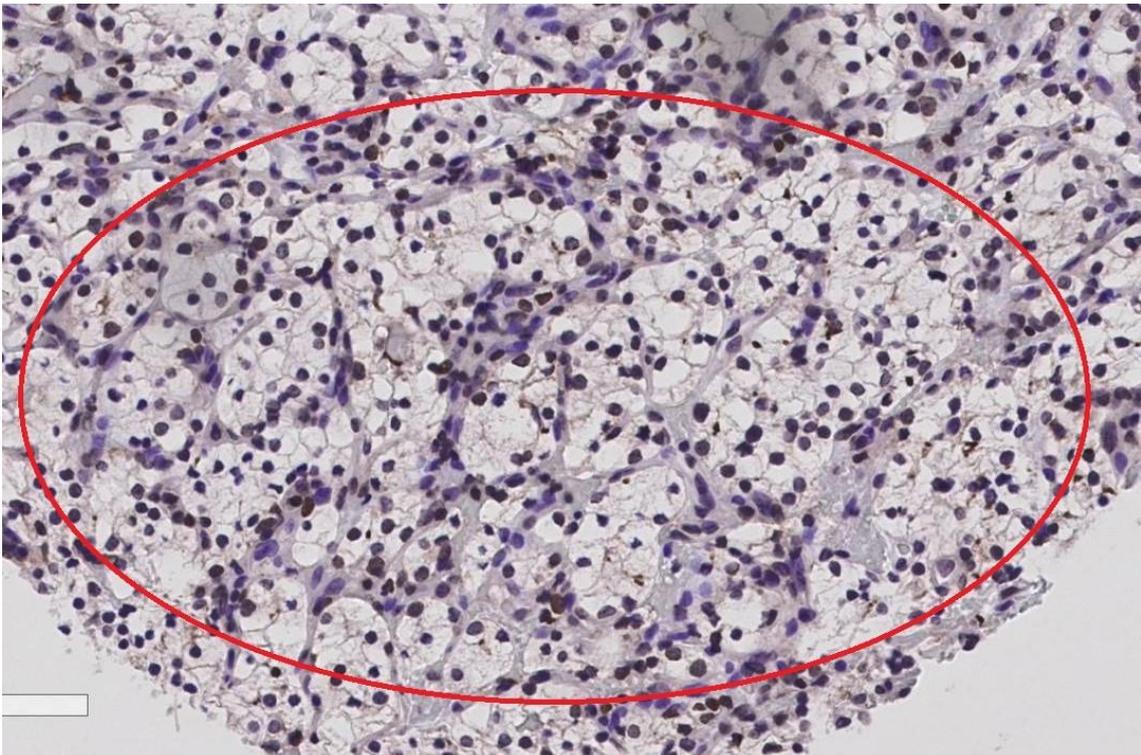


Abbildung 15: rote Markierung: keine zytoplasmatische MUC1-Färbung im RCC-Primärtumor (Intensität 0) (200-fache Vergrößerung)

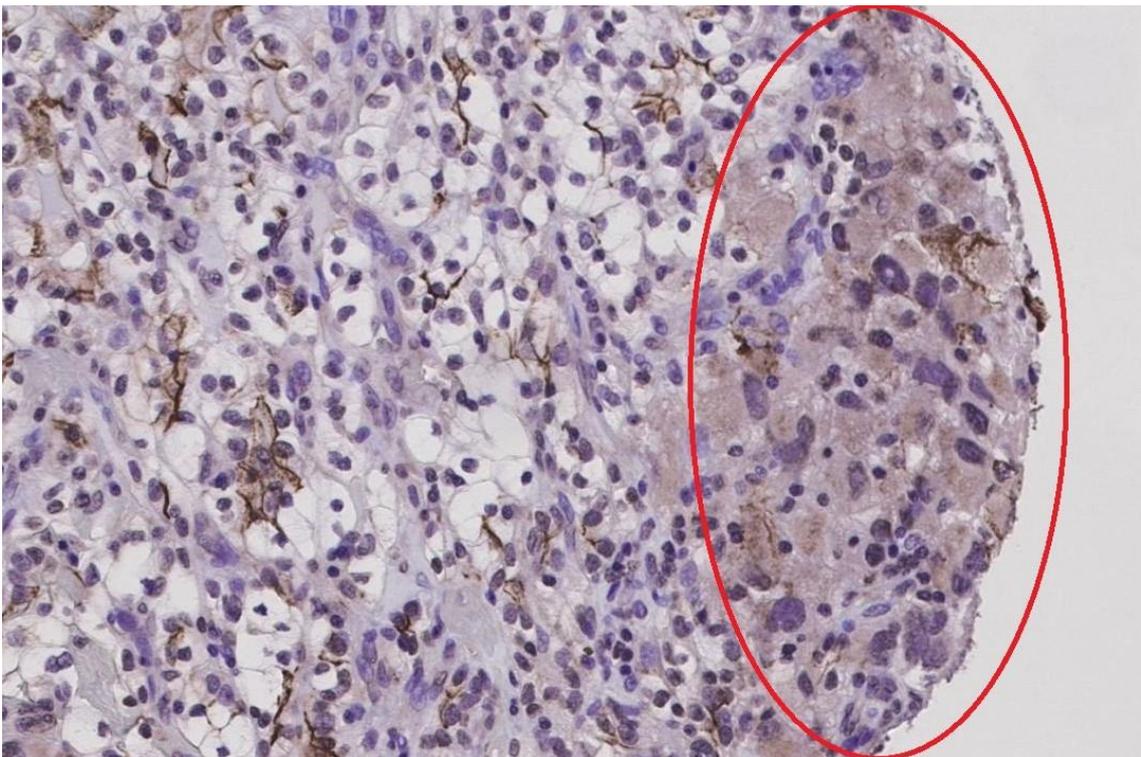


Abbildung 16: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 1 im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung)

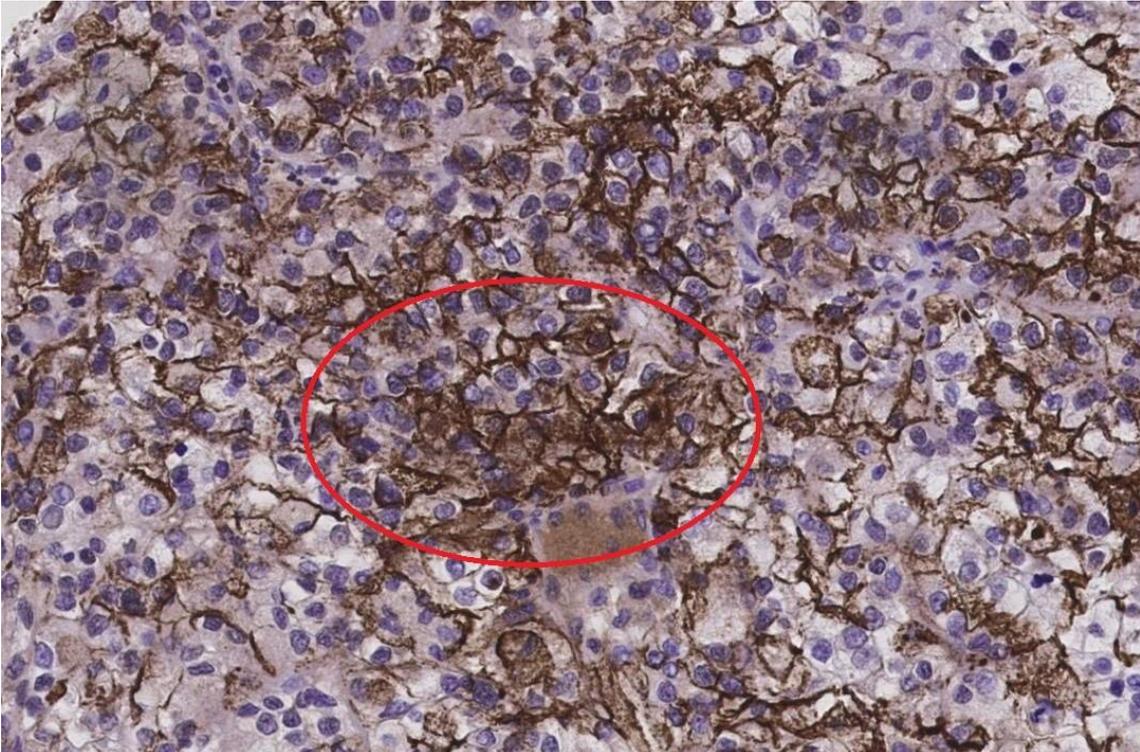


Abbildung 17: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 2 im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung)

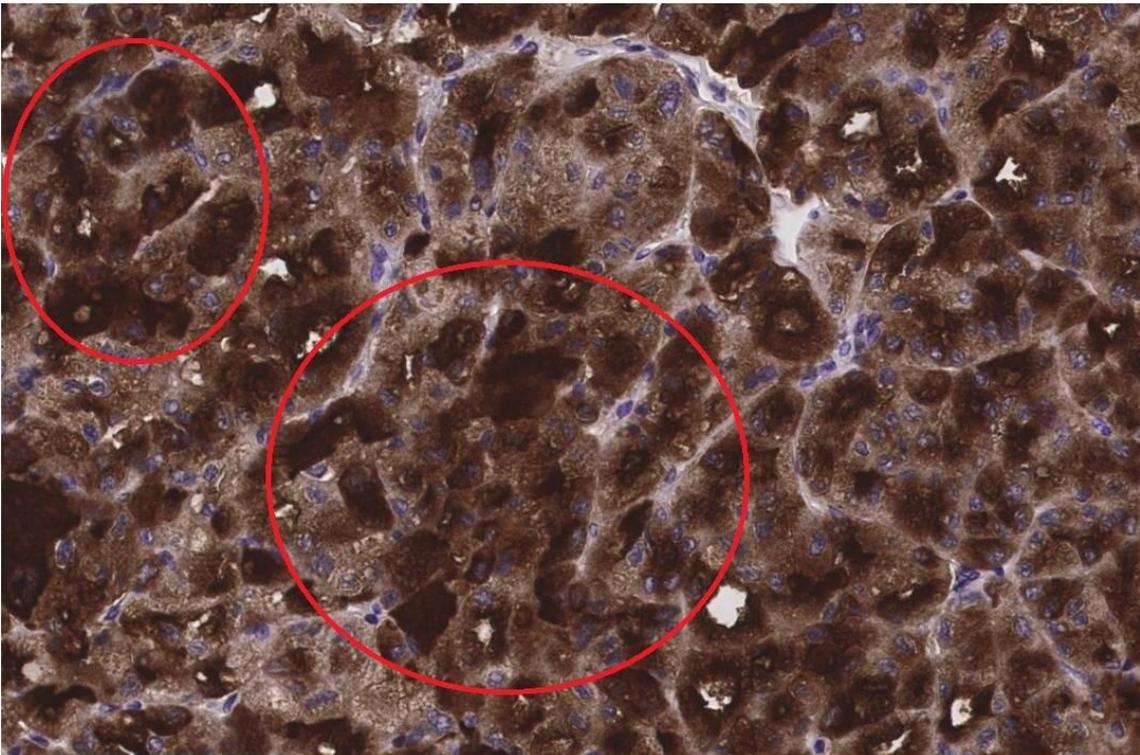


Abbildung 18: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 3 im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung)

In den **Abbildungen 19 bis 22** sind beispielhaft ccRCC-Primärtumore mit membranösen MUC1-Färbungen unterschiedlicher Intensitäten zu sehen.

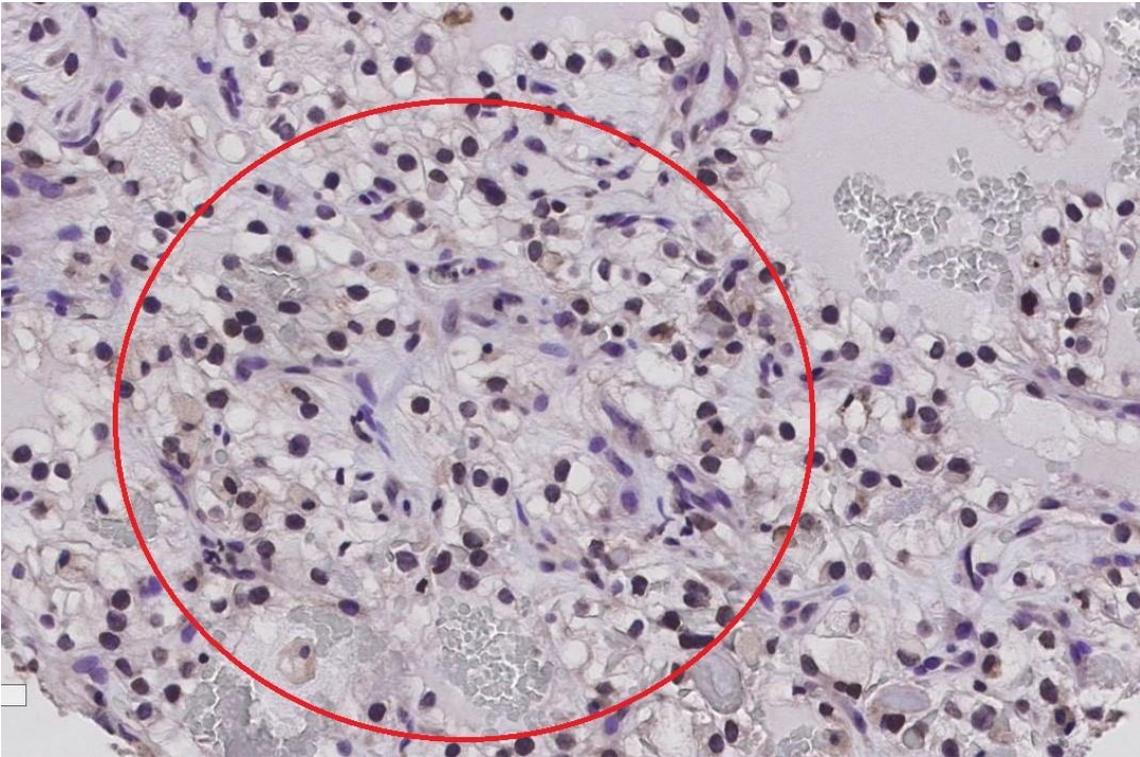


Abbildung 19: rote Markierung: keine membranöse MUC1-Färbung im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung)

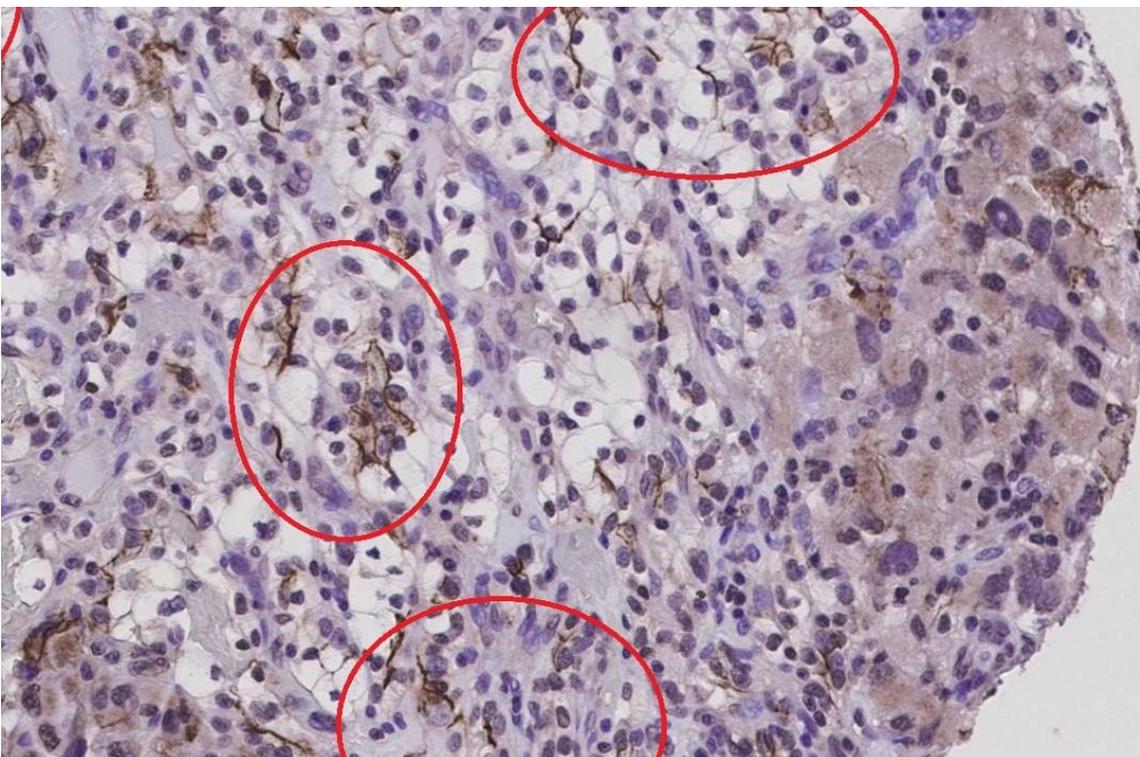


Abbildung 20: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 1 im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung)

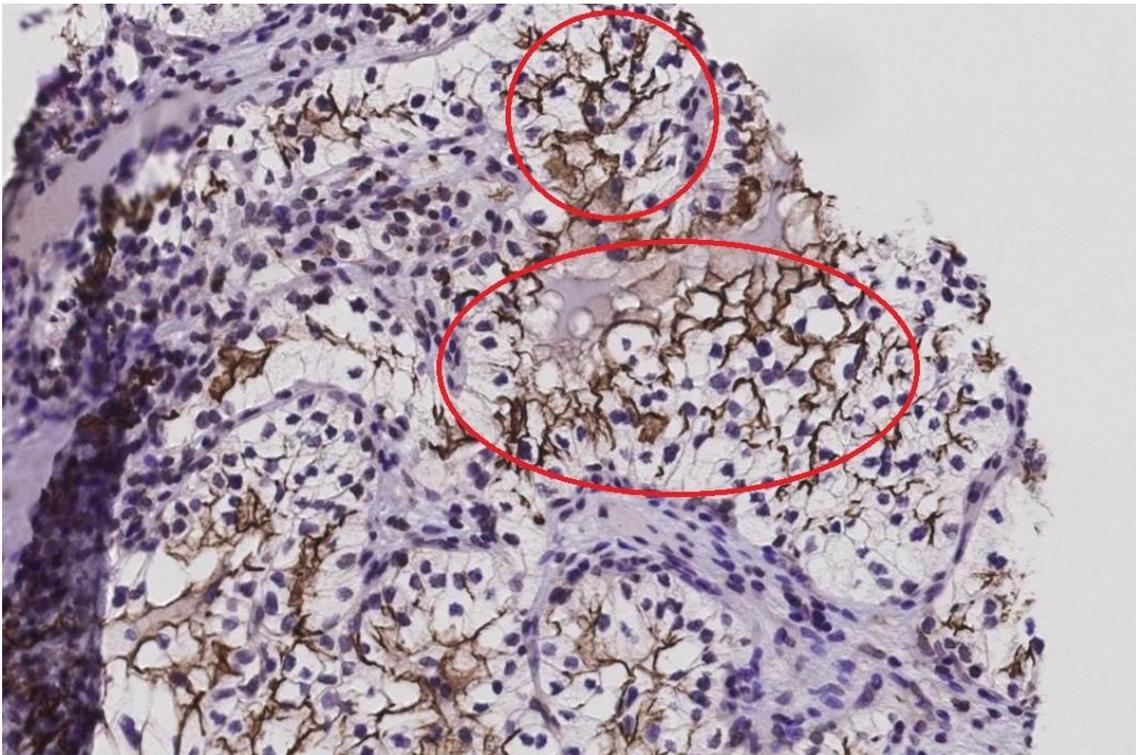


Abbildung 21: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 2 im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung)

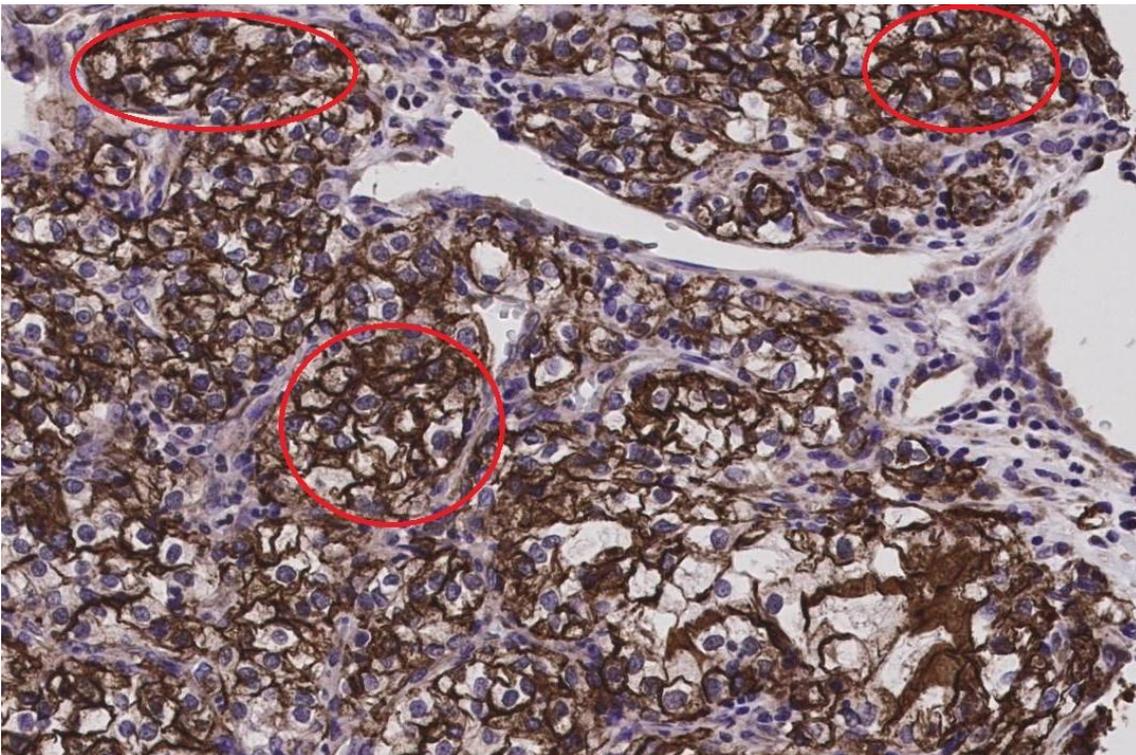


Abbildung 22: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 3 im RCC-Primärtumor (200-fache Vergrößerung)

Abbildung 23 zeigt die Korrelation der IR-Scores der zytoplasmatischen MUC1-Expression mit denen der membranösen MUC1-Expression in den 61 primären ccRCC. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,36 mit einem p-Wert von 0,005.

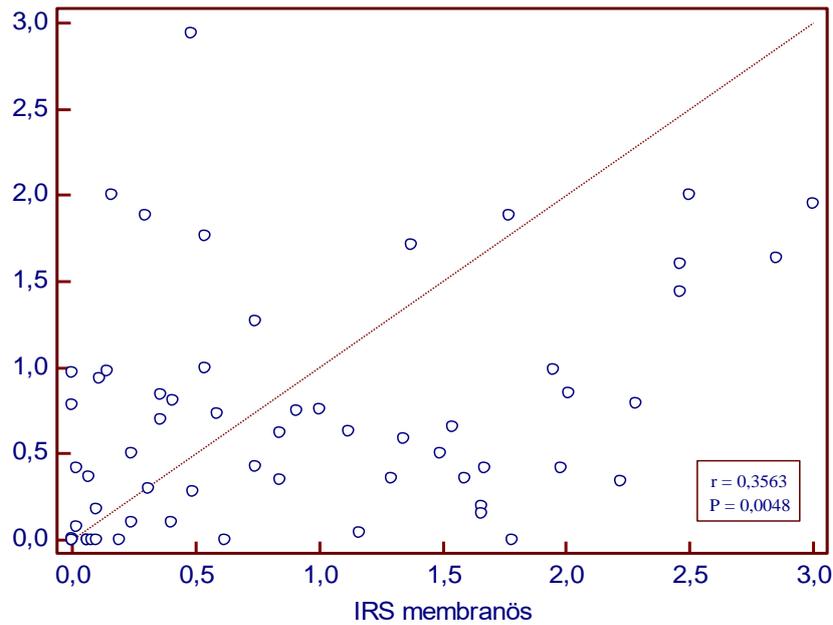


Abbildung 23: Korrelation der IR-Scores der zytoplasmatischen (Y-Achse) und der membranösen (X-Achse) MUC1-Expression in primären ccRCC

Dabei hat sich für die zytoplasmatische MUC1-Expression im Gewebe der ccRCC-Primärtumore der geringste IR-Score von 0,00 und der höchste IR-Score von 2,94 ergeben. Der Mittelwert liegt bei 0,69 und der Median bei 0,50. Weitere Ergebnisse der statistischen Analyse der zytoplasmatischen MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren zeigen die **Tabellen 10 und 11**.

Tabelle 10: statistische Analyse der IR-Scores der zytoplasmatischen MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren

Anzahl der Proben im Kollektiv	61
Minimaler bis maximaler IR-Score	0,00 – 2,94
Mittelwert ± Standardfehler	0,69 ± 0,09
Median	0,50

Tabelle 11: Perzentilen der zytoplasmatischen MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren

Perzentilen	IRS	95%-Konfidenzintervall
2,5	0,00	
5	0,00	
10	0,00	0,00 bis 0,00
25	0,02	0,00 bis 0,41
75	1,05	0,85 bis 1,64
90	1,84	1,34 bis 2,14
95	2,00	
97,5	2,26	

Für die membranöse MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren liegt der geringste IR-Score bei 0,00 und der höchste IR-Score bei 3,00. Der Mittelwert liegt bei 0,91 und der Median bei 0,59. Weitere Ergebnisse der statistischen Analyse der membranösen MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren zeigen die **Tabellen 12 und 13**.

Tabelle 12: statistische Analyse der IR-Scores der membranösen MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren

Anzahl der Proben im Kollektiv	61
Minimaler bis maximaler IR-Score	0,00 – 3,00
Mittelwert ± Standardfehler	0,91 ± 0,11
Median	0,59

Tabelle 13: Perzentilen der IR-Scores für die membranöse MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren

Perzentilen	IRS	95%-Konfidenzintervall
2,5	0,00	
5	0,00	
10	0,01	0,00 bis 0,04
25	0,08	0,02 bis 0,32
75	1,55	1,19 bis 1,93
90	2,22	1,78 bis 2,93
95	2,40	
97,5	2,93	

3.1.3. Vergleich IHC benignes Nierenparenchym vs. ccRCC-Gewebe

Von den Gewebeproben aus den primären ccRCC waren 83,6% MUC1-positiv. Im Gegensatz dazu zeigten sogar 100% der korrespondierenden Proben mit benignem Nierenparenchym MUC1-positive Zellen, wobei diese auf die distalen Tubuli und Sammelrohre beschränkt waren.

Auffällig ist dabei jedoch der Unterschied zwischen den Expressionsmustern. Wie in **Abbildung 24** und **Abbildung 25** zu sehen ist, überwiegt bei den benignen Gewebeproben vornehmlich eine zytoplasmatische Expression von MUC1. Im Gegensatz dazu weisen die primären RCC verstärkt eine membranöse Expression von MUC1 auf.

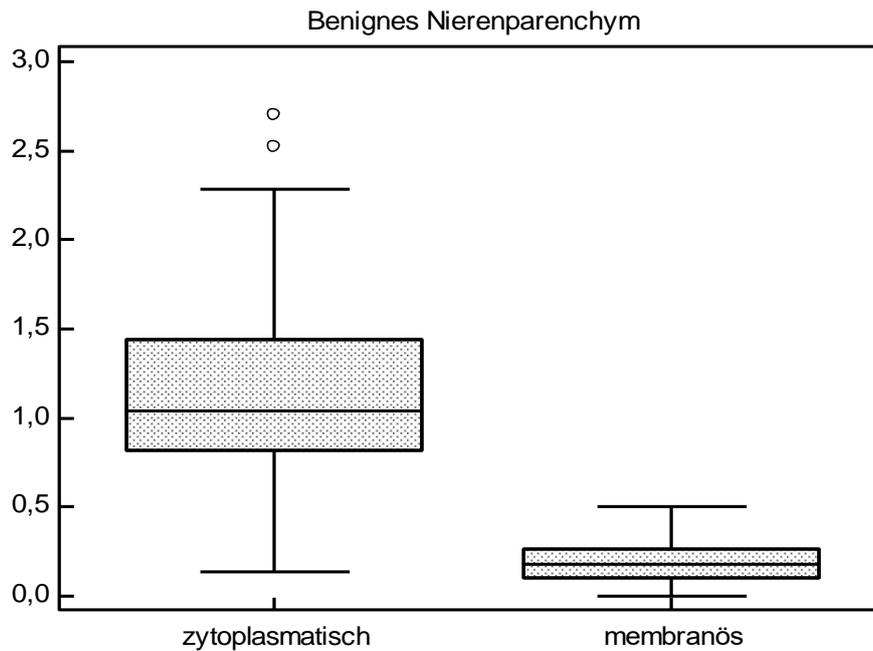


Abbildung 24: Boxplot-Darstellung der IR-Scores der MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym

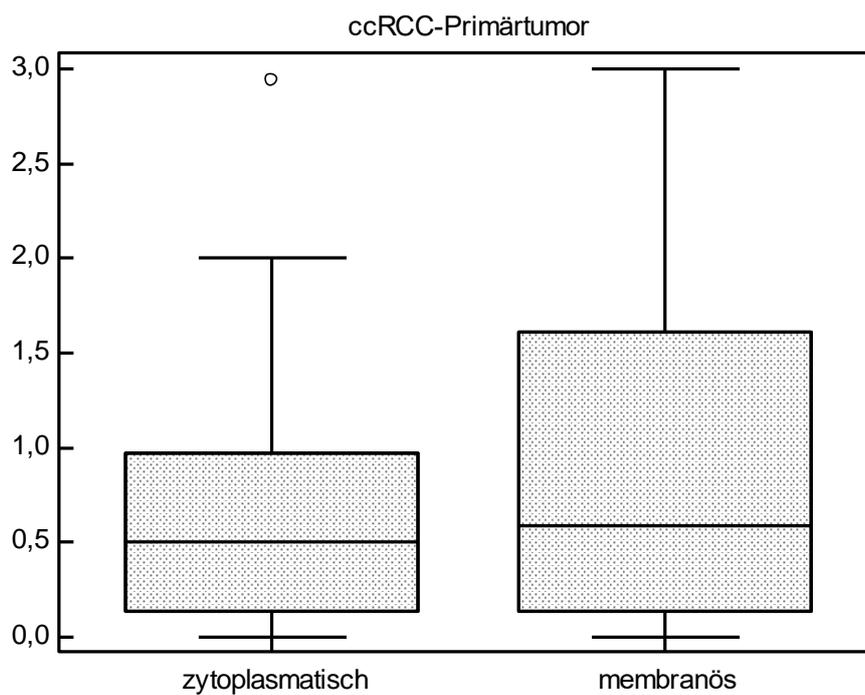


Abbildung 25: Boxplot-Darstellung der IR-Scores der MUC1-Expression in primären ccRCC

3.1.4. Univariate Analysen IHC-Färbung vs. klinische Parameter

Im Rahmen der univariaten Analysen wurde mittels Chi-Quadrat-Test ein statistischer Zusammenhang zwischen den klinisch-pathologischen Parametern und der MUC1-Expression der primären RCC gesucht. Hierbei diente der entsprechende Median jeweils als Grenze zwischen hoher und niedriger MUC1-Expression.

Im Zuge dieser Tests konnte für keinen der getesteten klinisch-pathologischen Parameter eine signifikante Assoziation zu einer zytoplasmatischen oder membranösen MUC1-Expression gefunden werden. Die p-Werte der Analysen zeigt **Tabelle 14**.

Tabelle 14: Korrelation der MUC1-Expressionsmuster mit klinisch-pathologischen Parametern in primären ccRCC (n = 61)

Primäre ccRCC			
	MUC1 zytoplasmatisch >Median	MUC1 membranös >Median	MUC1 insgesamt positiv/negativ
Klinisches Stadium >T2	p=0,4251	p=0,9227	p=0,6126
Fuhrman-Grade >G2	p=0,6151	p=0,8178	p=0,5372
Anämie	p=0,9028	p=0,9505	p=0,7291
Geschlecht männlich/weiblich	p=0,1290	p=0,0851	p=0,1347
N+	p=0,1610	p=0,9085	p=0,8295
M+	p=0,8345	p=0,3457	p=0,6189
Tumornekrose	p=0,7843	p=0,8178	p=0,6125
Sarkomatoide Komponenten	p=0,4096	p=0,9303	p=0,8517
LDH Erhöhung	p=0,9024	p=0,2443	p=0,7148
Kreatinin Erhöhung	p=0,8345	p=0,5054	p=0,6189
Leukozytose	p=0,9758	p=0,5735	p=0,4668
Erhöhtes Calcium	p=0,6729	p=0,5163	p=0,6126
CRP Erhöhung	p=0,9323	p=0,6086	p=0,7609

3.1.5. Univariate Analysen IHC-Färbung vs. Survival

Wie in den Kaplan-Meier-Kurven in **Abbildungen 26 bis 28** deutlich wird, konnten in Bezug auf primäre ccRCC keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben zwischen den Patienten mit hoher und niedriger zytoplasmatischer (p=0,387) und membranöser (p=0,638) MUC1-Expression nachgewiesen werden.

Auch zwischen den Patienten mit MUC1-positiven und MUC1-negativen Tumoren zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben (p=0,164). Interessant ist dennoch, dass hierbei die Patienten, deren Tumore kein MUC1 exprimierten (n=8), keine Events zeigten und zum Zeitpunkt des Follow-ups noch lebten.

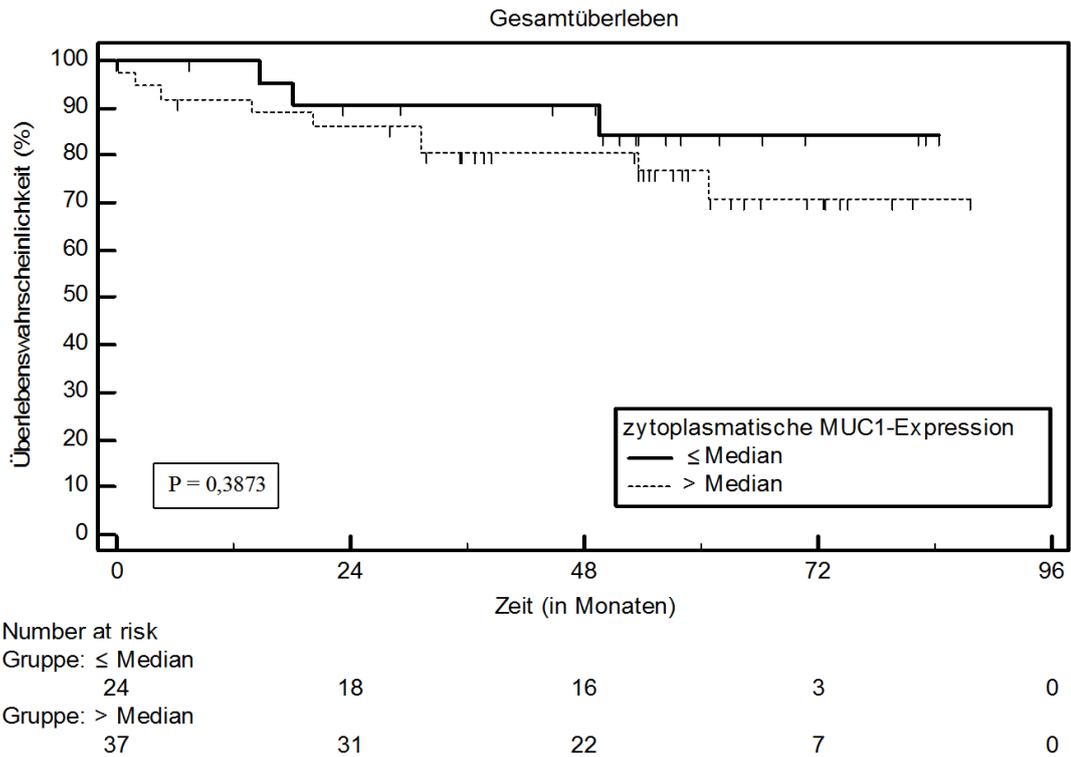


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurven für zytoplasmatische MUC1-Expression in RCC-Primärtumoren (p=0,387)

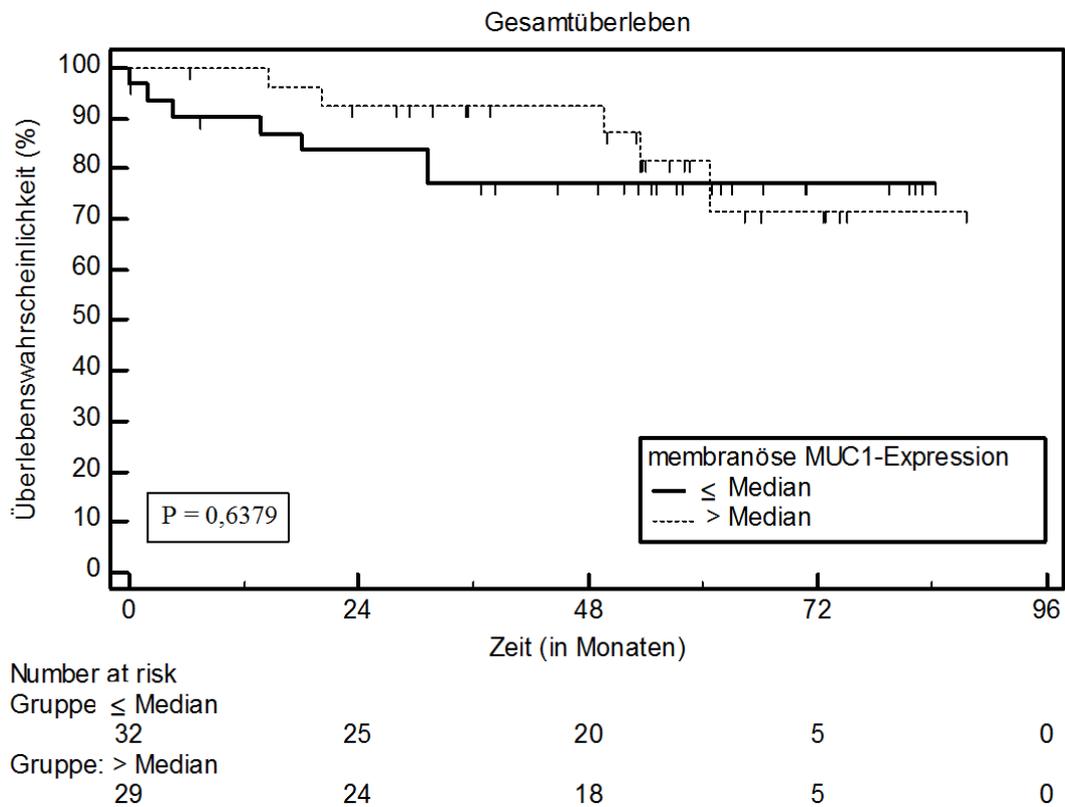


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven für membranöse MUC1-Expression in RCC-Primärtumoren (p=0,638)

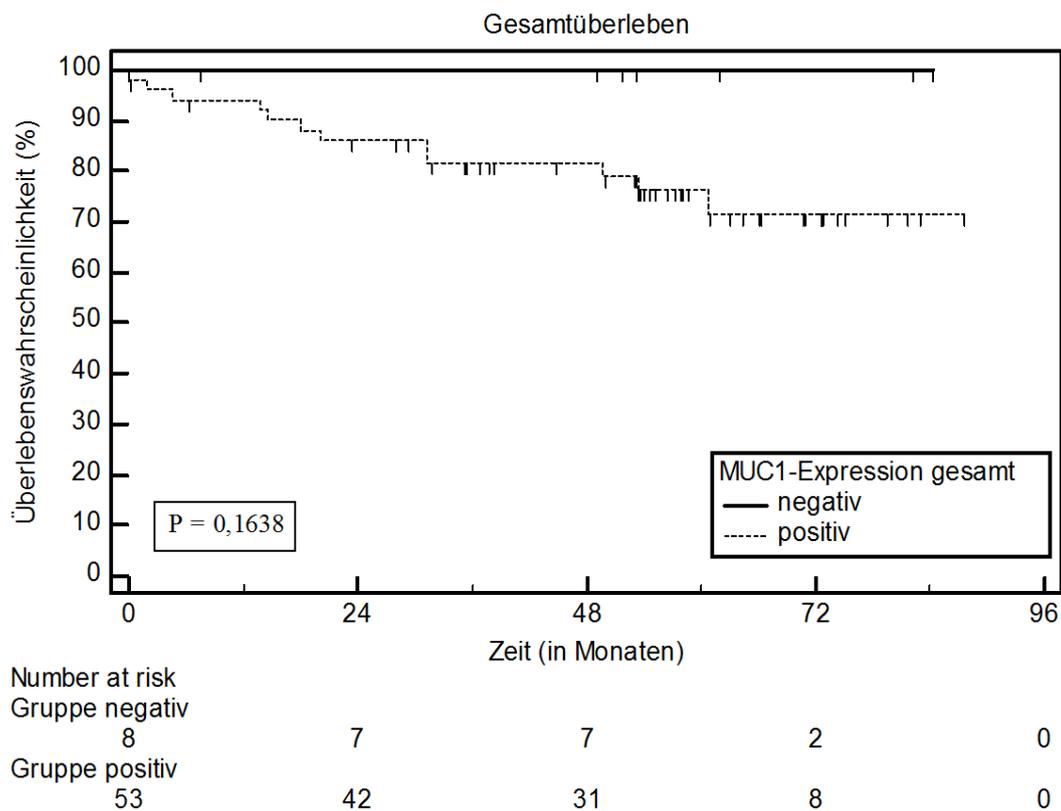


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurven für gesamte MUC1-Expression in RCC-Primärtumoren (p=0,164)

Im Rahmen der univariante Cox-Regressionsanalyse wurde der Einfluss verschiedener klinisch-pathologischer Parameter auf das Gesamtüberleben untersucht. Dabei konnte im Kollektiv der Patienten mit primärem ccRCC eine Abhängigkeit des Gesamtüberlebens von dem T-Stadium >T2 (p=0,037), dem Grading >G2 (p=0,010), der Anwesenheit sarkomatoider Komponenten in der histologischen Untersuchung (p=0,015), einem positiven Lymphknotenstatus (p=0,001) und einem positiven Fernmetastasenstatus gezeigt werden (p=0,003).

Dabei war das Risiko zu Versterben bei einem T-Stadium >T2 auf das 4,04-fache gesteigert, bei einem Grading >G2 auf das 4,95-fache gesteigert und bei sarkomatoiden Komponenten, Lymphknoten- und Fernmetastasen sogar auf das 7,18-, 7,16- und das 6,55-fache gesteigert.

Nähere Informationen zur statistischen Analyse der klinisch-pathologischen Parameter und dem Gesamtüberleben zeigt **Tabelle 15**.

Tabelle 15: Univariate Cox-Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben bei Patienten mit primärem ccRCC

Kovariate	HR	95% KI von HR	p-Wert
Klinisches Stadium >T2 vs. ≤T2	4,04	1,10 bis 14,86	0,037
Grading >G2 vs. ≤G2	4,95	1,47 bis 16,63	0,010
Tumornekrose vorhanden vs. nicht vorhanden	1,82	0,40 bis 8,32	0,440
Sarkomatoide Komponenten vorhanden vs. nicht vorhanden	7,18	1,49 bis 34,75	0,015
Durchmesser >Median vs. ≤Median	1,19	0,39 bis 3,67	0,762
MUC1 zytoplasmisch >Median vs. ≤Median	1,77	0,48 bis 6,50	0,394
MUC1 membranös >Median vs. ≤Median	0,76	0,24 bis 2,38	0,639
N+ vs. N0	7,16	2,15 bis 23,88	0,001
M+ vs. M0	6,55	1,92 bis 22,39	0,003

3.1.6. Multivariate Analysen Survival

Aufgrund der limitierten Anzahl tumorassoziierter Todesfälle in diesem Kollektiv (n=12), konnten mittels multivariater Analyse keine unabhängigen Prädiktoren des Gesamtüberlebens ausfindig gemacht werden. Details zu den Ergebnissen dieser Analysen finden sich zur Ergebnisdarstellung in **Tabelle 16**.

Tabelle 16: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben bei Patienten mit primären ccRCC

Kovariate	HR	95% KI von HR	p-Wert
Klinisches Stadium >T2 vs. ≤T2	31,72	0,69 bis 14,51	0,139
Grading >G2 vs. ≤G2	0,49	0,04 bis 5,84	0,578
Sarkomatoide Komponenten vorhanden vs. nicht vorhanden	31,10	0,39 bis 24,54	0,284
N+ vs. N0	19,03	0,27 bis 13,60	0,524
M+ vs. M0	43,32	0,38 bis 48,96	0,239

3.2. mRCC Kollektiv

3.2.1. Patientenkollektiv und klinische Parameter

Das Kollektiv der Patienten mit mRCC umfasst 90 Patienten bzw. 151 Metastasenresektate. Davon war für 76 Patienten ein Follow-up verfügbar, wobei das mediane Überleben 66,14 Monate betrug. Den Patienten wurden im Median in einem Alter von 66,49 Jahren die Metastasen reseziert. 34,21% der Patienten waren zum Zeitpunkt der Datenanalyse bereits verstorben.

Bei den Metastasen handelt es sich in 26,49% der Fälle um pulmonale Filiae. Die weiteren Lokalisationen sowie weitere Informationen zum Kollektiv finden sich in **Tabelle 17**.

Tabelle 17: Charakteristiken der Metastasen/Lokalrezidive (KI = Konfidenzintervall)

Charakteristiken der Metastasen/ Lokalrezidive			
		n	%
Metastasenlokalisation	Lunge	40	26,49%
	Leber	8	5,30%
	Pleura	2	1,32%
	Nebenniere	10	6,62%
	Lymphknoten	18	11,92%
	Pankreas	5	3,31%
	Weichteil- gewebe	21	13,91%
	Haut	2	1,32%
	Larynx	1	0,66%
	Thyroidea	1	0,66%
	Knochen	22	14,57%
	Lokalrezidiv	6	3,97%
	Truncus sympathicus	1	0,66%
	Muskel	4	2,65%
	Mesenterium	1	0,66%
	Dünndarm	3	1,99%
	Omentum	1	0,66%
	Mediastinum	1	0,66%
	Uterus	1	0,66%
	Milz	1	0,66%
Hoden	1	0,66%	
Peritoneum	1	0,66%	
Anzahl der Metastasen gesamt		151	100%
Anzahl der Patienten mit mRCC gesamt		90	100%
Anzahl der mRCC-Patienten mit verfügbarem Follow-up		76	84,44%
Metastasen	Synchron	24	31,58%
	Metachron	52	68,42%
Alter (in Jahren) zum Zeitpunkt der Metastasenresektion	Median (Range)	66,49	30,81 bis 80,77
Zeit (in Monaten) zwischen Erstdiagnose primäres ccRCC bis zur Metastasenresektion	Median (95% KI)	39,18	24,97 bis 62,13
Follow-up Zeit (in Monaten) ab der Erstdiagnose mRCC	Median (95% KI)	28,60	23,05 bis 43,06
Tod	Nein	50	65,79%
	Ja	26	34,21%
Gesamtüberleben (in Monaten)	Median (95% KI)	66,14	51,30 bis 66,14

3.2.2. Immunhistochemie

82,90% der Metastasenresektate zeigten sich in der MUC1-Färbung positiv.

In den **Abbildungen 29 bis 32** sieht man Metastasen mit zytoplasmatischen MUC1-Färbungen unterschiedlicher Intensitäten.



Abbildung 29: rote Markierung: fehlende zytoplasmatische MUC1-Färbung in einer RCC-Metastase (Intensität 0)
(200-fache Vergrößerung)

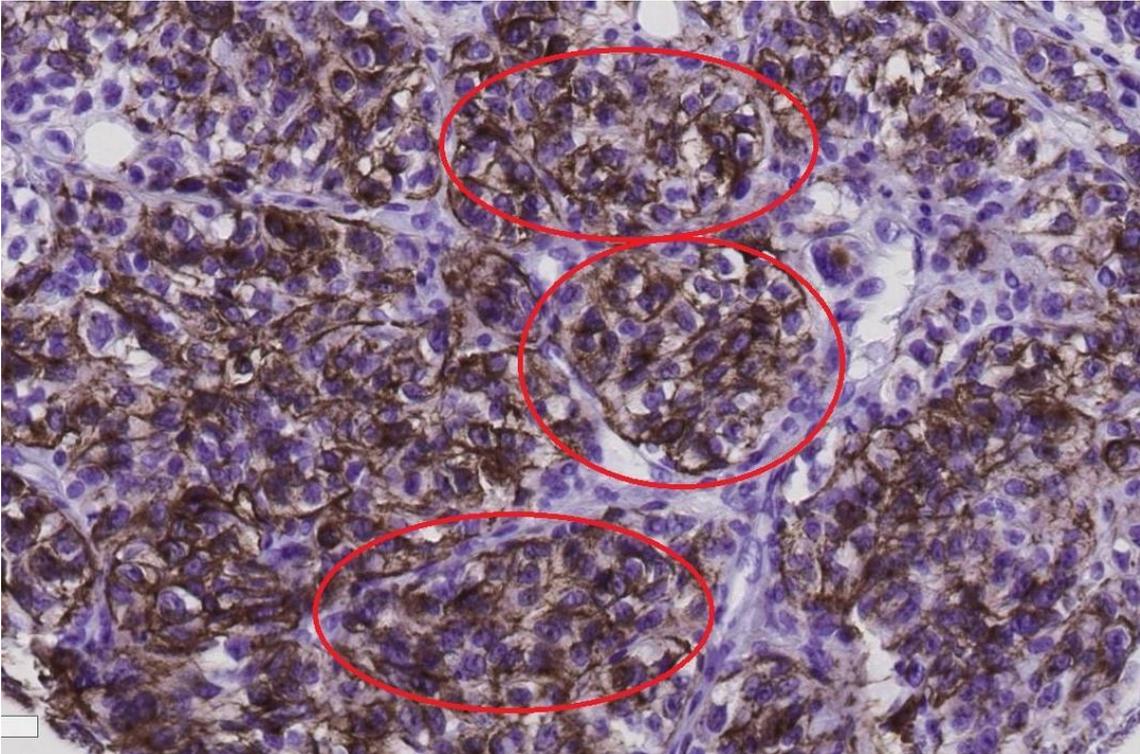


Abbildung 30: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 1 in einer RCC-Metastase (200-fache Vergrößerung)

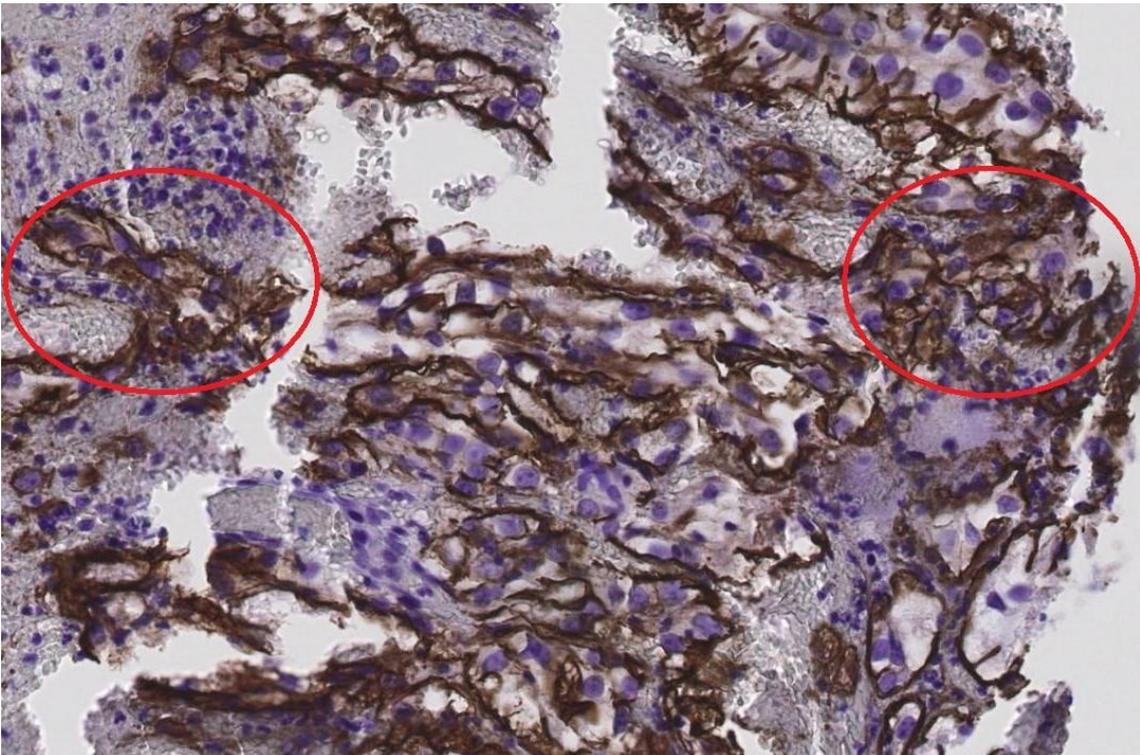


Abbildung 31: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 2 in einer RCC-Metastase (200-fache Vergrößerung)

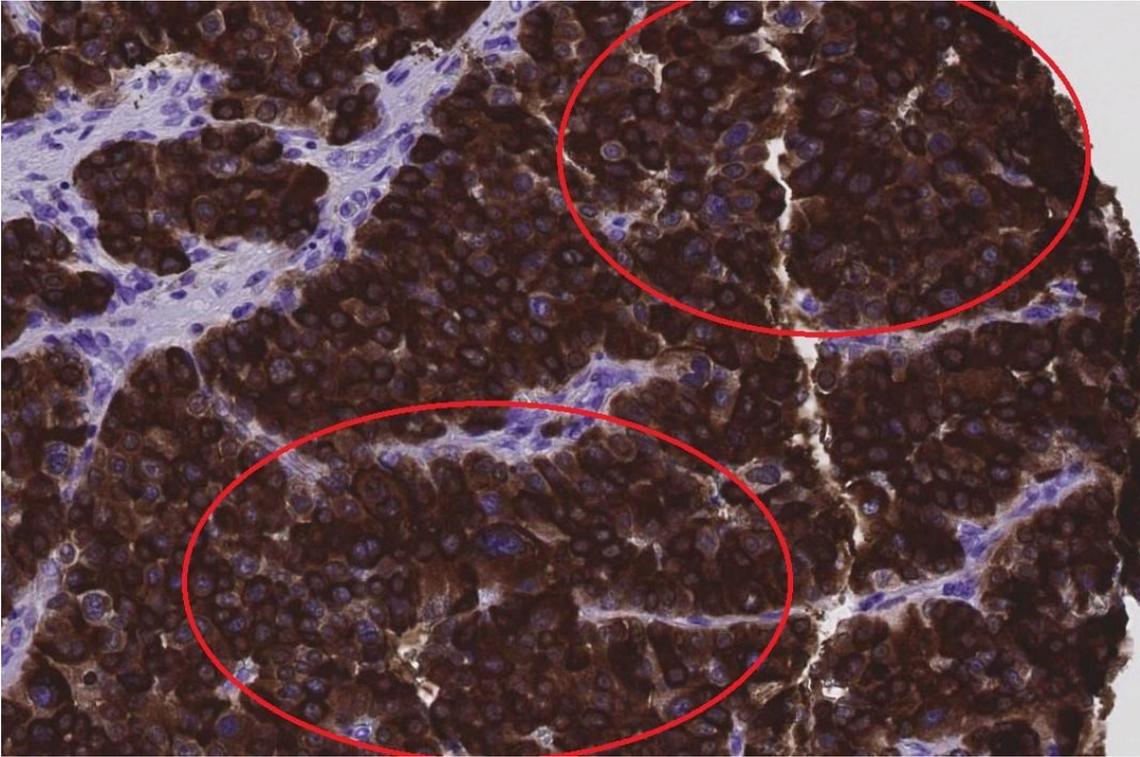


Abbildung 32: rote Markierung: zytoplasmatische MUC1-Färbung der Intensität 3 in einer RCC-Metastase (200-fache Vergrößerung)

In den **Abbildungen 33 bis 36** sieht man Metastasen mit membranösen MUC1-Färbungen unterschiedlicher Intensitäten.

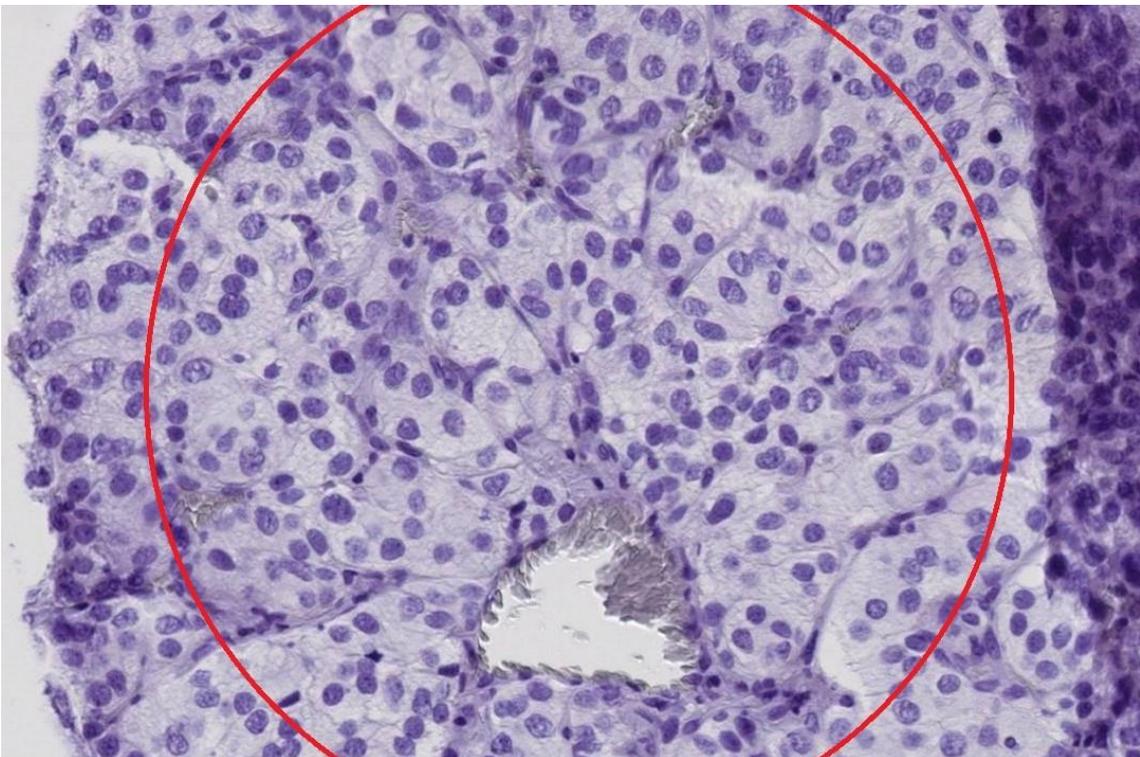


Abbildung 33: rote Markierung: keine membranöse MUC1-Färbung in einer RCC-Metastase (Intensität 0) (200-fache Vergrößerung)

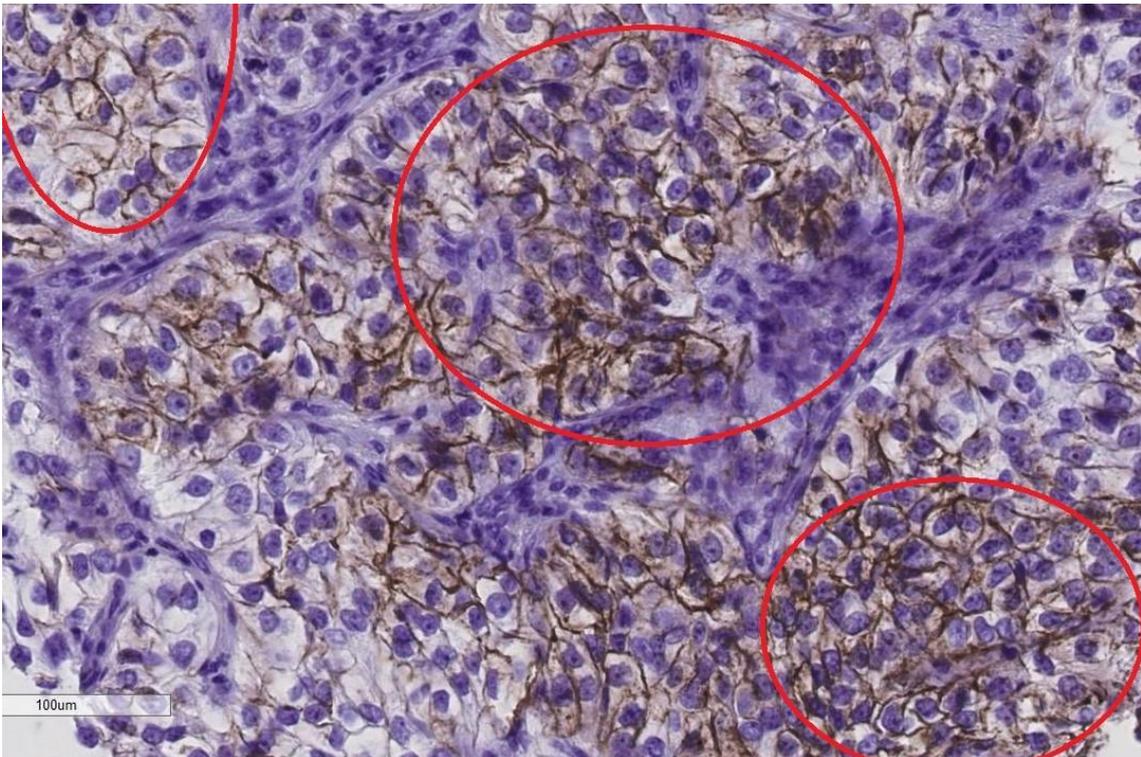


Abbildung 34: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 1 in einer RCC-Metastase (200-fache Vergrößerung)

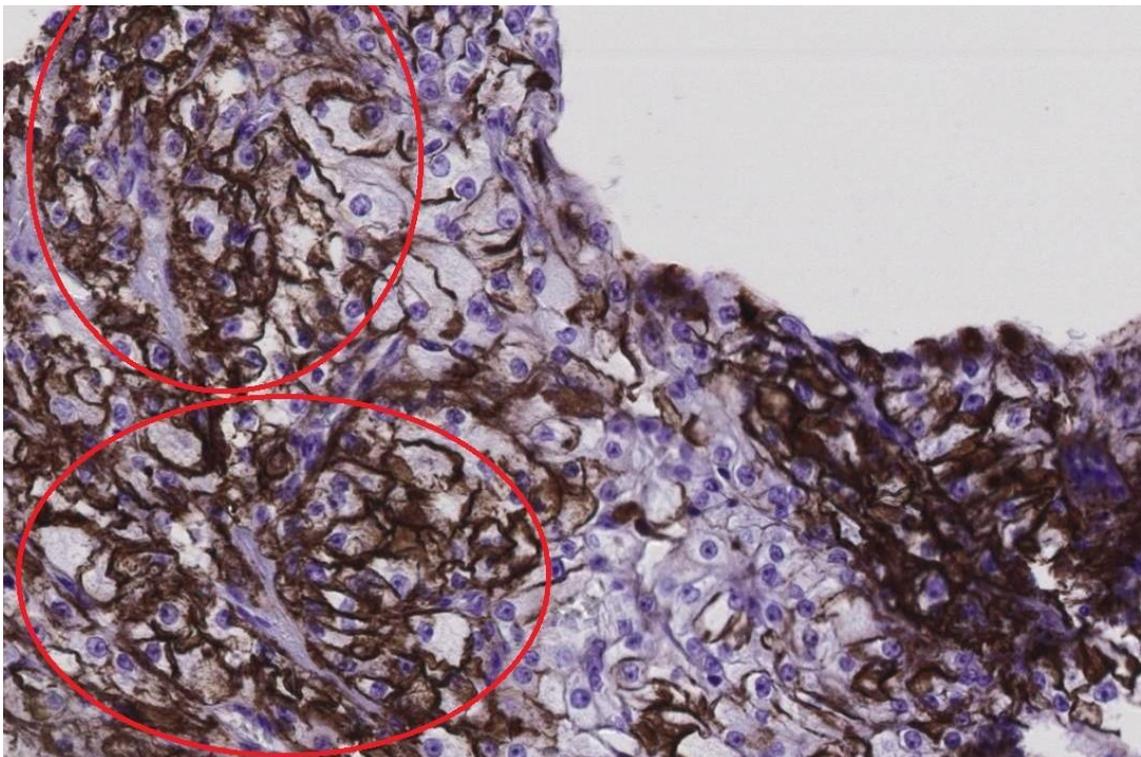


Abbildung 35: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 2 in einer RCC-Metastase (200-fache Vergrößerung)

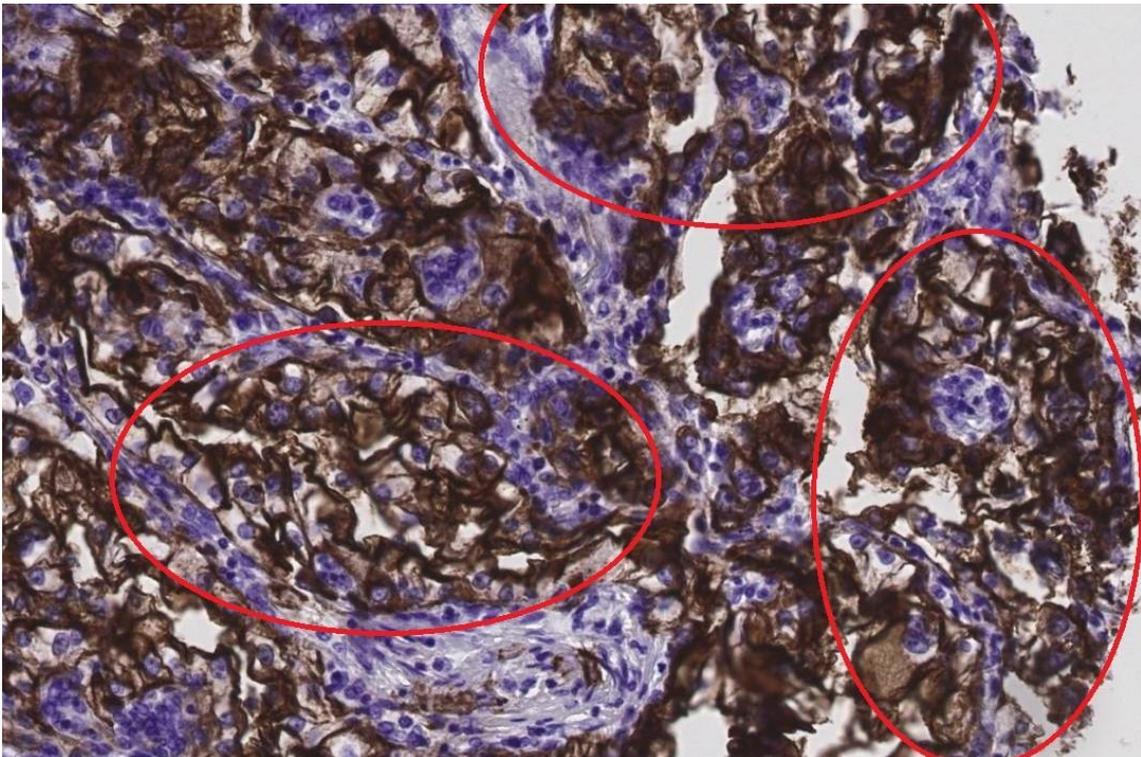


Abbildung 36: rote Markierung: membranöse MUC1-Färbung der Intensität 3 in einer RCC-Metastase (200-fache Vergrößerung)

Die Korrelation der IR-Scores der zytoplasmatischen MUC1-Expression mit denen der membranösen MUC1-Expression in den 151 Metastasenresektaten zeigt **Abbildung 37**. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,46. Das 95%-Konfidenzintervall liegt dabei bei 0,32 bis 0,57 und $p < 0,0001$.

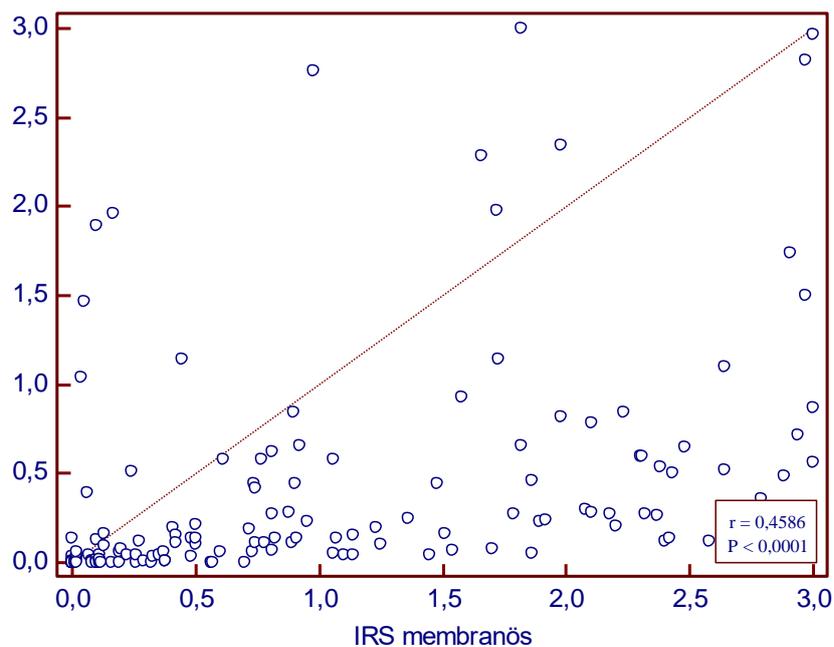


Abbildung 37: Korrelation der zytoplasmatischen (Y-Achse) und der membranösen (X-Achse) IR-Scores in RCC-Metastasen

Für die zytoplasmatische MUC1-Expression in ccRCC-Metastasen ergab sich ein minimaler IR-Score von 0,00 und ein maximaler IR-Score von 3,00. Der Mittelwert lag bei 0,37 und der Median betrug 0,12. Weitere Ergebnisse der statistischen Analyse der IR-Scores der zytoplasmatischen MUC1-Expression in ccRCC-Metastasen zeigen die **Tabellen 18 und 19**.

Tabelle 18: Statistische Analyse der IR-Scores der zytoplasmatischen MUC1-Expression in ccRCC-Metastasen

Anzahl der Proben	151
Minimaler bis maximaler IR-Score	0,00 – 3,00
Mittelwert ± Standardfehler	0,37 ± 0,05
Median	0,12

Tabelle 19: Perzentilen der IR-Scores der zytoplasmatischen MUC1-Expression in ccRCC-Metastasen

Perzentilen	IRS	95% Konfidenzintervall
2,5	0,00	0,00 bis 0,00
5	0,00	0,00 bis 0,00
10	0,00	0,00 bis 0,00
25	0,01	0,00 bis 0,034
75	0,46	0,27 bis 0,60
90	1,04	0,68 bis 1,87
95	1,94	1,14 bis 2,79
97,5	2,60	1,92 bis 3,00

Die membranöse MUC1-Expression in den ccRCC-Metastasen hatte einen minimalen IR-Score von 0,00 und einen maximalen IR-Score von 3,00. Der Mittelwert lag bei 0,92 und der Median betrug 0,57. Weitere Ergebnisse der statistischen Analyse sind in den **Tabellen 20 und 21** dargestellt.

Tabelle 20: Statistische Analyse der IR-Scores der membranösen MUC1-Expression in RCC-Metastasen

Anzahl der Proben	151
Minimaler bis maximaler IR-Score	0,00 – 3,00
Mittelwert ± Standardfehler	0,92 ± 0,08
Median	0,57

Tabelle 21: Perzentilen der membranösen MUC1-Expression in RCC-Metastasen

Perzentilen	IRS	95% Konfidenzintervall
2,5	0,00	0,00 bis 0,00
5	0,00	0,00 bis 0,00
10	0,00	0,00 bis 0,01
25	0,10	0,02 bis 0,13
75	1,72	1,14 bis 1,99
90	2,42	2,21 bis 2,77
95	2,86	2,49 bis 2,99
97,5	2,97	2,83 bis 3,00

Aus der statistischen Analyse wird deutlich, dass die Metastasen deutlich häufiger eine membranöse MUC1-Expression als eine zytoplasmatische MUC1-Expression aufweisen. Dies ist in **Abbildung 38** im Boxplot dargestellt.

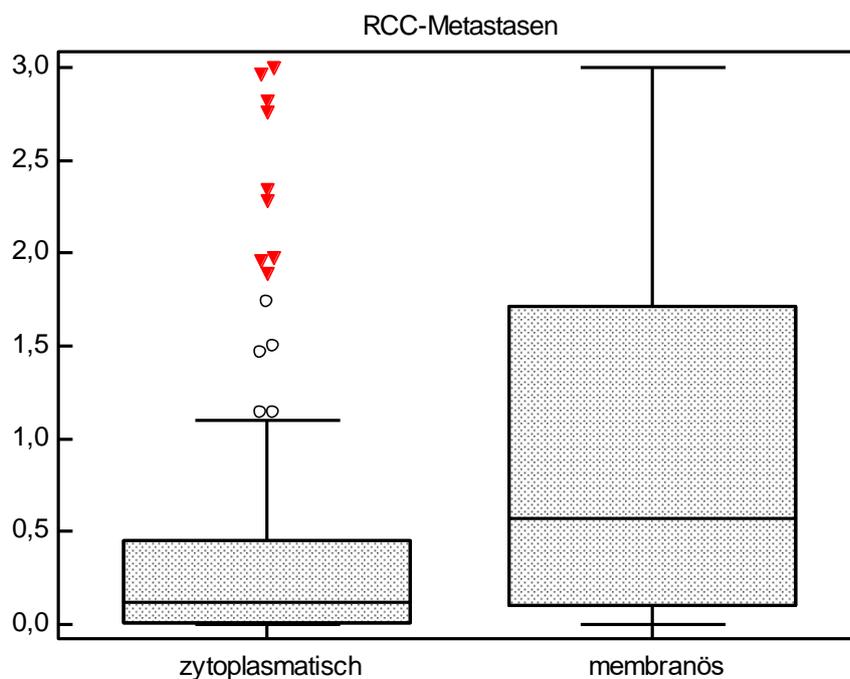


Abbildung 38: Boxplot-Darstellung der IR-Scores der MUC1-Expression in Metastasengewebe bei mRCC

Dabei zeigte sich die membranöse MUC1-Expression in den Metastasen überwiegend zirkumferenziell. Dies wurde jedoch nicht weiter quantifiziert.

3.2.3. Univariate Analysen IHC-Färbung vs. klinische Parameter

In den univariaten Analysen konnten mittels Chi-Quadrat-Test keine signifikanten Assoziationen zwischen zytoplasmatischer MUC1-Expression und klinisch-pathologischen Parametern festgestellt werden.

Eine signifikante Assoziation wurde zwischen der membranösen MUC1-Expression in den ccRCC-Metastasen und männlichem Geschlecht ($p=0,045$) und einer eingeschränkten Nierenfunktion ($p=0,040$) beobachtet. Die p-Werte der untersuchten Zusammenhänge zeigt **Tabelle 22**.

Tabelle 22: Korrelation der MUC1-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern bei Patienten mit mRCC (n = 76)

RCC-Metastasen			
	MUC1 zytoplasmisch >Median	MUC1 membranös >Median	MUC1 insgesamt positiv/ negativ
Anämie	$p=0,8970$	$p=0,3292$	$p=0,3802$
Geschlecht männlich/weiblich	$p=0,7043$	$p=0,0446$	$p=0,7021$
Thrombozytose	$p=0,8994$	$p=0,2959$	$p=0,9077$
LDH Erhöhung	$p=0,9412$	$p=0,1588$	$p=0,4548$
Erhöhtes Calcium	$p=0,6449$	$p=0,5356$	$p=0,2510$
CRP Erhöhung	$p=0,9728$	$p=0,7291$	$p=0,3354$
BMI >25kg/m ²	$p=0,4384$	$p=0,1105$	$p=0,0665$
BMI >30 kg/m ²	$p=0,8084$	$p=0,5326$	$p=0,5326$
Karnofsky <80%	$p=0,8577$	$p=0,3700$	$p=0,8227$
gamma-GT Erhöhung	$p=0,8172$	$p=0,7538$	$p=0,7740$
Leukozytose	$p=0,4920$	$p=0,9161$	$p=0,7101$
Kreatinin Erhöhung	$p=0,1721$	$p=0,0401$	$p=0,0850$

3.2.4. Univariate Analysen IHC-Färbung vs. Lokalisation Metastasen

Eine Übersicht über die IR-Scores im Metastasengewebe verschiedener Lokalisationen liefert **Tabelle 23**.

Tabelle 23: Differentielle Expression von MUC1 in verschiedenen Metastasenlokalisationen (n = 151; SEM = standard error of the mean)

	n	Mittelwert IRS zytoplasmatisch ± SEM	Median IRS zytoplasmatisch	Mittelwert IRS membranös ± SEM	Median IRS membranös
Lunge	40	0,48±0,11	0,24	1,22±0,15	1,02
Leber	8	0,09±0,06	0,00	0,58±0,38	0,00
Pleura	2	0,61±0,33	0,61	1,84±0,26	1,84
Nebenniere	10	0,16±0,04	0,14	0,71±0,20	0,46
Lymphknoten	18	0,31±0,12	0,11	0,74±0,22	0,23
Pankreas	5	0,15±0,13	0,01	0,68±0,47	0,11
Weichteilgewebe	21	0,28±0,07	0,16	1,02±0,21	0,88
Haut	2	2,58±0,24	2,58	2,48±0,50	2,48
Larynx	1	0,04±0,00	0,04	0,26±0,00	0,26
Thyroidea	1	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00	0,00
Knochen	22	0,33±0,13	0,05	0,67±0,19	0,20
Lokalrezidiv	6	0,29±0,24	0,04	0,42±0,19	0,32
Truncus sympathicus	1	0,00±0,00	0,00	0,12±0,00	0,12
Muskel	4	0,49±0,42	0,09	1,18±0,58	0,67
Mesenterium	1	0,60±0,00	0,60	2,31±0,00	2,31
Dünndarm	3	0,12±0,05	0,11	0,38±0,08	0,42
Omentum	1	0,84±0,00	0,84	2,23±0,00	2,23
Mediastinum	1	2,97±0,00	2,97	3,00±0,00	3,00
Uterus	1	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00	0,00
Milz	1	0,00±0,00	0,00	0,26±0,00	0,26
Hoden	1	0,04±0,00	0,04	0,11±0,00	0,11
Peritoneum	1	0,06±0,00	0,06	0,37±0,00	0,37

Stellt man die IR-Scores graphisch dar, so fällt auf, dass die MUC1-Expression im Metastasengewebe vornehmlich membranös vorzufinden ist. Allerdings ist auffällig, dass sich die MUC1-Expression abhängig von der Lokalisation der Metastase deutlich unterscheidet.

So weisen pulmonale, pleurale, mediastinale und dermale Metastasen eine hohe MUC1-Expression auf. Im Gegensatz dazu weisen intestinale, hepatische, ossäre und adrenale Metastasen lediglich einen niedrigen bis moderaten MUC1-Expressionsgrad auf. **Abbildungen 39 und 40** zeigen die IR-Scores der zytoplasmatischen (**Abbildung 39**) und membranösen (**Abbildung 40**) MUC1-Färbung abhängig von den verschiedenen Lokalisationen der Metastasen.

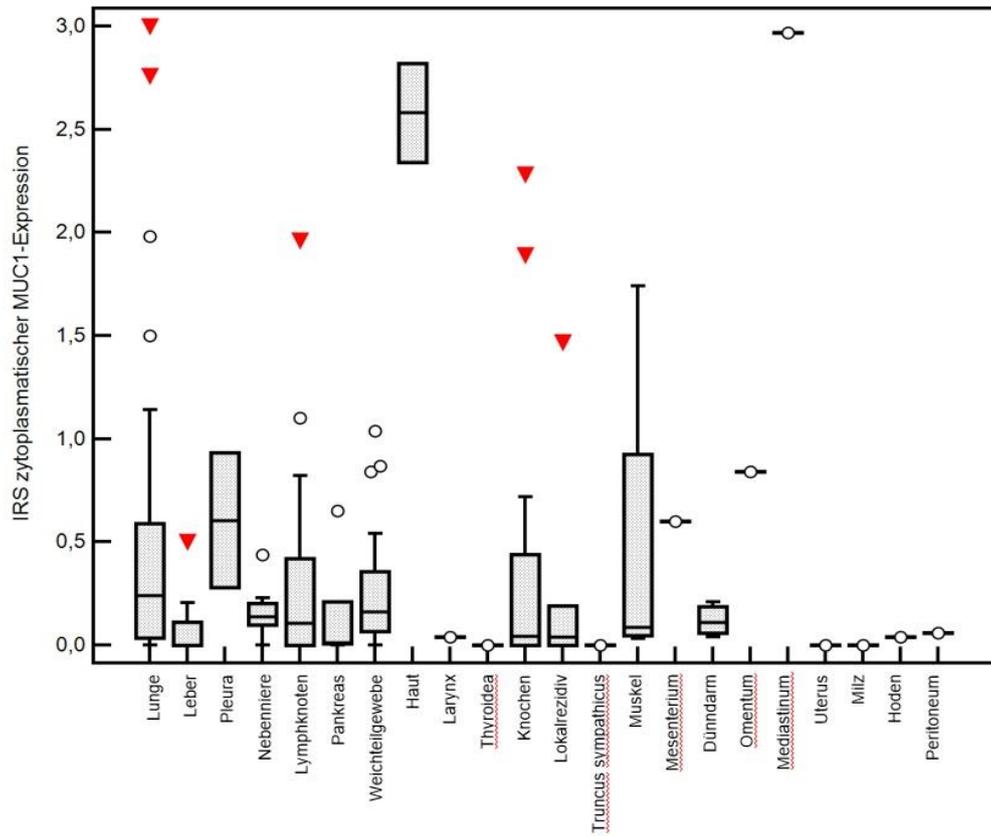


Abbildung 39: zytoplasmatische MUC1-Expression in Abhängigkeit der Metastasenlokalisation¹¹⁹

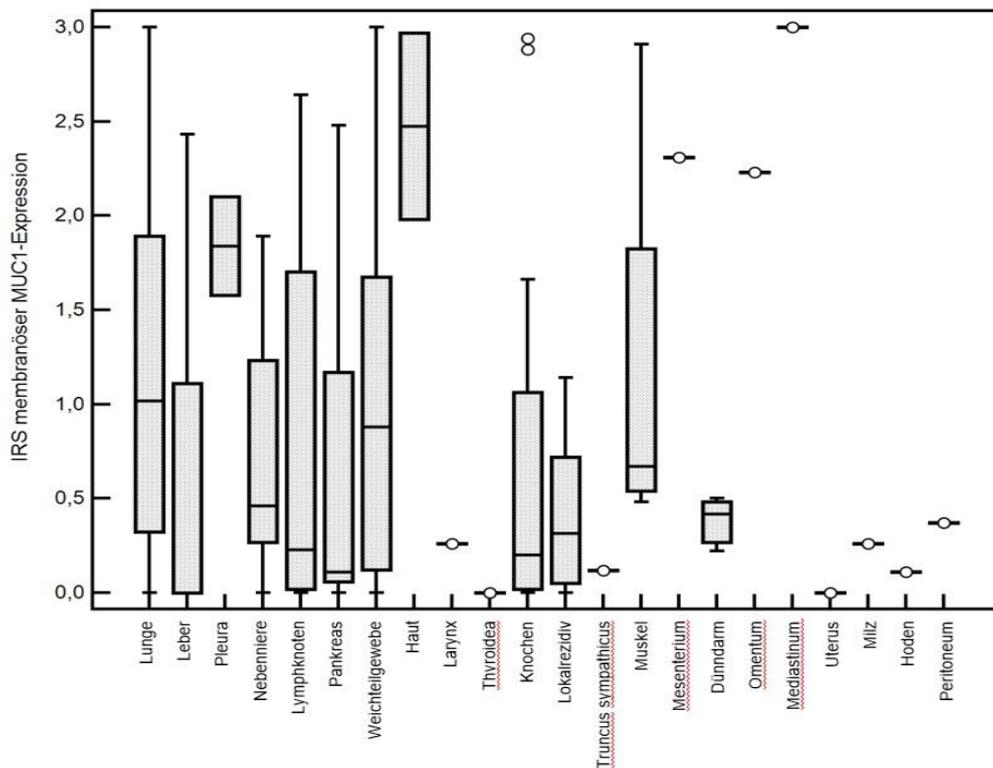


Abbildung 40: membranöse MUC1-Expression in Abhängigkeit der Metastasenlokalisation¹¹⁹

Vergleicht man zusätzlich das Expressionsmuster von pulmonalen Metastasen mit nicht-pulmonalen Metastasen, so fällt auf, dass pulmonale Metastasen eine signifikant stärkere membranöse MUC1-Expression aufweisen ($p=0,014$). Im Gegensatz dazu zeigte sich kein signifikanter Unterschied der zytoplasmatischen MUC1-Expression zwischen pulmonalen und nicht-pulmonalen Metastasen ($p=0,113$). Die entsprechend verteilten IR-Scores der zytoplasmatischen und membranösen MUC1-Färbungen zeigen die **Abbildungen 41 und 42**.

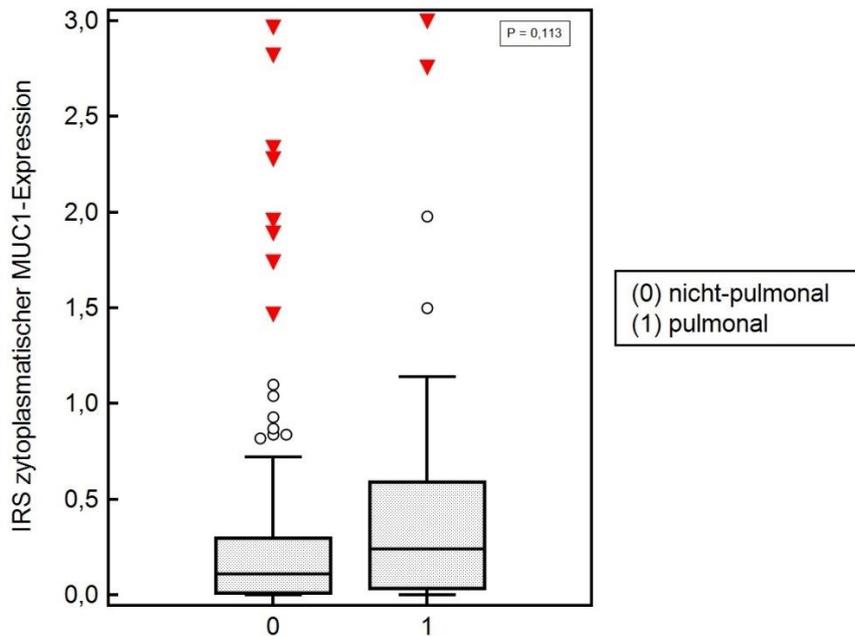


Abbildung 41: zytoplasmatische MUC1-Expression in Abhängigkeit von pulmonaler oder nicht-pulmonaler Lokalisation der Metastasen¹¹⁹

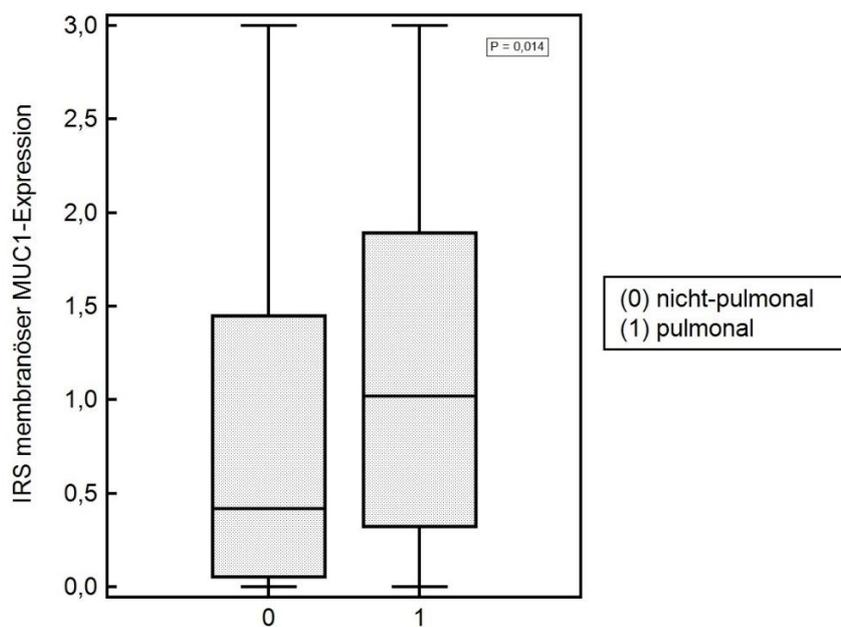


Abbildung 42: membranöse MUC1-Expression in Abhängigkeit von pulmonaler oder nicht-pulmonaler Lokalisation der Metastasen¹¹⁹

3.2.5. Univariate Analysen IHC-Färbung vs. Survival

Das mediane Gesamtüberleben der Patienten im mRCC-Kollektiv betrug 66,14 Monate (95% KI 51,30 bis 66,14). Das mediane Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen MUC1-Expression zeigte keinen signifikanten Unterschied. War die zytoplasmatische MUC1-Expression kleiner/gleich dem Median, lebten die Patienten im Median 66,14 Monate (95% KI 43,05 bis 66,14). Lag die zytoplasmatische MUC1-Expression hingegen oberhalb des Medians, lag das mediane Gesamtüberleben der Patienten in diesem Kollektiv bei 64,57 Monaten (95% KI 36,88 bis 64,57).

Patienten mit einem hohen membranösen MUC1-Expressionsgrad zeigten ein medianes Gesamtüberleben von 51,30 Monaten (95% KI 23,91 bis 51,30), während Patienten mit niedrigem membranösen MUC1-Expressionsgrad im Median 66,14 Monate (95% KI 57,96 bis 66,14) lebten. Allerdings konnte auch in diesem Kollektiv keine signifikante Assoziation zwischen dem Outcome der Patienten und der zytoplasmatischen ($p=0,767$), membranösen ($p=0,118$) oder gesamten ($p=0,518$) MUC1-Expression beobachtet werden. Die **Abbildungen 43 bis 45** zeigen die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven.

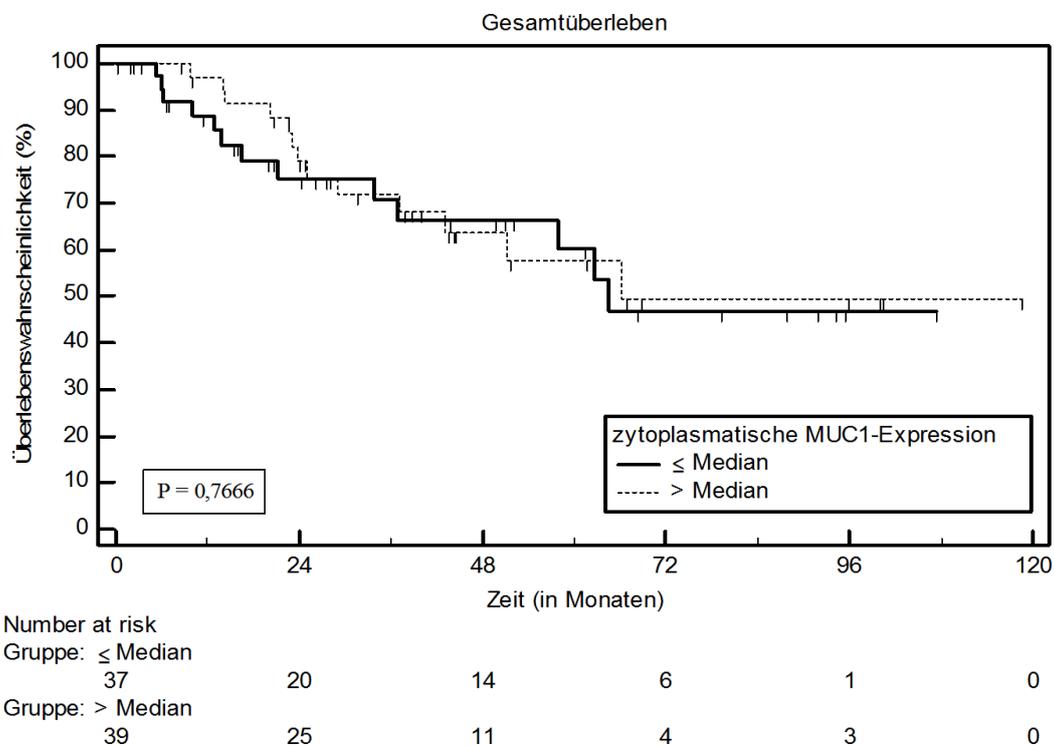
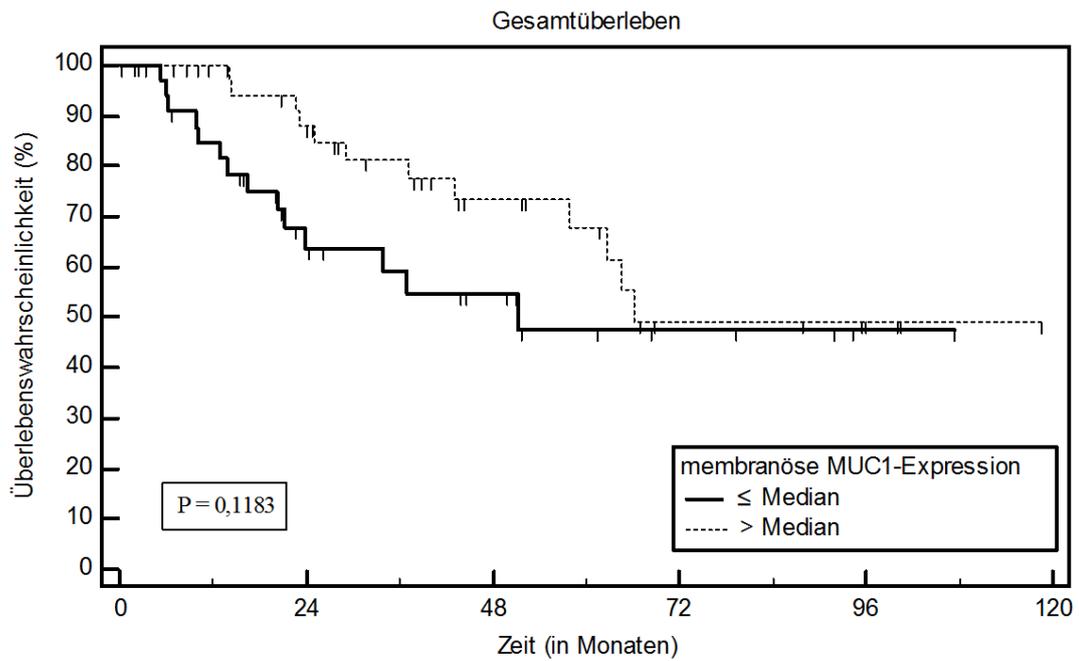


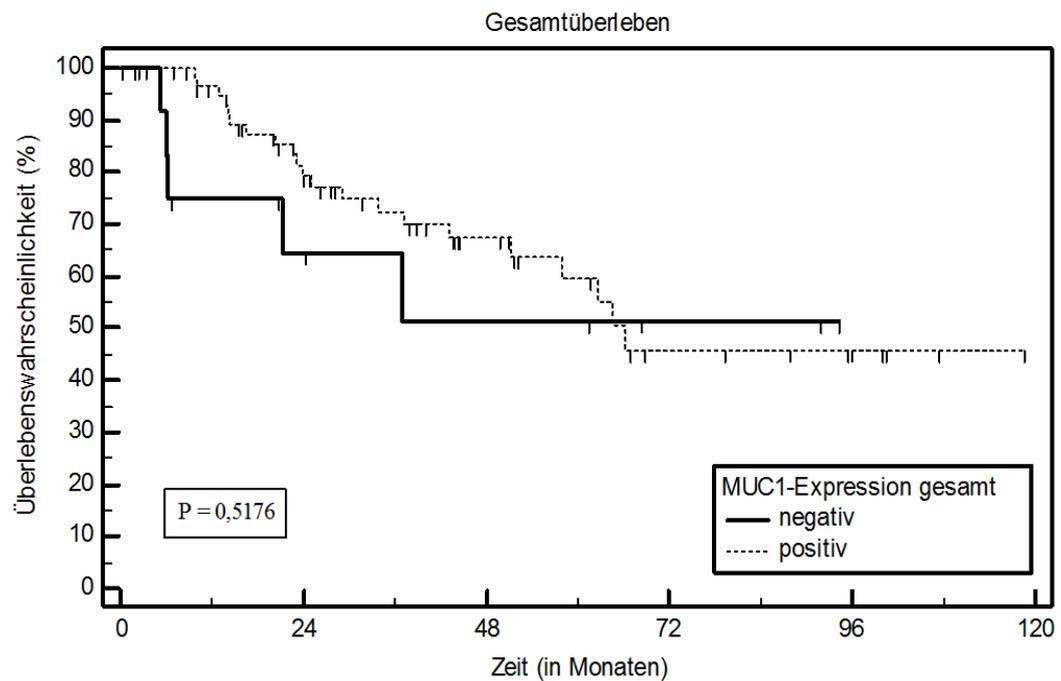
Abbildung 43: Kaplan-Meier-Kurven für zytoplasmatische MUC1-Expression oberhalb bzw. unterhalb des Medians ($p=0,767$)



Number at risk

Gruppe: ≤ Median	35	16	10	4	1	0
Gruppe: > Median	41	29	15	6	3	0

Abbildung 44: Kaplan-Meier-Kurven für membranöse MUC1-Expression oberhalb bzw. unterhalb des Medians (p=0,118)



Number at risk

Gruppe: negativ	13	6	4	2	0	0
Gruppe: positiv	63	39	21	8	4	0

Abbildung 45: Kaplan-Meier-Kurven für die gesamte MUC1-Expression (zytoplasmatisch und/oder membranös) (p=0,518)

Mittels der univariaten Cox-Regressionsanalyse wurden eine Anämie ($p=0,028$), erhöhte LDH-Spiegel ($p=0,045$), ein Fuhrmann-Grading $>G2$ ($p=0,030$) und ein Karnofsky *Performance Status* von $<80\%$ ($p=0,031$) als signifikante Determinanten des Gesamtüberlebens bei Patienten mit mRCC beobachtet. In diesem Zusammenhang hat ein Grading $>G2$ zu einem 2,40-fachen Risiko zu Versterben geführt. Bei Vorliegen einer Anämie ist das Risiko zu versterben auf das 2,50-fache gesteigert und im Rahmen einer LDH-Erhöhung ist das Risiko auf das 3,05-fache gesteigert. Liegt der Karnofsky *Performance Status* <80 , ist das Risiko zu versterben auf das 2,93-fache erhöht.

Eine genaue Auflistung der statistischen Analyse der getesteten klinisch-pathologischen Parameter findet sich in **Tabelle 24**.

Tabelle 24: Assoziation klinisch-pathologischer Parameter mit dem Gesamtüberleben¹¹⁹

Kovariate	HR	95% KI von HR	p-Wert
Klinisches Stadium $>T2$ vs. $\leq T2$	1,69	0,76 bis 3,77	0,2020
Fuhrman-Grade $>G2$ vs. $\leq G2$	2,40	1,10 bis 5,24	0,0295
MUC1 zytoplasmatisch $>$ Median vs. \leq Median	0,89	0,41 bis 1,92	0,7668
MUC1 membranös $>$ Median vs. \leq Median	0,54	0,25 bis 1,18	0,1239
MUC1 insgesamt positiv vs. negativ	0,72	0,27 bis 1,92	0,5196
Anämie vs. normwertiges Hb	2,50	1,11 bis 5,64	0,0283
Geschlecht männlich vs. weiblich	1,67	0,72 bis 3,84	0,2316
Thrombozytose vs. normwertige Thrombozytenzahl	1,63	0,72 bis 3,72	0,2448
LDH Erhöhung vs. normwertige LDH	3,05	1,03 bis 8,99	0,0447
Erhöhtes Calcium vs. normwertiges Calcium	3,10	0,72 bis 13,31	0,1298
CRP Erhöhung vs. normwertiges CRP	3,00	0,89 bis 10,09	0,0771
BMI $>30\text{kg/m}^2$ vs. $\leq 30\text{kg/m}^2$	0,88	0,31 bis 2,55	0,8173
Karnofsky $<80\%$ vs. $\geq 80\%$	2,93	1,11 bis 7,71	0,0306
γ -GT Erhöhung vs. normwertige γ -GT	1,78	0,73 bis 4,35	0,2083
Leukozytose vs. normwertige Leukozytenzahl	1,92	0,57 bis 6,49	0,2962
Kreatinin-Erhöhung vs. normwertiges Kreatinin	0,69	0,31 bis 1,54	0,3635

3.2.6. Multivariate Analysen Survival

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich lediglich ein Grading $>G2$ als unabhängiger prognostischer Faktor ($p=0,036$). Die Ergebnisse der multivariaten Analyse zeigt **Tabelle 25**.

Tabelle 25: multivariate Cox-Regressionsanalyse bei mRCC¹⁹

Kovariate	HR	95% KI von HR	p-Wert
Fuhrman-Grade >G2 vs. ≤G2	2,80	1,07 bis 7,32	0,0362
Anämie vs. normwertiges Hb	1,22	0,42 bis 3,52	0,7196
LDH Erhöhung vs. normwertige LDH	1,75	0,43 bis 7,13	0,4392
Karnofsky <80% vs. ≥80%	1,71	0,49 bis 5,99	0,4057

3.3. Vergleich Expression MUC1 in RCC und mRCC

Abbildung 46 illustriert die IR-Scores für die zytoplasmatische und **Abbildung 47** für die membranöse MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym, Gewebe der ccRCC-Primärtumore und ccRCC-Metastasengewebe.

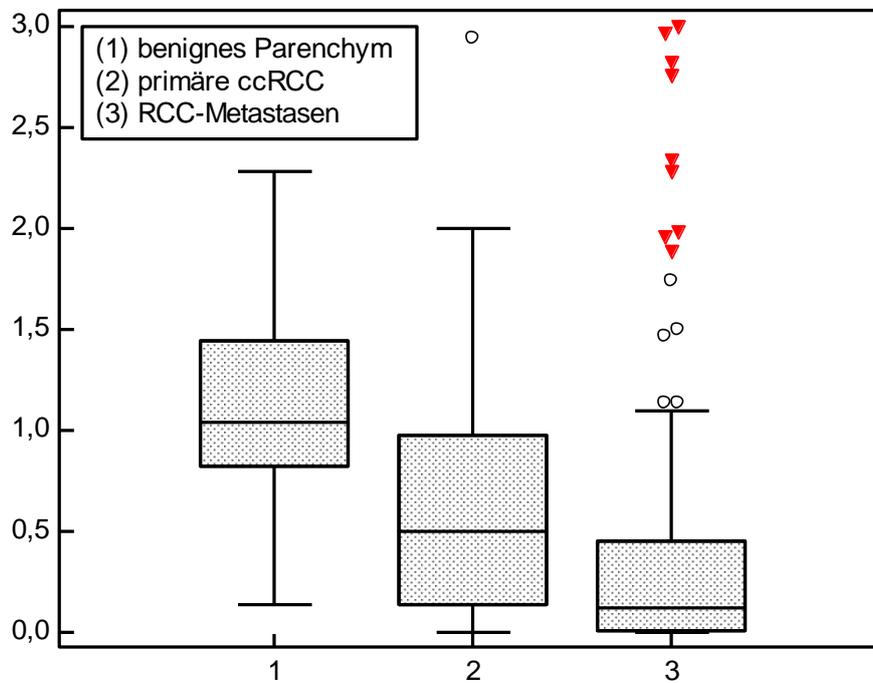


Abbildung 46: Boxplot-Darstellung der IRS der zytoplasmatischen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym, primären ccRCC und ccRCC-Metastasen¹⁹

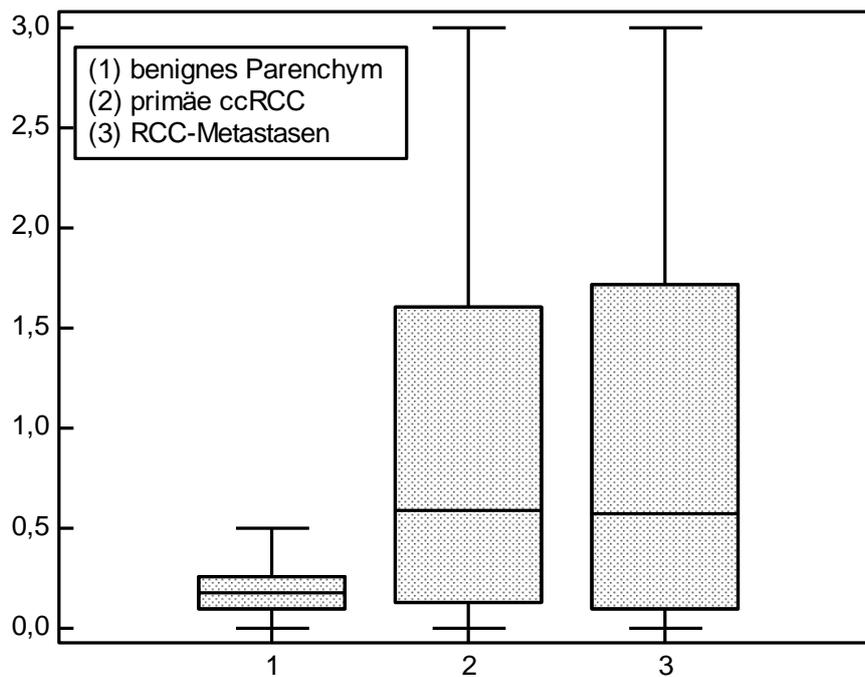


Abbildung 47: Boxplot-Darstellung der IRS der membranösen MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym, primären ccRCC und ccRCC-Metastasen¹¹⁹

Die mediane zytoplasmatische Expression von MUC1 ist in benignem Gewebe am ausgeprägtesten (medianer IRS=1,04). Das Metastasengewebe zeigte die geringste zytoplasmatische MUC1-Expression (medianer IRS=0,12) und das Gewebe der Primärtumore nahm diesbezüglich eine Mittelstellung ein (medianer IRS=0,50). Die Unterschiede zwischen den drei Gruppen in Bezug auf die zytoplasmatische MUC1-Expression zeigen sich in der Kruksal-Wallis-Analyse als signifikant.

Im Gegensatz dazu ist die membranöse Expression von MUC1 in benignem Nierenparenchym im Median am geringsten ausgeprägt (medianer IRS=0,21), während die membranöse Expression von MUC1 in Primärtumoren (medianer IRS=0,59) und Metastasengewebe (medianer IRS=0,57) jeweils deutlich stärker ist. Allerdings besteht zwischen der membranösen MUC1-Expression der Primärtumore und der Metastasen gemäß Kruksal-Wallis-Analyse kein signifikanter Unterschied. Der Vergleich zwischen benignem Nierenparenchym und malignem Gewebe, also Primärtumor- und Metastasengewebe, zeigte hingegen in Bezug auf die membranöse MUC1-Expression jeweils einen signifikanten Unterschied.

Eine genaue Übersicht über die IR-Scores der verschiedenen Subgruppen zeigt **Tabelle 26**.

Tabelle 26: IR-Scores für zytoplasmatische und membranöse MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym, primärem ccRCC und RCC-Metastasen (*p = aus der Kruskal-Wallis-Analyse; SEM = standard error of the mean) ¹¹⁹

	IRS- MUC1 zytoplasmatische Expression				IRS- MUC1 membranöse Expression			
	Ge- samt- kollek- tiv	(1) Benig- nes Paren- chym	(2) Primäre RCC	(3) RCC Metas- tasen	Ge- samt- kollek- tiv	(1) Benig- nes Paren- chym	(2) Primäre RCC	(3) RCC Metas- tasen
Größe der Stichprobe	262	50	61	151	262	50	61	151
Minimaler IR-Score	0	0,14	0	0	0	0	0	0
Maximaler IR-Score	3	2,70	2,94	3	3	1	3	3
Mittelwert ± SEM	0,58 ±0,04	1,16 ±0,07	0,69 ±0,09	0,37 ±0,05	0,77 ±0,05	0,30 ±0,02	0,91 ±0,11	0,92 ±0,08
95% KI des Mittelwerts	0,50 bis 0,67	1,01 bis 1,32	0,52 bis 0,87	0,27 bis 0,47	0,66 bis 0,87	0,23 bis 0,37	0,69 bis 1,12	0,77 bis 1,07
Median	0,31	1,04	0,5	0,12	0,36	0,21	0,59	0,57
95% KI des Medians	0,22 bis 0,49	0,84 bis 1,34	0,36 bis 0,76	0,06 bis 0,16	0,26 bis 0,49	0,16 bis 0,36	0,36 bis 1,07	0,38 bis 0,81
Unter- schied zu den Gruppen (<0.01)*		(2)(3)	(1)(3)	(2)(3)		(2)(3)	(1)	(1)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die zytoplasmatische Expression vom benignem Nierenparenchym über das Gewebe primärer ccRCC hin zum Metastasengewebe abnimmt. Im Gegensatz dazu weist benignes Nierenparenchym die geringste membranöse MUC1-Expression auf, während sich die Expression zwischen primären ccRCC und Metastasengewebe nicht signifikant unterscheidet.

Sechs Patienten haben sich sowohl einer Resektion des Primärtumors mittels Nephrektomie bzw. Nierenteilresektion, als auch einer Metastasenresektion unterzogen. Somit war Gewebe dieser Patienten in beiden Kollektiven vorhanden. Bei den Patienten 1 und 2 wurden die Metastasen dabei metachron erst im Verlauf diagnostiziert. Bei den Patienten 3 bis 6 handelte es sich um synchron diagnostizierte Metastasen.

Tabelle 27 zeigt die Eigenschaften der MUC1-Expression im Primärtumor- und Metastasengewebe jeweils des gleichen Patienten im Vergleich.

Tabelle 27: Direkter Vergleich der MUC1-Expression in primären ccRCC und ccRCC-Metastasen des gleichen Patienten (Abk.: M > T: MUC1-Expression in Metastasengewebe stärker als im Tumorgewebe; T > M: MUC1-Expression in Tumorgewebe stärker als in Metastasengewebe; T = M: MUC1-Expression in Tumorgewebe und Metastasengewebe gleich; T1 > M > T2: MUC1-Expression in Metastasengewebe zwischen beiden Stanzes des Tumors; C: zytoplasmatische MUC1-Expression; M: membranöse MUC1-Expression)

	MUC1-Intensität			MUC1 Frequenz zytoplasmatisch		MUC1 Frequenz membranös				IRS zytoplasmatisch			IRS membranös			MUC1-Expressionsmuster		
	M > T	T > M	T = M	T1 > M > T2	T > M	T > M	T1 > M > T2	M > T	T = M	M > T	T > M	T1 > M > T2	T > M	T1 > M > T2	M > T	T = M	Alle Proben C+M	Tumor M+C, in Metastase eher M
Pat 1	x			x			x			x			x				x	
Pat 2		x		x		x				x			x				x	
Pat 3		x			x	x					x		x					x
Pat 4	x				x		x				x			x			x	
Pat 5			x	x				x				x			x		x	
Pat 6		x			x				x		x					x	x	

Beim Betrachten der Tabelle wird deutlich, dass sich die MUC1-Expression zwischen dem Primärtumor und den Metastasen in den meisten Fällen unterscheidet.

Die MUC1-Intensität ist lediglich bei Patient 5 im Primärtumor identisch mit der im Metastasengewebe.

Die zytoplasmatische MUC1-Frequenz im Metastasengewebe liegt bei 50% der Patienten zwischen der, der beiden Tumorstanzen, sodass man davon ausgehen kann, dass die Frequenz sich nicht wesentlich unterscheidet. Bei den übrigen 50% der Patienten liegt die zytoplasmatische MUC1-Frequenz im Primärtumor über der im Metastasengewebe.

Die membranöse MUC1-Frequenz ist bei Patient 6 im Gewebe des Primärtumors und im Metastasengewebe gleich. Bei den übrigen Patienten unterscheidet sich die membranöse MUC1-Frequenz, wobei sie bei den Patienten 2 und 3 im Tumor größer ist und bei dem Patienten 5 in der Metastase größer ist. Bei den Patienten 1 und 4 liegt die membranöse MUC1-Frequenz des Metastasengewebes zwischen der beider Tumorstanzen.

Die IR-Scores sind sowohl zytoplasmatisch als auch membranös bei jeweils 50% der Patienten im Tumor größer als im Metastasengewebe.

Das MUC1-Expressionsmuster ist bei fast allen Patienten zytoplasmatisch und membranös. Lediglich bei Patient 3 liegt im Gewebe des Primärtumors eine

zytoplasmatische und membranöse MUC1-Expression vor, während im Metastasengewebe eine membranöse Expression überwiegt.

4. Diskussion

Mit ca. 15000 Neuerkrankungen pro Jahr¹²⁴, machen RCC in etwa 3% der Malignome in Deutschland aus. Trotz steigender Inzidenz sind die Mortalitätsraten konstant.⁸¹ So sterben 5,4 von 100000 Männern und 2,7 von 100000 Frauen an einem RCC¹²⁴, obwohl die Karzinome zunehmend in frühen Stadien entdeckt werden. In fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung ist die Prognose aufgrund fehlender Strahlen- und Chemosensibilität der Tumore deutlich schlechter.⁹⁷

Somit wird aktuell an verschiedenen Ansätzen für zielgerichtete Therapien gearbeitet, wobei in diesem Zusammenhang bereits 10 Medikamente zur Therapie von fortgeschrittenen RCC von der EMA und der FDA zugelassen sind. Dazu gehören die Multikinaseinhibitoren Sunitinib, Sorafenib, Pazopanib, Axitinib, Lenvatinib und Cabozantinib, der anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab und die mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus und der Checkpoint-Inhibitor Nivolumab.^{11,25,110}

Im Rahmen der Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien stellt MUC1 als Onkoprotein ein Target aktueller Forschungsansätze dar. Eine MUC1-Überexpression konnte für verschiedene Tumorentitäten gezeigt werden⁵⁵ und es laufen bereits verschiedene klinische Studien mit Substanzen, die auf MUC1 als Target einwirken.⁷⁰

Auch für RCC konnte bereits in diversen Studien eine vermehrte oder auch veränderte Expression von MUC1 gezeigt werden.^{24,74,78}

Cao et al. beispielsweise haben mittels IHC die MUC1-Expression in RCC und normalem Nierengewebe verglichen. Dabei zeigten fast alle Zellen der RCC eine starke MUC1-Expression, während die MUC1-Expression in gesundem Nierenparenchym auf die distalen Tubuli und die Sammelrohre beschränkt war.²⁴ Aufgrund der MUC1-Expression und der Zellmorphologie vermuteten Cao et al. sogar, dass ccRCC eher den Zellen der distalen Tubuli und des Sammelrohrsystems entspringen. So fanden sich klare Zellen mit exzessiver Glykogenspeicherung, wenn überhaupt im gesunden Nierengewebe, dann am häufigsten in den Sammelrohren.²⁴ Dies steht allerdings im

Widerspruch zu der allgemeinen Lehrmeinung, dass ccRCC von Zellen der proximalen Tubuli ausgehen.¹⁵⁵

Andere Studien gehen im Rahmen der Untersuchung der MUC1-Expression nicht nur auf den quantitativen Expressionsgrad, sondern auch auf das Expressionsmuster von MUC1 ein.

So wird in der Literatur häufig ein verändertes Expressionsmuster von MUC1 in RCC-Gewebe im Vergleich zu gesundem Nierengewebe beschrieben. Dabei unterscheidet sich das aberrante Expressionsmuster auch zwischen den verschiedenen RCC-Subtypen. Während für chromophobe RCC eher eine diffuse zytoplasmatische MUC1-Expression beschrieben wird, zeigen papilläre und klarzellige RCC v.a. eine membranöse MUC1-Expression. Dabei kann diese überwiegend apikal oder zirkumferenziell sein und ist zum Teil auch mit einer diffusen zytoplasmatischen MUC1-Expression kombiniert.⁷⁴ Langner et al. beobachteten im Rahmen einer Studie kein einziges klarzelliges oder papilläres RCC mit diffuser zytoplasmatischer MUC1-Expression ohne zusätzliche membranöse MUC1-Expression.⁷⁴

Da sich die vorliegende Arbeit auf ccRCC beschränkt hat, kann keine Aussage über das MUC1-Expressionsmuster der anderen Subtypen gemacht werden. Aber auch in dieser Arbeit zeigten die malignen Gewebe beider Kollektive, also ccRCC-Primärtumore und ccRCC-Metastasen, eine deutlich geringere zytoplasmatische MUC1-Expression und eine deutlich stärkere membranöse MUC1-Expression als das benigne Nierenparenchym. Während die IR-Scores der zytoplasmatischen MUC1-Färbungen für benignes Nierenparenchym im Median bei 1,04 lagen, betragen die IR-Scores der zytoplasmatischen Färbung bei den Primärtumoren im Median 0,50 und bei den RCC-Metastasen sogar nur 0,12.

Im Gegensatz dazu zeigte das benigne Nierenparenchym mit IR-Scores im Median von 0,21 eine deutlich geringere membranöse MUC1-Expression als die Primärtumore mit einem medianen IR-Score von 0,59 und den Metastasen mit einem medianen IR-Score von 0,57. Somit scheint eine zytoplasmatische Expression von MUC1 in Tumor- und Metastasengewebe von geringerer Relevanz zu sein, wobei sie jedoch ein deutlicher Marker zur Unterscheidung zwischen benignem und malignem Gewebe zu sein scheint. Dabei scheint es bei fortschreitender Karzinogenese zu zunehmendem Verlust von zytoplasmatischem MUC1 zu kommen. So zeigt sich in den ccRCC-Primärtumoren eine geringere zytoplasmatische MUC1-Expression als im benignen Nierenparenchym und im Rahmen der metastatischen Absiedlung von malignen Zellen scheint es zum

weiteren Verlust von zytoplasmatischem MUC1 gekommen zu sein. So könnte der zytoplasmatische MUC1-Expressionsgrad auch einen Hinweis auf die Aggressivität des Tumors oder das biologische Verhalten des Tumors geben, wobei ein niedriger zytoplasmatischer MUC1-Expressionsgrad für eine höhere Malignität sprechen würde. Gegen diese Annahme spricht dabei, dass im Rahmen dieser Arbeit weder zwischen der zytoplasmatischen MUC1-Expression in den Primärtumoren, noch der zytoplasmatischen MUC1-Expression der Metastasen, ein signifikanter Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern gezeigt werden konnte. Generell lässt sich also festhalten, dass das Wissen über die klinische Relevanz der zytoplasmatischen MUC1-Expression limitiert ist.

In Bezug auf die membranöse Expression von MUC1 sind Leroy et. al. im Speziellen auf das Muster der Expression eingegangen. Dabei wurde MUC1 im normalen Nierenparenchym membranös nur apikal in den Zellen der distalen Tubuli und der Sammelrohre nachgewiesen. In RCC-Zellen war die MUC1-Expression hingegen deutlich heterogener und überwiegend diffus und zirkumferenziell membranös. Die apikale Polarität, die bei den benignen Nierenzellen beobachtet wurde, ist also in den Tumorzellen weitgehend verloren gegangen.⁷⁸

Dahingegen wurde in dieser Arbeit nur zwischen zytoplasmatischer und membranöser Expression unterschieden und nicht weitergehend zwischen apikal membranöser und zirkumferenziell membranöser Expression. Dennoch können, wenn auch nicht quantitativ nachgewiesen, empirische Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, die Beobachtungen von Leroy et al. bestätigen. Auch in dieser Arbeit war die membranöse MUC1-Expression in Primärtumoren und ccRCC-Metastasen vorwiegend zirkumferenziell. Leroy et al. nutzen neben der IHC auch die RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) und in-situ-Hybridisierung zum Nachweis von MUC1. Im Gegensatz zur IHC zeigte sich in der RT-PCR kein signifikanter Unterschied zwischen MUC1-Expression in gesundem und malignem Nierengewebe.⁷⁸ In der in-situ-Hybridisierung wurde MUC1 in den Karzinomzellen vorwiegend intrazytoplasmatisch nachgewiesen, wobei die Intensität nur schwach bis mittel war.⁷⁸

Die zirkumferenzielle Expression von MUC1 in malignem Gewebe im Vergleich zur apikalen MUC1-Expression in benignem Gewebe ist auch in der Pathogenese von Karzinomen von Relevanz. Wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, kommt es im Rahmen des Polaritätsverlusts der Zellen zur Interaktion von normalerweise apikal lokalisiertem

MUC1 und normalerweise basolateral lokalisierten Tyrosinkinase wie EGFR, was zur konstitutiven Aktivierung und damit einhergehend zu Tumorentstehung bzw. -progress führen kann.⁸⁵

Im Gegensatz zu den meisten anderen Studien wurde in dieser Arbeit über die MUC1-Expression der Primärtumore hinaus auch die MUC-Expression im Metastasengewebe untersucht. Generell gibt es bisher nur sehr wenige Studien, die die MUC1-Expression in Metastasengewebe untersucht haben. Wenn Metastasengewebe untersucht wurde, dann häufig in Metastasen anderer Tumorentitäten.

Cozzi et al. haben die MUC1-Expression in primären Prostatakarzinomen und deren regionären Lymphknoten verglichen. Dabei zeigte sich für 58% der Primärtumore und 90% der Lymphknotenmetastasen eine Überexpression von MUC1.³²

Auch Metastasen von mRCC wurden zuvor bereits auf ihre MUC1-Expression untersucht. Dabei haben Leroy et al. an einem kleinen Kollektiv von 22 Metastasen beobachtet, dass 86% der untersuchten Metastasen MUC1 exprimiert haben, wobei die Expression zirkumferenziell membranös oder zytoplasmatisch war.⁸⁰ Auch in der vorliegenden Arbeit haben die Metastasen in 82,9% der Fälle MUC1 exprimiert. Die Expression war überwiegend membranös, sodass der mediane IR-Score der zytoplasmatischen Färbungen bei 0,12 und der membranösen Färbungen bei 0,57 lag. Das genaue Expressionsmuster im Sinne von membranös apikal versus membranös zirkumferenziell wurde im Gegensatz zur Studie von Leroy et al. nicht in die Auswertung miteinbezogen. Zudem haben Leroy et al. beobachtet, dass in 10 der 22 Fälle die MUC1-positiven Zellen vornehmlich um große Blutgefäße herum lokalisiert waren.⁸⁰ Die Lokalisation der MUC1-positiven Zellen innerhalb des Tumors wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit hingegen nicht untersucht.

Leroy et al. lagen im Rahmen ihrer Studie für zehn Patienten Gewebeproben der korrespondierenden Primärtumore vor. Davon zeigten sich 90% MUC1-positiv.⁸⁰

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit lagen für sechs Patienten sowohl Gewebeproben der Metastasen als auch der korrespondierenden primären ccRCC vor. Dabei konnte in dieser kleinen Stichprobe kein systematischer Unterschied zwischen der MUC1-Expression der Primärtumore und ihren Metastasen erkannt werden, wobei alle Proben MUC1-positiv waren. Somit erscheint es zwar sinnvoll weiterführende Studien mit größeren Kollektiven durchzuführen, jedoch zeigen die Ergebnisse der vorliegenden

Arbeit eine deutliche Heterogenität in Bezug auf die MUC1-Expression in verschiedenen malignen Geweben eines Patienten.

Auch wenn bisher kein systematischer Zusammenhang zwischen der MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren und ccRCC-Metastasengewebe gefunden werden konnte, gibt es doch verschiedene Studien, die zumindest einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der MUC1-Expression und der Metastasierungsrate von verschiedenen Malignomen zeigen konnten. Dies ist beispielsweise bei gastrointestinalen Adenokarzinomen^{10,58,64,76,90,96,147}, ösophagealen Plattenepithelkarzinomen¹²⁸, Adenokarzinomen des Endometriums¹³⁷ und NSCLC⁴⁶ der Fall. Auch in Bezug auf ccRCC wird eine vermehrte Expression von MUC1 häufig mit einer vermehrten Metastasierung in Verbindung gebracht^{9,68,74,79}

So zeigten Leroy et al., dass Patienten mit Metastasen eine signifikant stärkere MUC1-Expression als Patienten ohne Metastasen haben.⁷⁹ Zudem stieg das Risiko für eine viszerale Metastasierung in ihrer Studie ab einem Anteil von 70% MUC1-positiven Zellen signifikant an, während von den Patienten mit weniger als 10% MUC1-positiven Zellen keiner eine Metastasierung zeigte.⁷⁹ Somit zeigten Patienten, bei denen 70% oder mehr der Zellen im Primärtumor gefärbt waren, signifikant geringere Raten im metastasenfren Überleben.⁷⁹ Dabei war v.a. die zirkumferenziell membranöse Expression von MUC1 mit einer schlechten Prognose assoziiert, während eine apikale Expression von MUC1 mit einer vergleichsweise günstigeren Prognose assoziiert war.⁷⁹ Auch Langner et al. konnten für Patienten mit ccRCC im pT-Stadium pT3a und pT3b einen Zusammenhang zwischen MUC1-Expressionsgrad und Metastasierung zeigen. Während von den Patienten mit weniger als 75% MUC1-Expression in den Tumorzellen 33% einen metastasierenden Verlauf zeigten, zeigten von den Patienten mit mehr als 75% MUC1-Expression in den Tumorzellen 63% einen metastasierenden Verlauf.⁷⁴ Darüber hinaus beobachteten Langner et al. einen Zusammenhang zwischen dem MUC1-Expressionsmuster und dem metastasenfren Überleben. So entwickelten 43% der Patienten mit zirkumferenzieller MUC1-Expression im Verlauf Metastasen und nur 8% der Patienten mit apikaler MUC1-Expression.⁷⁴

Aubert et al. beobachteten, dass insbesondere die zytoplasmatische MUC1-Expression mit einem positiven Metastasenstatus assoziiert ist. Dafür haben sie die MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren untersucht und dabei 16 metastasierte Karzinome mit 11 nicht-metastasierten Karzinomen verglichen.⁹

Im Rahmen dieser Arbeit konnte im Kollektiv der ccRCC-Primärtumore weder für die zytoplasmatische MUC1-Expression ($p=0,835$), noch für die membranöse ($p=0,346$) oder gesamte ($p=0,619$) MUC1-Expression ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit einem positiven Metastasenstatus gezeigt werden.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit das Metastasengewebe selbst untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass die membranöse MUC1-Expression im Metastasengewebe deutlich ausgeprägter ist als im benignen Nierenparenchym. Im Gegensatz dazu zeigte das benigne Nierenparenchym in dieser Arbeit eine stärkere zytoplasmatische MUC1-Expression als malignes Gewebe. Dabei war die zytoplasmatische MUC1-Expression im benignen Nierenparenchym auf die Zellen der distalen Tubuli und der Sammelrohre beschränkt. Die membranöse MUC1-Expression im benignen Nierenparenchym war hingegen geringer ausgeprägt und wenn vorhanden, dann apikal im Bereich der distalen Tubuli und Sammelrohre. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht quantifiziert.

Auch in Bezug auf die Korrelation weiterer klinisch-pathologischer Parameter mit der MUC1-Expression liegen unterschiedliche Daten vor.

Kraus et al. beispielsweise haben die Expression verschiedener MUC1-Epitope immunhistochemisch untersucht und mit klinisch-pathologischen Parametern verglichen. Dabei fanden sie eine Korrelation der MUC1-Expression mit der Tumorgroße, der Entstehung von Fernmetastasen und der Invasion großer Venen. Darüber hinaus ging die vermehrte Expression einiger MUC1-Epitope auch mit einem höheren Grading einher.⁶⁸

Fujita et al. haben ebenfalls einen signifikanten Unterschied im Ausmaß der MUC1-Expression zwischen hoch- und niedriggradigen ccRCC und zwischen metastasierten und nicht-metastasierten RCC gefunden. Dabei zeigten niedriggradige Tumore (G1, G2) eine geringere MUC1-Expression als höhergradige (G3). Allerdings konnten Fujita et al. keinen Unterschied zwischen dem Grad der MUC1-Expression verschiedener Tumorgroßen (T-Stadium) beobachten.⁴¹

Auch Leroy et al. haben für RCC einen Zusammenhang zwischen MUC1-Expression und Grading beschrieben. Dabei beobachteten sie sogar einen linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der relativen Anzahl der MUC1-positiven Zellen und dem Grading. Das Grading wiederum korrelierte signifikant mit dem Gesamtüberleben.⁷⁹

In dieser Arbeit konnte im Rahmen der univariaten Cox-Regressionsanalyse für Patienten mit primärem ccRCC zwar auch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grading und dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden ($p=0,010$), allerdings konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Grading und MUC1-Expression gezeigt werden ($p=0,573$).

Auch Langner et al. haben in 188 RCC den Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der MUC1-Expression und dem T-Stadium und Grading immunhistochemisch untersucht. Dabei haben Langner et al. sich nicht wie diese Arbeit auf ccRCC beschränkt, sondern haben auch andere RCC-Subtypen untersucht.⁷⁴ So konnten sie zeigen, dass bei papillären RCC ein hoher MUC1-Expressionsgrad mit einem niedrigen Grading (G1, G2) korreliert. Allerdings konnte für die anderen RCC-Subtypen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Fujita et al. und Leroy et al. keine Korrelation des MUC1-Expressionsgrads mit dem Grading nachgewiesen werden. Hingegen beobachteten Langner et al. bei ccRCC eine Korrelation des MUC1-Expressionsmusters mit sowohl dem T-Stadium als auch dem Grading. Während Tumore mit niedrigem pT-Stadium (pT1, pT2) und niedrigem Grading (G1, G2) eher ein apikales membranöses Expressionsmuster von MUC1 zeigten, konnte man bei Tumoren mit hohem pT-Stadium (pT3) und höherem Grading (G3, G4) vorwiegend ein zirkumferenziell membranöses Expressionsmuster mit oder ohne diffuse zytoplasmatische Expression beobachten.⁷⁴

Im Rahmen dieser Arbeit wurden membranöse und zytoplasmatische MUC1-Expression getrennt ausgewertet. Allerdings wurde dabei in Bezug auf die membranöse MUC1-Expression im Rahmen der Auswertung nicht zwischen apikalem und zirkumferenziellem Expressionsmuster unterschieden, sodass kein direkter Vergleich mit den Untersuchungsergebnissen von Langner et al. vorgenommen werden kann. Es zeigte sich in dieser Arbeit jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der membranösen MUC1-Expression der Primärtumore und klinisch-pathologischen Parametern wie positivem Nodalstatus ($p=0,909$), T-Stadium ($p=0,923$) oder Grading ($p=0,818$). Auch zwischen der zytoplasmatischen MUC1-Expression und klinisch-pathologischen Parametern wie positivem Nodalstatus ($p=0,161$), T-Stadium ($p=0,425$) oder Grading ($p=0,615$) konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

Zwischen der zytoplasmatischen und membranösen MUC1-Expression und dem Auftreten sarkomatoider Differenzierungen in primären ccRCC konnte im Rahmen

dieser Arbeit auch kein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden (zytoplasmatisch $p=0,410$; membranös $p=0,930$; gesamt $p=0,852$). Im Gegensatz dazu haben Gnemmi et al. zuvor eine Korrelation zwischen MUC1-Expressionsgrad in RCC-Primärtumoren und sarkomatoiden Komponenten gezeigt. Dabei habe eine Überexpression von MUC1 sogar zur Induktion der EMT geführt.⁴⁵ Gnemmi et al. vermuten, dass MUC1 die Bindung von β -Catenin an den SNAIL-Promoter, einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription von E-Cadherin inhibiert, moduliert. Somit käme es zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte, was als wichtiger Schritt der EMT gilt.⁴⁵ In diesem Zusammenhang zeigten Gnemmi et al., dass eine Inhibition von MUC1-C im Nukleus die Hochregulation der Transkription von SNAIL und die Wnt/ β -Catenin-Aktivität reduziert.⁴⁵ Somit interpretierten Gnemmi et al. die diffuse zytoplasmatische Überexpression von MUC1 in Verbindung mit einer Induktion von SNAIL in ccRCC mit sarkomatoider Differenzierung als potenzielle Rolle, die MUC1 im Rahmen der EMT spielen könnte.⁴⁵

Für die vorliegende Arbeit muss festgehalten werden, dass der fehlende signifikante Zusammenhang zwischen der MUC1-Expression und einer sarkomatoiden Differenzierung wahrscheinlich durch die geringe Fallzahl zu erklären ist. Im Kollektiv der Patienten mit primären ccRCC zeigten lediglich drei der Karzinome eine sarkomatoide Differenzierung, was die Aussagekraft stark limitiert.

Hingegen konnte in dieser Arbeit im Rahmen der univariaten Analyse eine signifikante Assoziation der membranösen MUC1-Expression im Metastasengewebe mit dem männlichen Geschlecht ($p=0,045$) und einer eingeschränkten Nierenfunktion ($p=0,040$) gezeigt werden. Die Assoziation der MUC1-Expression mit dem Geschlecht wurde zuvor bereits von Liu et al. bei mukoepidermoiden Karzinomen der Speicheldrüsen beschrieben. Dabei haben Liu et al. das Karzinomgewebe ebenfalls immunhistochemisch untersucht und konnten neben der Assoziation mit dem männlichen Geschlecht auch Assoziationen der MUC1-Expression mit der Tumorlokalisation, dem Grading, dem T-Stadium und dem Lymphknotenstatus zeigen. Ein Erklärungsansatz für den Zusammenhang zwischen der MUC1-Expression und dem männlichen Geschlecht wird dabei nicht genannt.⁸⁴

Über eine Assoziation der MUC1-Expression mit einer eingeschränkten Nierenfunktion im Rahmen onkologischer Erkrankungen gibt es bisher keine Berichte. Allerdings wurde eine MUC1-Hochregulation im Rahmen der Reperfusion nach prärenalem

akutem Nierenversagen beschrieben. Dabei ging eine höhere MUC1-Expression mit vermehrtem HIF-1 α einher, was sich im Rahmen des akuten Nierenversagens als protektiv zeigte.¹⁰²

Neben der Assoziation von MUC1 zu klinisch-pathologischen Parametern wird auch eine prognostische Relevanz von MUC1 diskutiert. So wurde eine Überexpression von MUC1 in Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht.^{10,46,58,64,76,90,96,128,137,147}

Auch für das ccRCC gibt es Daten, dass die MUC1-Expression prognostisch relevant ist.^{74,79} In diesem Zusammenhang zeigten Langner et al., dass die Assoziation des MUC1-Expressionsgrads mit dem Gesamtüberleben allenfalls von geringer Signifikanz ist. Hingegen konnten sie eine signifikante Assoziation zwischen dem MUC1-Expressionsmuster und dem Überleben zeigen.⁷⁴ Dabei ist insbesondere die zirkumferenziell membranöse Expression von MUC1 mit einer schlechten Prognose assoziiert, während eine apikale Expression von MUC1 in Tumorzellen eher mit einer günstigeren Prognose in Verbindung gebracht wird.⁷⁹ Die zusätzliche zytoplasmatische Expression geht mit einer weiteren Verschlechterung der Prognose einher.⁷⁴

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich weder für den zytoplasmatischen, noch den membranösen MUC1-Expressionsgrad in den ccRCC-Primärtumoren eine signifikante Assoziation zum Gesamtüberleben. Dies ist wahrscheinlich auf eine geringe Patientenzahl und Eventrate zurückzuführen.

Erstmals wurde auch die MUC1-Expression in ccRCC-Metastasengewebe auf eine Korrelation mit dem Gesamtüberleben untersucht. Hierbei konnte sowohl für den zytoplasmatischen als auch für den membranösen MUC1-Expressionsgrad keine statistisch signifikante Assoziation mit dem Gesamtüberleben gezeigt werden. Erwähnenswert erscheint jedoch die Tatsache, dass Patienten mit einer hohen MUC1-Expression im Metastasengewebe oder im Gewebe der ccRCC-Primärtumore tendenziell kürzer lebten. Dabei war diese Tendenz in Bezug auf die membranöse MUC1-Expression der ccRCC-Metastasen besonders ausgeprägt. So lebten die Patienten mit hohem membranösen MUC1-Expressionsgrad im Median nur 51,30 Monate, während Patienten mit niedrigem membranösen MUC1-Expressionsgrad ein medianes Überleben von 66,14 Monaten zeigten.

Wenn auch nicht statistisch signifikant, so deckt sich dies mit den Beobachtungen in anderen Studien, dass MUC1 eine prognostische Relevanz habe.^{68,74,79}

Die fehlende statistische Signifikanz könnte darauf zurückzuführen sein, dass im Rahmen der Analysen nicht zwischen synchronen und metachronen Metastasen unterschieden wurde. 31,58% der Patienten des mRCC-Kollektivs wiesen die Metastasen bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des ccRCC auf. Erwartungsgemäß dürfte das Gesamtüberleben dieser Patienten geringer sein, als das der Patienten, deren ccRCC erst im Verlauf metastasiert ist.

Auch Langner et al. haben beobachtet, dass Patienten mit zirkumferenziell membranöser MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren eine schlechtere Prognose haben, als Patienten ohne membranöse MUC1-Expression oder auch als Patienten mit vornehmlich apikal lokalisierter membranöser MUC1-Expression.⁷⁴ Auch in dieser Arbeit zeigten die Patienten mit einer starken membranösen MUC1-Expression tendenziell ein kürzeres Gesamtüberleben. Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht zwischen einer eher apikalen und einer zirkumferenziellen membranösen MUC1-Expression unterschieden.

Zudem waren diese Beobachtungen in dieser Arbeit v.a. bei ccRCC-Metastasen zu machen, während Langner et al. sich auf ccRCC-Primärtumore beziehen.⁷⁴ In der Studie von Langner et al. hatten die Patienten mit einer diffusen zytoplasmatischen MUC1-Expression zusätzlich zur zirkumferenziell membranösen MUC1-Expression ein noch schlechteres Gesamtüberleben.⁷⁴ Auch in dieser Arbeit zeigten die Patienten mit vermehrter zytoplasmatischer MUC1-Expression in den ccRCC-Primärtumoren ein leicht verkürztes Gesamtüberleben. Dieser Unterschied war jedoch marginal und auch nicht statistisch signifikant.

Ein möglicher Erklärungsansatz für den Zusammenhang der vermehrten zytoplasmatischen MUC1-Expression mit einem schlechteren Gesamtüberleben könnte sein, dass es bei einer sehr starken Überexpression von MUC1 in der Zellmembran vermehrt auch zur Internalisierung kommt. Somit ist MUC1 zunehmend auch zytoplasmatisch nachzuweisen und kann intrazellulär akkumulieren und Homodimere bilden.⁷¹ Diese werden dann in den Nukleus oder zur Mitochondrienmembran transportiert. Im Nukleus interagiert MUC1 dann mit Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- κ B, STAT1/STAT3 und Er α , wodurch die Expression der entsprechenden Targetgene gesteigert wird.⁷⁰ Wie bereits im Abschnitt 1.2.2 beschrieben, können die Produkte dieser Targetgene die Karzinogenese fördern.⁷⁰ Im Bereich der Mitochondrienmembran hemmt MUC1 die Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs.¹²²

Als signifikante Determinanten des Gesamtüberlebens für Patienten mit primärem ccRCC zeigten sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit in der univariaten Cox-Regressionsanalyse ein T-Stadium >T2 ($p=0,037$), ein Grading >G2 ($p=0,010$), eine sarkomatoide Differenzierung ($p=0,015$), ein positiver Lymphknotenstatus ($p=0,001$) und eine Fernmetastasierung ($p=0,003$). Aufgrund der limitierten Eventrate konnten in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse keine unabhängigen Einflussfaktoren nachgewiesen werden. Dennoch wurden die gleichen Determinanten zuvor bereits von mehreren Autoren wie beispielsweise Nelson et al.⁹⁷, Bensalah et al.¹³ und Peralta-Venturina et al.¹⁰⁵ beschrieben. Als weitere negative prognostische Faktoren für Patienten mit fortgeschrittenem ccRCC sind in der Literatur darüber hinaus eine erhöhte BSG⁹⁷, eine Thrombozytose^{13,53}, ein schlechter Allgemeinzustand des Patienten (ECOG¹⁰³ bzw. Karnofsky *Performance Status*⁹⁵), ein erhöhter LDH-Spiegel, ein niedriger Hb-Wert, ein erhöhtes Serum-Calcium und eine Zeit von der Erstdiagnose bis zum Beginn der Immuntheapie von unter einem Jahr beschrieben.⁹⁵ Die fünf letztgenannten bilden dabei die vom MSKCC entwickelten Motzer-Kriterien, die bereits in Abschnitt 2.1 beschrieben wurden. Sie erlauben eine Risikostratifizierung von Patienten mit mRCC.¹¹⁰

Als prognostisch relevant wurde auch ein Tumorthrombus in der Vena cava inferior diskutiert. Im Vergleich zu anderen Faktoren scheint dieser jedoch weniger relevant, sofern eine komplette Resektion erfolgreich durchgeführt werden kann.⁹⁷

Auch in dieser Arbeit wurden für Patienten mit mRCC mittels univariater Cox-Regressionsanalyse als signifikante Determinanten des Gesamtüberlebens eine Anämie ($p=0,028$), erhöhte LDH-Spiegel ($p=0,045$), ein Fuhrmann-Grading >G2 ($p=0,030$) und ein Karnofsky *Performance Status* von <80% ($p=0,031$) beobachtet. In diesem Zusammenhang hat ein Grading >G2 zu einem 2,40-fachen Risiko zu Versterben geführt. Bei Vorliegen einer Anämie zeigte sich das Risiko zu versterben auf das 2,50-fache erhöht, was mit den Motzer-Kriterien des MSKCC einhergeht.⁹⁵ Im Gegensatz dazu haben beispielsweise Hutterer et al. in einer Studie mit nicht-metastasierten RCC lediglich eine Thrombozytose als negativen prognostischen Marker für das Gesamtüberleben identifiziert, während es zwischen dem Vorliegen einer Anämie und dem Gesamtüberleben keinen signifikanten Zusammenhang gab.⁵³ Bensalah et al. konnten sogar zeigen, dass eine Thrombozytose signifikant mit anerkannten prognostischen Parametern wie T-Stadium, Fuhrmann-Grading, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung korreliert.¹³ Hingegen haben Cetin et al. gezeigt, dass ein

niedriger Hämoglobingehalt im Blut bei Patienten mit mRCC nach VEGF-Therapie prognostisch ungünstig ist.²⁷ Zudem kann ein verminderter Hb-Gehalt im Blut gegebenenfalls über den eingeschränkten Sauerstofftransport zur Hypoxie führen. Eine Hypoxie wiederum führt zu einer Hochregulation von HIF-1 α und eine erhöhte Expression von HIF-1 α in ccRCC gilt als unabhängiger negativer prognostischer Marker.⁸²

Im Rahmen einer LDH-Erhöhung zeigte sich das Risiko zu Versterben bei Patienten mit mRCC in dieser Arbeit auf das 3,05-fache gesteigert. Auch Cetin et al. konnten den negativen Effekt einer LDH-Erhöhung auf das Gesamtüberleben zeigen. Allerdings haben Cetin et al. ausschließlich Patienten mit mRCC nach einer VEGF-Therapie untersucht.²⁷

Liegt der Karnofsky *Performance Status* <80%, war das Risiko zu versterben in der vorliegenden Arbeit auf das 2,93-fache erhöht. Eine prognostische Aussage des Karnofsky-Index bei Patienten mit mRCC konnten beispielsweise auch Park et al. zeigen. Dabei zeigte sich bei Patienten mit einem Karnofsky-Index <100% ein signifikant früheres Fortschreiten der Erkrankung.¹⁰¹

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich in dieser Arbeit lediglich ein Grading >G2 als unabhängiger prognostischer Faktor (p=0,036) bei Patienten mit mRCC.

In dieser Arbeit konnte für keines der Kollektive ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Erhöhung des CRP im Serum und dem Gesamtüberleben gezeigt werden. Hingegen haben Rausch et al. in ihrer Studie gezeigt, dass ein CRP im Serum >5mg/L ein unabhängiger Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben von Patienten mit mRCC, die sich einer Metastasektomie unterzogen haben, ist.¹²⁰ Auch Fujita et al. konnten zeigen, dass ein erhöhtes CRP mit einem verkürzten Gesamtüberleben einhergeht. Für ihre Studie haben sie Patienten mit mRCC untersucht, die im Anschluss an die CRP-Bestimmung mit Sorafenib therapiert wurden. Demnach könnte das CRP also ein nützlicher Biomarker sein, um prädiktive Aussagen über das Ansprechen einer Sorafenib-Therapie zu machen.⁴² Xia et al. haben auch Patienten mit nicht-metastasierten ccRCC auf eine prognostische Relevanz des CRP untersucht. Dabei konnten sie zeigen, dass das CRP sowohl für das Gesamtüberleben als auch für das metastasenfreie Überleben ein unabhängiger prognostischer Faktor ist. Gleiches konnten sie für den Lymphozyten-Monozyten-Quotienten zeigen.¹⁵⁷ Xia et al. führen

ihre Beobachtungen auf die Rolle chronischer Entzündungen in der Karzinogenese zurück.¹⁵⁷

Diese Arbeit konnte zeigen, dass sich die MUC1-Expression zwischen benignem Nierenparenchym, ccRCC-Primärtumoren und ccRCC-Metastasen signifikant unterscheidet. Zudem konnten in dieser Arbeit einige signifikante Assoziationen zwischen der MUC1-Expression und klinisch-pathologischen Parametern gezeigt werden.

Eine neue Beobachtung ist, dass große Unterschiede in der MUC1-Expression der Metastasen unterschiedlicher Lokalisationen vorliegen. Während pulmonale, pleurale, mediastinale und dermale Metastasen eine hohe MUC1-Expression zeigen, weisen intestinale, hepatische, ossäre, adrenale und nodale Metastasen eine geringere MUC1-Expression auf. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, weshalb in einer Studie von Leroy et al. bei einem Anteil von über 70% MUC1-positiver Zellen in der IHC von Gewebe des Primärtumors das Risiko für eine viszerale Metastasierung gestiegen ist⁷⁹, während die viszerale Metastasen selbst, zumindest in dieser Arbeit, eine vergleichsweise geringe MUC1-Expression zeigen.

Eine weitere bemerkenswerte Beobachtung dieser Arbeit ist, dass pulmonale Metastasen im Vergleich zu nicht-pulmonalen Metastasen eine signifikant stärkere membranöse MUC1-Expression zeigen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Veröffentlichungen von Spicer et al. und Pochampalli et al., dass MUC1-knockout-Mäuse mit Mammakarzinomen seltener Lungenmetastasen entwickeln als Mäuse, die MUC1 exprimieren können.^{109,138} Diese Erkenntnisse könnten zukünftig im Rahmen der Auswahl geeigneter Patienten für eine zielgerichtete Therapie gegen MUC1 von Relevanz sein, denn aufgrund der diffusen Überexpression von MUC1 in RCC, aber v.a. auch in Metastasen von RCC, zumindest bestimmter Lokalisationen, könnte MUC1 ein vielversprechendes Target zielgerichteter Therapien sein.⁸⁰

Aktuell gibt es noch kein zugelassenes Medikament gegen MUC1, jedoch zeigen diverse klinische Studien bereits vielversprechende Ansätze.⁷⁰ Dabei wurden beispielsweise Ansätze mit dendritischen Zellen, rekombinanten Vaccina-Viren, Peptiden, Antikörpern und synthetischen Mucinen getestet.¹²⁵

Therapieversuche mit Antikörpern gegen die extrazelluläre MUC1-N-Untereinheit haben sich dabei bisher als nicht effektiv erwiesen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Antikörper aufgrund der hohen Mengen des zirkulierenden

MUC1-N die Tumorzellen kaum erreichen.⁶⁹ Ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen MUC1, der in diesem Zusammenhang getestet wurde, ist AS1402 (früher R1550). In Versuchen mit Patientinnen mit Mammakarzinom waren jedoch sehr hohe Dosen notwendig, da das zahlreich intravasal vorhandene MUC1 zunächst abgesättigt werden musste, bevor mit einer zytotoxisch wirksamen Reaktion gegen MUC1-positive Zellen gerechnet werden konnte. Ein weiteres Problem der gegen MUC1-gerichteten Antikörper-Therapie ist die ausgeprägte extrazelluläre Glykosylierung von MUC1, welche MUC1-N für die Antikörper schwer zugänglich macht.¹⁰⁴ Im Gegensatz dazu ist MUC1-C nicht im Blutplasma nachweisbar und auch nicht von der starken Glykosylierung betroffen. Somit könnte MUC1-C ein geeigneteres Target für eine Antikörper-Therapie darstellen.⁷¹

Hisatsune et al. konnten zeigen, dass durch den anti-MUC1-Antikörper GP1.4 die Translokation von EGFR von der Zelloberfläche in den Intrazellulärraum begünstigt wurde. Dies führte zu einer Desensitivierung gegenüber EGF und damit einhergehend zu einer verminderten Signalaktivierung durch EGFR. Somit wurden die EGF-vermittelten Zellfunktionen, wie beispielsweise der Wundverschluss, durch GP1.4 inhibiert.⁴⁹

Neben MUC1-spezifischen Therapieversuchen mit Antikörpern, gibt es auch Therapieansätze mit Peptiden, wobei bereits verschiedene Peptide getestet wurden. Ein Beispiel ist in diesem Zusammenhang MIP (*MUC1 inhibitory peptide*), welches zur besseren zellulären Aufnahme mit PTD4 (*protein transduction domain 4*) co-lokalisiert ist, und somit PMIP (*PTD4 MUC1 inhibitory peptide*) genannt wird.

PMIP wirkt als kompetitiver Inhibitor und interagiert wie MUC1 mit β -Catenin oder EGFR, sodass die onkogenen Funktionen von MUC1 eingeschränkt sind. In vitro konnte durch Behandlung mit PMIP die Proliferation, Migration und Invasion von Zellen eines metastasierten Mammakarzinoms reduziert werden.¹⁸

Das Peptid GO-201 hingegen bindet an das CQC-Motiv von MUC1. Dieses Motiv ist relevant für die Homodimerisierung von MUC1, welche somit gehemmt wird. Auch die mit der Homodimerisierung einhergehende Translokation von MUC1 in den Nukleus findet somit nicht mehr statt. Dies resultiert wiederum darin, dass GO-201 die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs supprimiert.¹¹⁷ Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibierung der Homodimerisierung von MUC1 die Aktivierung des STAT3-Signalwegs supprimiert wird.⁵ Darüber hinaus konnten andere Studien zeigen, dass GO-201 auch die Interaktion zwischen MUC1 und dem

Transkriptionsfaktor NF- κ B einschränkt und es somit zu einer verminderten Expression der Targetgene von NF- κ B kommt.⁴

GO-203 ist ein weiteres Peptid, das die Dimerisierung von MUC1 und seine Translokation in den Nukleus hemmt. In vitro zeigte sich unter Therapie mit GO-203 eine reduzierte SNAIL- und Wnt/ β -Catenin Aktivität.⁴⁵ In vivo konnte bei Patientinnen mit Brustkrebs durch die Therapie mit GO-203 die Chemosensitivität der Tumorzellen erhöht werden.^{60,116}

Im Rahmen von Therapieansätzen mit dendritischen Zellen haben Loveland et al. beispielsweise in einer Phase I Studie zehn Patienten mit fortgeschrittenen MUC1-positiven Adenokarzinomen eine experimentelle Immuntherapie zugeführt. Dabei haben sie nach einer Leukapherese ex vivo dendritische Zellen angezchtet. Diese wurden dann im Verlauf mit mannan-MUC1-*fusion* Protein gepulst und anschließend den Patienten reinjiziert. Mit diesem Verfahren konnte bei zwei der zehn Patienten eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs erreicht werden. Dabei hatte einer der erfolgreich therapierten Patienten ein RCC.⁸⁸ Auch Wierecky et al. haben einen Therapieansatz mit dendritischen Zellen erforscht. Dabei haben sie 20 Patienten mit mRCC alle zwei Wochen dendritische Zellen, die mit MUC1-abgeleiteten Peptiden beladen waren, injiziert. Ab der fünften Injektion wurde zusätzlich IL-2 appliziert. Bei allen Patienten konnte eine MUC1-spezifische T-Zell-Antwort nachgewiesen werden. Bei sechs Patienten konnte sogar eine Regression der Metastasen beobachtet werden und bei weiteren vier Patienten blieb ein Fortschreiten der Erkrankung aus.¹⁵³

Neben den beschriebenen Therapieansätzen gibt es auch Studien zu Impfungen gegen MUC1. So wurden in verschiedenen Studien Impfungen mit Peptiden durchgeführt, die anschließend über MHC I (*major histocompatibility complex* I) präsentiert werden. Somit soll die T-Zell-Reaktion gegen MUC1-positive Zellen verstärkt werden. Bisher haben es jedoch erst wenige MUC1-Vakzine in klinische Studien späterer Phasen geschafft.⁷¹ Ein Impfstoff, der in einer Phase III Studie getestet wird, ist BLP25. Hierbei handelt es sich um einen Liposomen-Impfstoff, der nach Applikation eine Immunantwort gegen MUC1-*Tandem Repeats* induzieren soll.⁷⁰ Ein weiterer Impfstoff, der in einer Phase III Studie getestet wird, ist TG4010. Hierbei handelt es sich um ein modifiziertes Vaccina-Virus.⁷⁰ Vaccina-Viren sind behüllte DNA-Viren, die zu den Pockenviren gehören. Im Rahmen der klinischen Studien wurde es dahingehend modifiziert, dass es MUC1 und IL-2 exprimiert.¹⁰⁰ Durch die Induktion der

Immunreaktion gegen MUC1 soll die Hemmung der Zell-Zell-Kontakte verhindert werden.¹⁰⁰

Beide Impfstoffe wurden zunächst an Patienten mit NSCLC untersucht und zeigten dabei eine Verlängerung der Überlebenszeiten.⁷⁰ Somit läuft aktuell eine randomisierte kontrollierte prospektive Phase III Studie, die das Outcome von Patienten mit NSCLC unter Chemotherapie und TG4010 im Vergleich zu alleiniger Chemotherapie untersucht.¹⁰⁰ Auch in Bezug auf mRCC haben Therapieansätze mit TG4010 vielversprechende Ergebnisse geliefert, sodass es 2011 bereits im Rahmen einer Phase II Studie an Patienten mit mRCC angewendet wurde. Dabei zeigten nach einem halben Jahr 18% der 27 Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung. Die meisten Patienten mit Progress wurden daraufhin zusätzlich zu TG4010 mit Zytokinen therapiert, woraufhin bei weiteren 30% der therapierten 20 Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung erreicht werden konnte. Dabei zeigten Patienten, bei denen eine Antikörperproduktion gezeigt werden konnte, einen leichten Überlebensvorteil. Auch Patienten mit einer CD8⁺-Zell-Reaktion gegen MUC1 hatten einen leichten Überlebensvorteil. Aufgrund der kleinen Patientenzahlen und dem mäßigen Überlebensvorteil, der aus der Therapie mit TG4010 resultierte, ist die zukünftige Relevanz der TG4010-Impfung bei mRCC noch unklar.⁹⁹

Ein weiterer Ansatz einer Impfung für Patienten mit RCC wird mit IMA901 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Mischung multipler Tumor-assoziiertes Peptide, darunter auch MUC1.¹⁵⁰ Auch durch IMA901 wird eine T-Zell-Antwort induziert. Die Applikation von IMA901 in einer Phase I/II-Studie war bei Patienten mit mRCC mit einem verlängerten Gesamtüberleben assoziiert.¹¹⁸

Darüber hinaus gibt es einen mRNA-basierten Ansatz für eine Impfung bei RCC. Dabei haben Rittig et al. im Rahmen einer Phase I/II-Studie Patienten mit RCC im Stadium IV Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und in vitro transkribierte mRNA intradermal injiziert. Die mRNA kodierte dabei für MUC1 und andere tumorassoziierte Antigene. Im Rahmen dieser Studie konnte bei einigen Patienten eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs erreicht werden. Außerdem ließ sich eine Induktion einer T-Zell-Antwort gegen verschiedene tumorassoziierte Antigene nachweisen.¹²³

Im Gegensatz zu den vielversprechenden Ansätzen mit MUC1 als Target zielgerichteter Therapien, scheint der prognostische Nutzen von MUC1 auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit limitiert.

Die Aussagekraft dieser Arbeit ist generell durch den retrospektiven Ansatz und die limitierte Patientenanzahl der beiden Patientenkollektive beschränkt. Außerdem konnten im Rahmen dieser Studie nicht Metastasen aller Lokalisationen untersucht werden, da kein Gewebe zur Verfügung stand. Ein Beispiel sind in diesem Zusammenhang zerebrale Metastasen.

Weitere Limitationen dieser Studie liegen in der TMA-Auswertung und der Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen. So können beispielsweise unterschiedliche auswertende Personen und eine variable Qualität der Färbungen zu Abweichungen führen. Um diese Fehlerquelle so gut wie möglich zu eliminieren, wurden die immunhistochemischen Färbungen im Rahmen dieser Studie standardisiert durch hochwertige Färbeautomaten am Institut für Pathologie und Neuropathologie an der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt. Zudem wurden die gefärbten Zellen mit Dr. Steffen Rausch und cand. med. Johanna Beermann von zwei verschiedenen Personen ausgezählt und bei größeren Abweichungen wurde erneut ausgezählt.

Diese Arbeit stellt die erste Studie dar, die die MUC1-Expression in RCC-Metastasen und deren Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern untersucht. Eine weitere Besonderheit dieser Arbeit ist darüber hinaus, dass die zytoplasmatische und die membranöse MUC1-Expression getrennt voneinander betrachtet und ausgewertet wurden. Im Gegensatz dazu haben andere Autoren bisher überwiegend nur zwischen MUC1-positiven und MUC1-negativen Zellen unterschieden und lediglich qualitativ beschrieben, ob die MUC1-Expression eher membranös, zytoplasmatisch oder kombiniert ist.

Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit die MUC1-Expression zwischen ccRCC-Primärtumoren und dazugehörigen Metastasen verglichen werden. Dies wurde zuvor bisher nur einmalig durchgeführt, und zwar von Leroy et al.⁸⁰ Sowohl in der Studie von Leroy et al., als auch in der vorliegenden Arbeit, konnte kein systematischer Zusammenhang zwischen der MUC1-Expression in ccRCC-Primärtumoren und dazugehörigen Metastasen gefunden werden. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu beachten, dass Leroy et al. nur für zehn ihrer ccRCC-Metastasen auch Gewebe des

dazugehörigen Primärtumors zu Verfügung stand.⁸⁰ In der vorliegenden Arbeit traf dies sogar nur für sechs Patienten zu. Somit sollten weiterführende Studien mit größeren Patientenkollektiven durchgeführt werden, um eine fundiertere Aussage über mögliche Zusammenhänge treffen zu können.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene MUC1-Expressionsmuster und die klinisch-pathologische sowie prognostische Relevanz von MUC1 in ccRCC-Primärtumoren und ccRCC-Metastasen genauer zu betrachten.

Gewebestanzen von 151 ccRCC-Metastasen, 61 ccRCC-Primärtumoren und dazu korrespondierendem benignem Nierenparenchym wurden auf einen TMA übertragen. Anschließend wurden die Arrays mit einem Antikörper gegen MUC1 immunhistochemisch gefärbt und semi-quantitativ ausgewertet, wobei die IR-Scores als Produkt des relativen Anteils der gefärbten Zellen und der Intensität der Färbungen gebildet wurden. Die MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym, primären ccRCC und RCC-Metastasen wurde miteinander verglichen und es wurde nach Assoziationen mit klinisch-pathologischen Parametern und der Prognose der Patienten gesucht.

Dabei wurde beobachtet, dass die mediane zytoplasmatische MUC1-Expression in benignem Nierengewebe am stärksten ausgeprägt war (medianer IRS=1,04). Im Vergleich dazu zeigten primäre ccRCC (medianer IRS=0,50) und ccRCC-Metastasen (medianer IRS=0,12) eine signifikant geringere zytoplasmatische MUC1-Expression. Im Gegensatz dazu war die membranöse MUC1-Expression in benignem Nierenparenchym signifikant geringer (medianer IRS=0,21) als in primären ccRCC (medianer IRS=0,59) und RCC-Metastasen (medianer IRS=0,57).

Deutliche Unterschiede in der zytoplasmatischen und der membranösen MUC1-Expression wurden v.a. zwischen verschiedenen Lokalisationen von RCC-Metastasen gefunden. Dabei zeigte sich insbesondere eine signifikant stärkere membranöse MUC1-Expression in pulmonalen Metastasen im Vergleich zu nicht-pulmonalen Metastasen ($p=0,014$). Im Gegensatz dazu war der Unterschied zwischen der zytoplasmatischen

MUC1-Expression in pulmonalen und nicht-pulmonalen Metastasen nicht signifikant ($p=0,113$).

Signifikante Assoziationen konnten auch zwischen der membranösen MUC1-Expression in ccRCC-Metastasen und dem männlichen Geschlecht ($p=0,045$) und einer Kreatinin-Erhöhung ($p=0,040$) gezeigt werden.

Die prognostische Relevanz von MUC1 in dieser Arbeit war limitiert. Hingegen zeigten sich in dieser Arbeit im Rahmen der univariaten Analysen für das Patientenkollektiv mit ccRCC-Primärtumoren ein T-Stadium $>T2$, ein Fuhrmann-Grading $>G2$, eine sarkomatoide Differenzierung des Tumors und ein positiver Nodal- und Metastasenstatus als negative prognostische Faktoren. In den univariaten Analysen für das Patientenkollektiv der ccRCC-Metastasen zeigten sich ein Fuhrmann-Grading $>G2$, eine Anämie, eine LDH-Erhöhung und ein Karnofsky-Index $<80\%$ als prognostisch relevant. Dabei gehören das höhere Grading, die erhöhte LDH und der reduzierte Karnofsky *Performance Status* auch zu den Motzer-Kriterien.⁹⁵

Im Vergleich der MUC1-Expression in Metastasen mit ihren korrespondierenden ccRCC-Primärtumoren konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Aufgrund der limitierten Anzahl der Patienten für die sowohl Gewebe der Primärtumore als auch der Metastasen vorlag, sollten hier weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven durchgeführt werden, um eine fundiertere Aussage machen zu können.

Insgesamt unterstreicht diese Arbeit die Relevanz von MUC1 in Bezug auf ccRCC. Da MUC1 in Primärtumoren und Metastasen vermehrt membranös exprimiert wird, stellt MUC1 schon jetzt in diversen klinischen Studien ein vielversprechendes Target zielgerichteter Therapien dar. Durch die in dieser Arbeit gezeigte signifikant unterschiedliche MUC1-Expression in Metastasen unterschiedlicher Lokalisationen, könnte hierüber die Selektion geeigneter Patienten für zielgerichtete Therapien gegen MUC1 durchgeführt werden.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Acar Ö, Mut T, Sağlıcan Y, Sag AA, Falay O, Selcukbiricik F, Tabak L, Esen T. Isolated omental metastasis of renal cell carcinoma after extraperitoneal open partial nephrectomy: A case report. *International Journal of Surgery Case Reports* 2016; 21: 6–11.
- 2 Agrawal B, Krantz MJ, Parker J, Longenecker BM. Expression of MUC1 mucin on activated human T cells: implications for a role of MUC1 in normal immune regulation. *Cancer research* 1998; 58: 4079–4081.
- 3 Agrawal B, Longenecker BM. MUC1 mucin-mediated regulation of human T cells. *International immunology* 2005; 17: 391–399.
- 4 Ahmad R, Raina D, Joshi MD, Kawano T, Ren J, Kharbanda S, Kufe D. MUC1-C oncoprotein functions as a direct activator of the nuclear factor-kappaB p65 transcription factor. *Cancer research* 2009; 69: 7013–7021.
- 5 Ahmad R, Rajabi H, Kosugi M, Joshi MD, Alam M, Vasir B, Kawano T, Kharbanda S, Kufe D. MUC1-C Oncoprotein Promotes STAT3 Activation in an Autoinductive Regulatory Loop. *Science signaling* 2011; 4: ra9-ra9.
- 6 Alves A, Adam R, Majno P, Delvart V, Azoulay D, Castaing D, Bismuth H. Hepatic resection for metastatic renal tumors: is it worthwhile? *Annals of surgical oncology* 2003; 10: 705–710.
- 7 Atkins MB, Choueiri TK. Epidemiology, pathology, and pathogenesis of renal cell carcinoma. *UpToDate* 2015.
- 8 Atkins MB. Overview of the treatment of renal cell carcinoma. *UpToDate* 2015.
- 9 Aubert S, Fauquette V, Hémon B, Lepoivre R, Briez N, Bernard D, van Seuningem I, Leroy X, Perrais M. MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer research* 2009; 69: 5707–5715.
- 10 Baldus SE, Mönig SP, Hanisch F-G, Zirbes TK, Flucke U, Oelert S, Zilkens G, Madejczik B, Thiele J, Schneider PM, Hölscher AH, Dienes HP. Comparative evaluation of the prognostic value of MUC1, MUC2, sialyl-Lewis(a) and sialyl-Lewis(x) antigens in colorectal adenocarcinoma. *Histopathology* 2002; 40: 440–449.
- 11 Bedke J, Gauler T, Grunwald V, Hegele A, Herrmann E, Hinz S, Janssen J, Schmitz S, Schostak M, Tesch H, Zastrow S, Miller K. Systemic therapy in metastatic renal cell carcinoma. *World journal of urology* 2016.
- 12 Behrens ME, Grandgenett PM, Bailey JM, Singh PK, Yi C-H, Yu F, Hollingsworth MA. The reactive tumor microenvironment: MUC1 signaling directly reprograms transcription of CTGF. *Oncogene* 2010; 29: 5667–5677.
- 13 Bensalah K, Leray E, Fergelot P, Rioux-Leclercq N, Tostain J, Guille F, Patard J-J. Prognostic value of thrombocytosis in renal cell carcinoma. *The Journal of urology* 2006; 175: 859–863.
- 14 Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Siragusa A, Dreher E, Smith PD. EGFR dependent expression of STAT3 (but not STAT1) in breast cancer. *International journal of oncology* 2001; 19: 1155–1160.
- 15 Bergstrom A, Hsieh CC, Lindblad P, Lu CM, Cook NR, Wolk A. Obesity and renal cell cancer--a quantitative review. *British journal of cancer* 2001; 85: 984–990.
- 16 Besmer DM, Curry JM, Roy LD, Tinder TL, Sahraei M, Schettini J, Hwang S-I, Lee YY, Gendler SJ, Mukherjee P. Pancreatic ductal adenocarcinoma mice lacking mucin 1 have a profound defect in tumor growth and metastasis. *Cancer research* 2011; 71: 4432–4442.

- 17 Bianchi M, Sun M, Jeldres C, Shariat SF, Trinh Q-D, Briganti A, Tian Z, Schmitges J, Graefen M, Perrotte P, Menon M, Montorsi F, Karakiewicz PI. Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2012; 23: 973–980.
- 18 Bitler BG, Menzl I, Huerta CL, Sands B, Knowlton W, Chang A, Schroeder JA. Intracellular MUC1 peptides inhibit cancer progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009; 15: 100–109.
- 19 Bouillez A, Gnemmi V, Gaudelot K, Hémon B, Ringot B, Pottier N, Glowacki F, Butruille C, Cauffiez C, Hamdane M, Sergeant N, van Seuningem I, Leroy X, Aubert S, Perrais M. MUC1-C nuclear localization drives invasiveness of renal cancer cells through a sheddase/gamma secretase dependent pathway. *Oncotarget* 2014; 5: 754–763.
- 20 Brayman M, Thathiah A, Carson DD. MUC1: A multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2004; 2: 4.
- 21 Brennan JF, Stilmant MM, Babayan RK, Siroky MB. Acquired renal cystic disease: implications for the urologist. *British journal of urology* 1991; 67: 342–348.
- 22 Brugarolas J. PBRM1 and BAP1 as novel targets for renal cell carcinoma. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 2013; 19: 324–332.
- 23 Cairns P. Renal cell carcinoma. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 2010; 9: 461–473.
- 24 Cao Y, Karsten U, Zerban H, Bannasch P. Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich-related antigens, and cytokeratin 19 in human renal cell carcinomas and tubular clear cell lesions. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2000; 436: 119–126.
- 25 Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. *The Lancet*. *The Lancet*.
- 26 Cascio S, Finn OJ. Intra- and Extra-Cellular Events Related to Altered Glycosylation of MUC1 Promote Chronic Inflammation, Tumor Progression, Invasion, and Metastasis. *Biomolecules* 2016; 6.
- 27 Cetin B, Afsar B, Deger SM, Gonul II, Gumusay O, Ozet A, Benekli M, Coskun U, Buyukberber S. Association between hemoglobin, calcium, and lactate dehydrogenase variability and mortality among metastatic renal cell carcinoma. *International urology and nephrology* 2014; 46: 1081–1087.
- 28 Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Leibovich BC, Frank I, Blute ML. Sarcomatoid renal cell carcinoma: an examination of underlying histologic subtype and an analysis of associations with patient outcome. *The American journal of surgical pathology* 2004; 28: 435–441.
- 29 Cho E, Curhan G, Hankinson SE, Kantoff P, Atkins MB, Stampfer M, Choueiri TK. Prospective evaluation of analgesic use and risk of renal cell cancer. *Archives of internal medicine* 2011; 171: 1487–1493.
- 30 Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine* 2005; 353: 2477–2490.
- 31 Corrao G, Scotti L, Bagnardi V, Sega R. Hypertension, antihypertensive therapy and renal-cell cancer: a meta-analysis. *Current drug safety* 2007; 2: 125–133.
- 32 Cozzi PJ, Wang J, Delprado W, Perkins AC, Allen BJ, Russell PJ, Li Y. MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC and MUC6 expression in the progression of prostate cancer. *Clinical & experimental metastasis* 2005; 22: 565–573.

- 33 Donmez T, Kale M, Ozyurek Y, Atalay H. Erythrocyte sedimentation rates in patients with renal cell carcinoma. *European urology* 1992; 21 Suppl 1: 51–52.
- 34 Dr. Joachim Bertz, Dr. Stefan Dahm, Dr. Jörg Haberland, Dr. Klaus Kraywinkel, Dr. Bärbel-Maria Kurth, Dr. Ute Wolf. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 2010.
- 35 Eggener SE, Yossepowitch O, Kundu S, Motzer RJ, Russo P. Risk score and metastasectomy independently impact prognosis of patients with recurrent renal cell carcinoma. *The Journal of urology* 2008; 180: 873-8; discussion 878.
- 36 Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature reviews. Cancer* 2009; 9: 550–562.
- 37 Evans CP. Follow-up surveillance strategies for genitourinary malignancies. *Cancer* 2002; 94: 2892–2905.
- 38 Finn OJ, Gantt KR, Lepisto AJ, Pejawar-Gaddy S, Xue J, Beatty PL. Importance of MUC1 and spontaneous mouse tumor models for understanding the immunobiology of human adenocarcinomas. *Immunologic research* 2011; 50: 261–268.
- 39 Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R, Tangen C, van Poppel H, Crawford ED. Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. *The Journal of urology* 2004; 171: 1071–1076.
- 40 Fossa SD. Interferon in metastatic renal cell carcinoma. *Seminars in oncology* 2000; 27: 187–193.
- 41 Fujita K, Denda K, Yamamoto M, Matsumoto T, Fujime M, Irimura T. Expression of MUC1 mucins inversely correlated with post-surgical survival of renal cell carcinoma patients. *British journal of cancer* 1999; 80: 301–308.
- 42 Fujita T, Nishi M, Tabata K-I, Matsumoto K, Yoshida K, Iwamura M. Overall prognostic impact of C-reactive protein level in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sorafenib. *Anti-cancer drugs* 2016; 27: 1028–1032.
- 43 Fyfe GA, Fisher RI, Rosenberg SA, Sznol M, Parkinson DR, Louie AC. Long-term response data for 255 patients with metastatic renal cell carcinoma treated with high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1996; 14: 2410–2411.
- 44 Gendler SJ, Burchell JM, Duhig T, Lamport D, White R, Parker M, Taylor-Papadimitriou J. Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987; 84: 6060–6064.
- 45 Gnemmi V, Bouillez A, Gaudelot K, Hémon B, Ringot B, Pottier N, Glowacki F, Villers A, Vindrieux D, Cauffiez C, van Seuningem I, Bernard D, Leroy X, Aubert S, Perrais M. MUC1 drives epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/ β -catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer letters* 2014; 346: 225–236.
- 46 Guddo F, Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Reina C, Vignola AM, Chlouverakis G, Hilkens J, Gatter KC, Harris AL, Bonsignore G. MUC1 (episialin) expression in non-small cell lung cancer is independent of EGFR and c-erbB-2 expression and correlates with poor survival in node positive patients. *Journal of clinical pathology* 1998; 51: 667–671.
- 47 Haferkamp A, Pritsch M, Bedke J, Wagener N, Pfitzenmaier J, Buse S, Hohenfellner M. The influence of body mass index on the long-term survival of patients with renal cell carcinoma after tumour nephrectomy. *BJU international* 2008; 101: 1243–1246.

- 48 Haley JD, Gullick WJ. EGFR Signaling Networks in Cancer Therapy. Humana Press, Totowa, NJ 2008.
- 49 Hisatsune A, Nakayama H, Kawasaki M, Horie I, Miyata T, Isohama Y, Kim KC, Katsuki H. Anti-MUC1 antibody inhibits EGF receptor signaling in cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2011; 405: 377–381.
- 50 Hofmann H-S, Neef H, Krohe K, Andreev P, Silber R-E. Prognostic factors and survival after pulmonary resection of metastatic renal cell carcinoma. *European urology* 2005; 48: 77.
- 51 Horm TM, Schroeder JA. MUC1 and metastatic cancer: expression, function and therapeutic targeting. *Cell adhesion & migration* 2013; 7: 187–198.
- 52 Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. SEER Cancer Statistics Review. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html>, Zugriff: 21.09.2015.
- 53 Hutterer GC, Krieger D, Mrcic E, Pohlmann K, Bezan A, Stojakovic T, Pummer K, Zigeuner R, Pichler M. Preoperative Leucocytosis, Thrombocytosis and Anemia as Potential Prognostic Factors in Non-metastatic Renal Cell Carcinoma. *Anticancer research* 2015; 35: 3463–3469.
- 54 Interferon-alpha and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. *Lancet (London, England)* 1999; 353: 14–17.
- 55 J. Hilkens, J. Wesseling, H. L. Vos, J. Storm, B. Boer, S. W. van der Valk and M. C. E. Maas. Involvement of the cell surface-bound mucin, episialin/MUCI, in progression of human carcinomas.
- 56 Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007; 13: 680.
- 57 Karami S, Daugherty SE, Purdue MP. A prospective study of alcohol consumption and renal cell carcinoma risk. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2015; 137: 238–242.
- 58 Kashiwagi H, Kijima H, Dowaki S, Ohtani Y, Tobita K, Yamazaki H, Nakamura M, Ueyama Y, Tanaka M, Inokuchi S, Makuuchi H. MUC1 and MUC2 expression in human gallbladder carcinoma: a clinicopathological study and relationship with prognosis. *Oncology reports* 2001; 8: 485–489.
- 59 Kashyap MK, Kumar A, Emelianenko N, Kashyap A, Kaushik R, Huang R, Khullar M, Sharma SK, Singh SK, Bhargave AK, Upadhyaya SK. Biochemical and molecular markers in renal cell carcinoma: an update and future prospects. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 2005; 10: 258–294.
- 60 Kharbanda A, Rajabi H, Jin C, Raina D, Kufe D. Oncogenic MUC1-C promotes tamoxifen resistance in human breast cancer. *Molecular cancer research : MCR* 2013; 11: 714–723.
- 61 Khodarev N, Ahmad R, Rajabi H, Pitroda S, Kufe T, McClary C, Joshi MD, MacDermid D, Weichselbaum R, Kufe D. Cooperativity of the MUC1 oncoprotein and STAT1 pathway in poor prognosis human breast cancer. *Oncogene* 2010; 29: 920–929.
- 62 Kim B, Louie AC. Surgical resection following interleukin 2 therapy for metastatic renal cell carcinoma prolongs remission. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* 1992; 127: 1343–1349.

- 63 Kim HL, Beldegrun AS, Freitas DG, Bui MHT, Han K-r, Dorey FJ, Figlin RA. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *The Journal of urology* 2003; 170: 1742–1746.
- 64 Kimura T, Tanaka S, Haruma K, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F, Kohno N. Clinical significance of MUC1 and E-cadherin expression, cellular proliferation, and angiogenesis at the deepest invasive portion of colorectal cancer. *International journal of oncology* 2000; 16: 55–64.
- 65 Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004; 22: 4991–5004.
- 66 Kondo K, Kohno N, Yokoyama A, Hiwada K. Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines. *Cancer research* 1998; 58: 2014–2019.
- 67 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature medicine* 1998; 4: 844–847.
- 68 Kraus S, Abel PD, Nachtmann C, Linsenmann H-J, Weidner W, Stamp GWH, Chaudhary KS, Mitchell SE, Franke FE, Lalani E-N. MUC1 mucin and trefoil factor 1 protein expression in renal cell carcinoma: correlation with prognosis. *Human pathology* 2002; 33: 60–67.
- 69 Kufe DW. Targeting the human MUC1 oncoprotein: a tale of two proteins. *Cancer biology & therapy* 2008; 7: 81–84.
- 70 Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature reviews. Cancer* 2009; 9: 874–885.
- 71 Kufe DW. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene* 2013; 32: 1073–1081.
- 72 Lacunza E, Baudis M, Colussi AG, Segal-Eiras A, Croce MV, Abba MC. MUC1 oncogene amplification correlates with protein overexpression in invasive breast carcinoma cells. *Cancer genetics and cytogenetics* 2010; 201: 102–110.
- 73 Lagow EL, Carson DD. Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of cellular biochemistry* 2002; 86: 759–772.
- 74 Langner C, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Zigeuner R. Expression of MUC1 (EMA) and E-cadherin in renal cell carcinoma: a systematic immunohistochemical analysis of 188 cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2004; 17: 180–188.
- 75 Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2002; 7: 135–140.
- 76 Lee HS, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kim YI, Kim WH. MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 expressions in gastric carcinomas: their roles as prognostic indicators. *Cancer* 2001; 92: 1427–1434.
- 77 Leitlinienprogramm Onkologie. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-017OL-k_S3_Nierenzellkarzinom_2015-09.pdf, Zugriff: 23.11.2016.
- 78 Leroy X, Copin M-C, Devisme L, Buisine M-P, Aubert J-P, Gosselin B, Porchet N. Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology* 2002; 40: 450–457.
- 79 Leroy X, Zerimech F, Zini L, Copin M-C, Buisine M-P, Gosselin B, Aubert J-P, Porchet N. MUC1 expression is correlated with nuclear grade and tumor

- progression in pT1 renal clear cell carcinoma. *American journal of clinical pathology* 2002; 118: 47–51.
- 80 Leroy X, Aubert S, Ballereau C, Birembaut P, Porchet N, Gosselin B, Copin MC. Diffuse expression of MUC 1 in metastases of renal clear cell carcinoma as a possible therapeutic target for renal cancer. *Histopathology* 2005; 47: 435–436.
 - 81 Levi F, Ferlay J, Galeone C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU international* 2008; 101: 949–958.
 - 82 Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J, Ljungberg B. The expression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005; 11: 1129–1135.
 - 83 Ligtenberg MJ, Buijs F, Vos HL, Hilkens J. Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin. *Cancer research* 1992; 52: 2318–2324.
 - 84 Liu S, Ruan M, Li S, Wang L, Yang W. Increased expression of MUC1 predicts poor survival in salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2014; 42: 1891–1896.
 - 85 Li Y, Ren J, Yu W, Li Q, Kuwahara H, Yin L, Carraway KL3, Kufe D. The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 35239–35242.
 - 86 Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, Kiemeny LA. The epidemiology of renal cell carcinoma. *European urology* 2011; 60: 615–621.
 - 87 Lornoy W, Becaus S, Vleeschouwer M de, Morelle V, Fonteyne E, Thienpoint L, Mestdagh J. Renal cell carcinoma, a new complication of analgesic nephropathy. *Lancet (London, England)* 1986; 1: 1271–1272.
 - 88 Loveland BE, Zhao A, White S, Gan H, Hamilton K, Xing P-X, Pietersz GA, Apostolopoulos V, Vaughan H, Karanikas V, Kyriakou P, McKenzie IFC, Mitchell PLR. Mannan-MUC1-pulsed dendritic cell immunotherapy: a phase I trial in patients with adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006; 12: 869–877.
 - 89 Makiguchi Y, Hinoda Y, Imai K. Effect of MUC1 mucin, an anti-adhesion molecule, on tumor cell growth. *Japanese journal of cancer research : Gann* 1996; 87: 505–511.
 - 90 Manne U, Weiss HL, Grizzle WE. Racial differences in the prognostic usefulness of MUC1 and MUC2 in colorectal adenocarcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2000; 6: 4017–4025.
 - 91 Mehrazin R, Smaldone MC, Egleston B, Tomaszewski JJ, Concodora CW, Ito TK, Abbosh PH, Chen DYT, Kutikov A, Uzzo RG. Is anatomic complexity associated with renal tumor growth kinetics under active surveillance? *Urologic oncology* 2015; 33: 167.
 - 92 Merseburger AS, Hennenlotter J, Schilling D, Sievert KD, Kufer R, Kuczyk MA. Application of tissue microarrays for the diagnosis, prognosis and therapeutic decision making in renal cell carcinoma. *Der Urologe. Aug. A* 2006; 45: 323.
 - 93 Mian BM, Bhadkamkar N, Slaton JW, Pisters PWT, Daliani D, Swanson DA, Pisters LL. Prognostic factors and survival of patients with sarcomatoid renal cell carcinoma. *The Journal of urology* 2002; 167: 65–70.

- 94 Moore LE, Wilson RT, Campleman SL. Lifestyle factors, exposures, genetic susceptibility, and renal cell cancer risk: a review. *Cancer investigation* 2005; 23: 240–255.
- 95 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 : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2002; 20: 289–296.
- 96 Nakagawa K, Akagi J, Takai E, Tamori Y, Okino T, Kako H, Egami H, Ogawa M. Prognostic values of MUC-1 molecule expressing cytokine receptor-like epitope and DF3 in patients with gastric carcinoma. *International journal of oncology* 1999; 14: 425–435.
- 97 Nelson EC, Evans CP, Lara PN. Renal cell carcinoma: current status and emerging therapies. *Cancer treatment reviews* 2007; 33: 299–313.
- 98 Oto A, Herts BR, Remer EM, Novick AC. Inferior vena cava tumor thrombus in renal cell carcinoma: staging by MR imaging and impact on surgical treatment. *AJR. American journal of roentgenology* 1998; 171: 1619–1624.
- 99 Oudard S, Rixe O, Beuselinck B, Linassier C, Banu E, Machiels J-P, Baudard M, Ringeisen F, Velu T, Lefrere-Belda M-A, Limacher J-M, Fridman WH, Azizi M, Acres B, Tartour E. A phase II study of the cancer vaccine TG4010 alone and in combination with cytokines in patients with metastatic renal clear-cell carcinoma: clinical and immunological findings. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2011; 60: 261–271.
- 100 Pal SK, Hu A, Figlin RA. A new age for vaccine therapy in renal cell carcinoma. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 2013; 19: 365–370.
- 101 Park I, Lee J-L, Ahn J-H, Lee D-H, Lee K-H, Jeong IG, Song C, Hong B, Hong JH, Ahn H. Active surveillance for metastatic or recurrent renal cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2014; 140: 1421–1428.
- 102 Pastor-Soler NM, Sutton TA, Mang HE, Kinlough CL, Gendler SJ, Madsen CS, Bastacky SI, Ho J, Al-Bataineh MM, Hallows KR, Singh S, Monga SP, Kobayashi H, Haase VH, Hughey RP. Muc1 is protective during kidney ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology. Renal physiology* 2015; 308: 62.
- 103 Patard J-J, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, La Taille A de, Tostain J, Artibani W, Abbou CC, Lobel B, Guille F, Chopin DK, Mulders PFA, Wood CG, Swanson DA, Figlin RA, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; 23: 2763–2771.
- 104 Pegram MD, Borges VF, Ibrahim N, Fuloria J, Shapiro C, Perez S, Wang K, Schaedli Stark F, Courtenay Luck N. Phase I dose escalation pharmacokinetic assessment of intravenous humanized anti-MUC1 antibody AS1402 in patients with advanced breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2009; 11: R73.
- 105 Peralta-Venturina M de, Moch H, Amin M, Tamboli P, Hailemariam S, Mihatsch M, Javidan J, Stricker H, Ro JY, Amin MB. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. *The American journal of surgical pathology* 2001; 25: 275–284.
- 106 Pesch B, Haerting J, Ranft U, Klimpel A, Oelschlägel B, Schill W. Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter urothelial and renal cancer study. *International journal of epidemiology* 2000; 29: 1014–1024.

- 107 Pfannschmidt J, Hoffmann H, Muley T, Krysa S, Trainer C, Dienemann H. Prognostic factors for survival after pulmonary resection of metastatic renal cell carcinoma. *The Annals of thoracic surgery* 2002; 74: 1653–1657.
- 108 Pochampalli MR, el Bejjani RM, Schroeder JA. MUC1 is a novel regulator of ErbB1 receptor trafficking. *Oncogene* 2007; 26: 1693–1701.
- 109 Pochampalli MR, Bitler BG, Schroeder JA. Transforming growth factor alpha dependent cancer progression is modulated by Muc1. *Cancer research* 2007; 67: 6591–6598.
- 110 Powles T, Ljungberg B, Bensalah K, Bex A, Canfield S, Giles R H, Hora M, Kuczyk M A, Lam T, Merseburger A S, Staehler M, Volpe A. European Association of Urology Guidelines. *European urology* 2016; 2016.
- 111 Pyrhonen S, Salminen E, Ruutu M, Lehtonen T, Nurmi M, Tammela T, Juusela H, Rintala E, Hietanen P, Kellokumpu-Lehtinen PL. Prospective randomized trial of interferon alfa-2a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1999; 17: 2859–2867.
- 112 Rahn JJ, Dabbagh L, Pasdar M, Hugh JC. The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature. *Cancer* 2001; 91: 1973–1982.
- 113 Rahn JJ, Shen Q, Mah BK, Hugh JC. MUC1 initiates a calcium signal after ligation by intercellular adhesion molecule-1. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279: 29386–29390.
- 114 Raina D, Kharbanda S, Kufe D. The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279: 20607–20612.
- 115 Raina D, Kosugi M, Ahmad R, Panchamoorthy G, Rajabi H, Alam M, Shimamura T, Shapiro GI, Supko J, Kharbanda S, Kufe D. Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 2011; 10: 806–816.
- 116 Raina D, Uchida Y, Kharbanda A, Rajabi H, Panchamoorthy G, Jin C, Kharbanda S, Scaltriti M, Baselga J, Kufe D. Targeting the MUC1-C oncoprotein downregulates HER2 activation and abrogates trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Oncogene* 2014; 33: 3422–3431.
- 117 Rajabi H, Ahmad R, Jin C, Kosugi M, Alam M, Joshi MD, Kufe D. MUC1-C oncoprotein induces TCF7L2 transcription factor activation and promotes cyclin D1 expression in human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 2012; 287: 10703–10713.
- 118 Rausch S, Kruck S, Stenzl A, Bedke J. IMA901 for metastatic renal cell carcinoma in the context of new approaches to immunotherapy. *Future oncology (London, England)* 2014; 10: 937–948.
- 119 Rausch S, Beermann J, Scharpf M, Hennenlotter J, Fend F, Stenzl A, Schollenberger D, Bedke J, Kruck S. Differential expression and clinical relevance of MUC1 in renal cell carcinoma metastasis. *World journal of urology* 2016; 34: 1635–1641.
- 120 Rausch S, Kruck S, Walter K, Stenzl A, Bedke J. Metastasectomy for metastatic renal cell carcinoma in the era of modern systemic treatment: C-reactive protein is an independent predictor of overall survival. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 2016.
- 121 Rendon RA. Active surveillance as the preferred management option for small renal masses. *Canadian Urological Association Journal* 2010; 4: 136–138.

- 122 Ren J, Agata N, Chen D, Li Y, Yu W-h, Huang L, Raina D, Chen W, Kharbanda S, Kufe D. Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer cell* 2004; 5: 163–175.
- 123 Rittig SM, Haentschel M, Weimer KJ, Heine A, Muller MR, Brugger W, Horger MS, Maksimovic O, Stenzl A, Hoerr I, Rammensee H-G, Holderried TAW, Kanz L, Pascolo S, Brossart P. Intradermal vaccinations with RNA coding for TAA generate CD8+ and CD4+ immune responses and induce clinical benefit in vaccinated patients. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2011; 19: 990–999.
- 124 Robert Koch-Institut (RKI). Kapitel 2: Epidemiologie von Krebserkrankungen – Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.
- 125 Rochlitz C, Figlin R, Squiban P, Salzberg M, Pless M, Herrmann R, Tartour E, Zhao Y, Bizouarne N, Baudin M, Acres B. Phase I immunotherapy with a modified vaccinia virus (MVA) expressing human MUC1 as antigen-specific immunotherapy in patients with MUC1-positive advanced cancer. *The journal of gene medicine* 2003; 5: 690–699.
- 126 Rohrmann S, Linseisen J, Overvad K, Lund Wurtz AM, Roswall N, Tjonneland A, Boutron-Ruault M-C, Racine A, Bastide N, Palli D, Agnoli C, Panico S, Tumino R, Sacerdote C, Weikert S, Steffen A, Kuhn T, Li K, Khaw K-T, Wareham NJ, Bradbury KE, Peppas E, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PHM, Hjartaker A, Skeie G, Weiderpass E, Jakszyn P, Dorronsoro M, Barricarte A, Santiuste de Pablos C, Molina-Montes E, de la Torre, Ramon Alonso, Ericson U, Sonestedt E, Johansson M, Ljungberg B, Freisling H, Romieu I, Cross AJ, Vergnaud A-C, Riboli E, Boeing H. Meat and fish consumption and the risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2015; 136: 31.
- 127 Sacco E, Pinto F, Sasso F, Racioppi M, Gulino G, Volpe A, Bassi P. Paraneoplastic syndromes in patients with urological malignancies. *Urologia internationalis* 2009; 83: 1–11.
- 128 Sagara M, Yonezawa S, Nagata K, Tezuka Y, Natsugoe S, Xing PX, McKenzie IF, Aikou T, Sato E. Expression of mucin 1 (MUC1) in esophageal squamous-cell carcinoma: its relationship with prognosis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 1999; 84: 251–257.
- 129 Schachter LR, Cookson MS, Chang SS, Smith JA, JR, Dietrich MS, Jayaram G, Herrell SD. Second prize: frequency of benign renal cortical tumors and histologic subtypes based on size in a contemporary series: what to tell our patients. *Journal of endourology / Endourological Society* 2007; 21: 819–823.
- 130 Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ. Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 13057–13064.
- 131 Sella A, Logothetis CJ, Ro JY, Swanson DA, Samuels ML. Sarcomatoid renal cell carcinoma. A treatable entity. *Cancer* 1987; 60: 1313–1318.
- 132 Shao Y, Sun X, He Y, Liu C, Liu H, Batra SK. Elevated Levels of Serum Tumor Markers CEA and CA15-3 Are Prognostic Parameters for Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *PloS one* 2015; 10: e0133830.
- 133 Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA A Cancer Journal for Clinicians* 2014; 64: 9–29.

- 134 Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Immunohistochemical Analysis of Tissue Microarrays. In: Simon R (Hrsg.). Tissue Microarrays 113–126. Humana Press, 2010.
- 135 Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. Trends in cell biology 2006; 16: 467–476.
- 136 Singh PK, Wen Y, Swanson BJ, Shanmugam K, Kazlauskas A, Cerny RL, Gendler SJ, Hollingsworth MA. Platelet-derived growth factor receptor beta-mediated phosphorylation of MUC1 enhances invasiveness in pancreatic adenocarcinoma cells. Cancer research 2007; 67: 5201–5210.
- 137 Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Georgiou L, Anastasiadis P. Patterns of episialin/MUC1 expression in endometrial carcinomas and prognostic relevance. Histopathology 2002; 40: 92–100.
- 138 Spicer AP, Rowse GJ, Lidner TK, Gendler SJ. Delayed mammary tumor progression in Muc-1 null mice. The Journal of biological chemistry 1995; 270: 30093–30101.
- 139 Steffens S, Köhler A, Rudolph R, Eggers H, Seidel C, Janssen M, Wegener G, Schrader M, Kuczyk MA, Schrader AJ. Validation of CRP as prognostic marker for renal cell carcinoma in a large series of patients. BMC cancer 2012; 12: 1–7.
- 140 Sun M, Abdollah F, Bianchi M, Trinh Q-D, Jeldres C, Thuret R, Tian Z, Shariat SF, Montorsi F, Perrotte P, Karakiewicz PI. Treatment management of small renal masses in the 21st century: a paradigm shift. Annals of surgical oncology 2012; 19: 2380–2387.
- 141 Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles DW, Dalziel M. MUC1 and cancer. Biochimica et biophysica acta 1999; 1455: 301–313.
- 142 Theis RP, Dolwick Grieb SM, Burr D, Siddiqui T, Asal NR. Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study. BMC cancer 2008; 8: 387.
- 143 Thomas AZ, Adibi M, Slack RS, Borregales LD, Merrill MM, Tamboli P, Sircar K, Jonasch E, Tannir NM, Matin SF, Wood CG, Karam JA. The Role Of Metastasectomy In Patients With Renal Cell Carcinoma With Sarcomatoid Dedifferentiation: A Matched Controlled Analysis. The Journal of urology 2016.
- 144 Tomaszewski JJ, Uzzo RG, Smaldone MC. Heterogeneity and renal mass biopsy: a review of its role and reliability. Cancer biology & medicine 2014; 11: 162–172.
- 145 Tomera KM, Farrow GM, Lieber MM. Sarcomatoid renal carcinoma. The Journal of urology 1983; 130: 657–659.
- 146 UCLA Institute of Urologic Oncology. Kidney Cancer Diagnosis. <http://urology.ucla.edu/body.cfm?id=443>, Zugriff: 23.11.2016.
- 147 Utsunomiya T, Yonezawa S, Sakamoto H, Kitamura H, Hokita S, Aiko T, Tanaka S, Irimura T, Kim YS, Sato E. Expression of MUC1 and MUC2 mucins in gastric carcinomas: its relationship with the prognosis of the patients. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 1998; 4: 2605–2614.
- 148 Vamvakas S, Brüning T, Bolt HM, Henschler D, Ulm K. Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethene. Journal of cancer research and clinical oncology 2000; 126: 178–180.
- 149 Volpe A, Finelli A, Gill IS, Jewett MAS, Martignoni G, Polascik TJ, Remzi M, Uzzo RG. Rationale for percutaneous biopsy and histologic characterisation of renal tumours. European urology 2012; 62: 491–504.
- 150 Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, Zdrojowy R, Pluzanska A, Szczylik C, Staehler M, Brugger W, Dietrich P-Y, Mendrzyk R, Hilf N, Schoor O, Fritsche J, Mahr A, Maurer D, Vass V, Trautwein C, Lewandrowski P, Flohr C, Pöhla H, Stanczak JJ,

- Bronte V, Mandruzzato S, Biedermann T, Pawelec G, Derhovanessian E, Yamagishi H, Miki T, Hongo F, Takaha N, Hirakawa K, Tanaka H, Stevanovic S, Frisch J, Mayer-Mokler A, Kirner A, Rammensee H-G, Reinhardt C, Singh-Jasuja H. Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nature medicine* 2012; 18: 1254–1261.
- 151 Wesseling J, van der Valk, S W, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *The Journal of cell biology* 1995; 129: 255–265.
- 152 Wesseling J, van der Valk, S W, Hilkens J. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Molecular biology of the cell* 1996; 7: 565–577.
- 153 Wierceky J, Mueller M, Brossart P. Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2006; 55: 63–67.
- 154 Wittekind C, Meyer H-J. TNM. 1. Aufl. Wiley-VCH, s.l. 2013.
- 155 World Health Organization (Hrsg.). *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*.
- 156 Xia L, Wang L, Chung AS, Ivanov SS, Ling MY, Dragoi AM, Platt A, Gilmer TM, Fu X-Y, Chin YE. Identification of both positive and negative domains within the epidermal growth factor receptor COOH-terminal region for signal transducer and activator of transcription (STAT) activation. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277: 30716–30723.
- 157 Xia W-K, Wu X, Yu T-H, Wu Y, Yao X-J, Hu H. Prognostic significance of lymphocyte-to-monocyte ratio and CRP in patients with nonmetastatic clear cell renal cell carcinoma: a retrospective multicenter analysis. *OncoTargets and therapy* 2016; 9: 2759–2767.
- 158 Yao M, Zhang W, Zhang Q, Xing L, Xu A, Liu Q, Cui B. Overexpression of MUC1 enhances proangiogenic activity of non-small-cell lung cancer cells through activation of Akt and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Lung* 2011; 189: 453–460.
- 159 Yu C-P, Ho J-Y, Huang Y-T, Cha T-L, Sun G-H, Yu D-S, Chang F-W, Chen S-P, Hsu R-J. Estrogen inhibits renal cell carcinoma cell progression through estrogen receptor-beta activation. *PloS one* 2013; 8: e56667.
- 160 Zambrano NR, Lubensky IA, Merino MJ, Linehan WM, Walther MM. Histopathology and molecular genetics of renal tumors toward unification of a classification system. *The Journal of urology* 1999; 162: 1246–1258.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Tübingen unter Betreuung von Professor Dr. Jens Bedke durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Professor Dr. Jens Bedke, stellvertretendem ärztlicher Direktor der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Tübingen und PD Dr. Stephan Kruck, Oberarzt in der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Tübingen.

Die Erstellung der Datenbank wurde von mir nach Einarbeitung durch PD Dr. Stephan Kruck eigenständig vorgenommen.

Die Arbeit im Archiv des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen wurde nach Einweisung durch Ulrike Wlokka, ehemalige studentische Mitarbeiterin am Institut, selbstständig durchgeführt.

Das Mikroskopieren der Gewebeschnitte wurde nach Einweisung von Dr. Marcus Scharpf, ärztlichem Mitarbeiter der Abteilung für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen, selbstständig durchgeführt. Unklare Befunde wurden durch Herr Dr. Marcus Scharpf kontrolliert und bei Bedarf korrigiert.

Die Erstellung der Tissue Micro Arrays habe ich nach Einweisung durch Julian Heinkele, einen studentischen Mitarbeiter im urologischen Labor der Universitätsklinik Tübingen, selbstständig durchgeführt.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden maschinell am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die Maschinen wurden dabei durch die MTA Claudia Hermann, Mitarbeiterin des Instituts, bedient.

Das Erstellen der Färbescores und das anschließende Auszählen der immunhistochemisch gefärbten Zellen wurde nach Anleitung durch Dr. Steffen Rausch, Oberarzt der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Tübingen, selbstständig durch mich vorgenommen. Im Anschluss hat Dr. Steffen Rausch die Zellen erneut ausgezählt. Bei größeren Abweichungen habe ich die Zellen ein drittes Mal ausgezählt.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit von Dr. Steffen Rausch und mir.

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

Tübingen, den 28.12.2016

8. Publikation

Inhalte der vorliegenden Dissertationschrift wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

119

World J Urol
DOI 10.1007/s00345-016-1804-8



ORIGINAL ARTICLE

Differential expression and clinical relevance of MUC1 in renal cell carcinoma metastasis

Steffen Rausch¹ · Johanna Beermann¹ · Marcus Scharpf² · Jörg Hennenlotter¹ · Falko Fend² · Arnulf Stenzl¹ · Daniel Schollenberger¹ · Jens Bedke¹ · Stephan Kruck¹

Received: 10 December 2015 / Accepted: 5 March 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract

Purpose To determine the differential expression patterns and prognostic relevance of Mucin-1 (MUC1) expression in clear cell renal cell carcinoma (RCC) metastasis.

Methods Tissue microarrays (TMA) from samples of 151 RCC metastases, 61 primary RCCs and corresponding benign renal tissues were immunohistochemically stained for MUC1 and semi-quantitatively evaluated by immunoreactivity scores (IRS). MUC1 differential expression in metastasis, primary RCC and normal tissue were comparatively analyzed. Patient characteristics and clinical follow-up for patients with metastatic RCC (mRCC) were recorded. Correlations of MUC1 expression with mRCC survival were determined.

Results Median cytoplasmic expression was highest in benign tissue (IRS = 1.04). Primary RCC (0.50) and metastasis (0.12) showed significantly lower cytoplasmic staining intensity. Membranous expression in benign tissue was, however, significantly lower (0.21) compared with primary RCC (0.59) and metastasis (0.57). Notable differences of MUC1 cytoplasmic and membranous expression were observed between different metastasis sites. Significantly

higher ($P = 0.014$) membranous expression was observed in pulmonary versus non-pulmonary lesions, while no significant differences of cytoplasmic MUC1 expression were observed. The prognostic relevance of MUC1 expression in metastatic RCC was limited.

Conclusions MUC1 is differentially expressed in benign renal tissue, primary RCC and RCC metastasis. Membranous MUC1 expression was significantly elevated in pulmonary metastases compared to non-pulmonary lesions, which may reflect individual biology and putative response to MUC1-based anti-cancer therapy.

Keywords Mucin · Renal cell cancer · Clear cell · Prognosis · Metastasis

Introduction

Mucin-1 (MUC1) is a membrane-anchored member of the mucin family. It is translated as a single peptide and after auto-cleavage two subunits are formed. Both the extracellular N-terminal (MUC-N) domain and C-terminal (MUC-C) domain consist of an extracellular, transmembrane and cytoplasmic fraction, forming a heterodimer through a non-covalent binding [1–3]. Transmembrane interactions with vascular endothelial growth factor (VEGF) as well as regulatory cytoplasmic properties and even direct effects as a transcription cofactor for genes that mediate malignant transformation have been identified as tumor promoting qualities of MUC1, with the main functional relevance accredited to MUC-C [1–3].

Renal cell carcinoma (RCC) is associated in high frequency with mutation, loss of heterozygosity (LOH), or promoter methylation of the von Hippel-Lindau (VHL) gene [4], leading to an accumulation of hypoxia-inducible-factor

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00345-016-1804-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jens Bedke
bedke@live.com

Falko Fend
falko.fend@med.uni-tuebingen.de

¹ Department of Urology, Eberhard-Karls-University
Tübingen, Hoppe-Seyler-Str.3, 72076 Tübingen, Germany

² Department of Pathology, Eberhard-Karls-University
Tübingen, Liebermeisterstraße 8, 72076 Tübingen, Germany

Published online: 19 March 2016

Springer

(HIF) 1- α and consecutive transcription of pro-tumorigenic genes. MUC1 is directly regulated by HIF-1- α which delineated MUC1 as a potential therapeutic target in RCC [5].

Moreover, overexpression of MUC1 has been reported to be associated with cancer prognosis and metastatic progression in a multitude of cancer entities, including clear cell RCC [2, 6–10]. While prior studies have evaluated the prognostic relevance of MUC1 in primary RCC [11–14], and metastasis status of patients with primary RCC has been described as associated with MUC1 expression [5], data on the extent and importance of MUC1 protein expression in RCC metastases are limited.

With regard to current advances in the development and (pre-)clinical application of MUC1-based anti-cancer therapies by synthetic peptide vaccination [15], or competitive MUC1 inhibitors [16, 17], information on MUC1 expression in metastases of RCC and the prognostic relevance of MUC1 in patients with mRCC could contribute to improved patient selection for the respective treatments in clinical trials.

In the present study, immunohistochemical (IHC) expression patterns of MUC1 in RCC metastasis and the prognostic significance of MUC1 expression in primary and metastatic RCC (mRCC) were evaluated. In addition, the relevance of MUC1 cytoplasmic versus membranous staining localization was analyzed separately.

Patients and methods

Tissue microarrays (TMA) from samples of a total of 151 patients from the Department of Urology, University hospital Tübingen were created. The technique of TMA is described in detail elsewhere [18]. The TMAs consisted of two cores (core size 0.6 mm) of 151 RCC metastases from 90 patients after metastasectomy for mRCC, and 61 primary RCCs and corresponding benign renal tissues after surgical treatment with curative intent (nephrectomy or partial nephrectomy), respectively. Only patients with histologically confirmed clear cell renal carcinoma (ccRCC) were included. Benign cores were taken from blocks without cancer infiltration. Patient characteristics and clinical follow-up were recorded. Written informed consent was obtained by all participants. The study was approved by the ethics committee of the University of Tübingen (078/2012B02).

Immunohistochemistry

TMA slides were incubated with a lyophilized mouse monoclonal anti-MUC1 antibody (Novocastra™, product code: NCL-MUC-1, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)

diluted at 1:300 using a commercial diluent (Dako, Glostrup, Denmark) at 37 °C/99 °F for 32 min. For visualization an iView™ DAB detection kit (ROCHE, Basel, Switzerland) was applied. Gill's hematoxylin (own product) was used for counterstaining. Negative controls were performed by omitting the primary antibody.

Semi-quantitative evaluation of TMAs

TMA evaluation was performed in a blinded fashion by two independent reviewers (SR, JoB). MUC1 was evaluated with regard to cytoplasmic and membranous staining patterns. Both parameters were quantified according to an immunoreactivity score (IRS), multiplying the percentage (0.0–1.0) of positive cells by a factor representing the intensity of immune-reactivity (0 no staining, 1 weak, 2 moderate, and 3 strong staining), giving a maximum score of 3.0. Supplementary Figure 1 illustrates different staining intensities for cytoplasmic and membranous expression of MUC1.

Statistical analysis

For the comparison of MUC1 expression in metastasis, primary RCC and normal tissue, Kruskal–Wallis analysis was performed. Kaplan–Meier analyses were performed to estimate survival in dependence of high or low MUC1 expression, which was set as higher, or lower than the median staining score. Logistic regression was performed to determine association between membranous and cytoplasmic expression values. Differences between subgroups were evaluated by log-rank tests. Univariate and multivariate Cox proportional regression analyses were performed to assess the correlation of clinical parameters with survival. Statistical significance was regarded as $P < 0.05$. Statistical analyses were performed using MedCalc (Version 12.5, Ostend, Belgium).

Results

Differential expression of MUC1 in benign tissue, primary clear cell RCC and metastasis

A summary of patients' characteristics is given in Supplementary Table 1. All benign samples (100 %), 84 % ($n = 51$) of evaluable primary RCC, and 83 % ($n = 63$) of mRCC patient samples showed overall MUC1 expression. Figure 1 illustrates MUC1 cytoplasmic and membranous expression determinants in the respective subgroups. Median cytoplasmic expression was highest in benign tissue (IRS = 1.04), while primary RCC (0.50) and metastasis (0.12) showed significantly reduced cytoplasmic staining

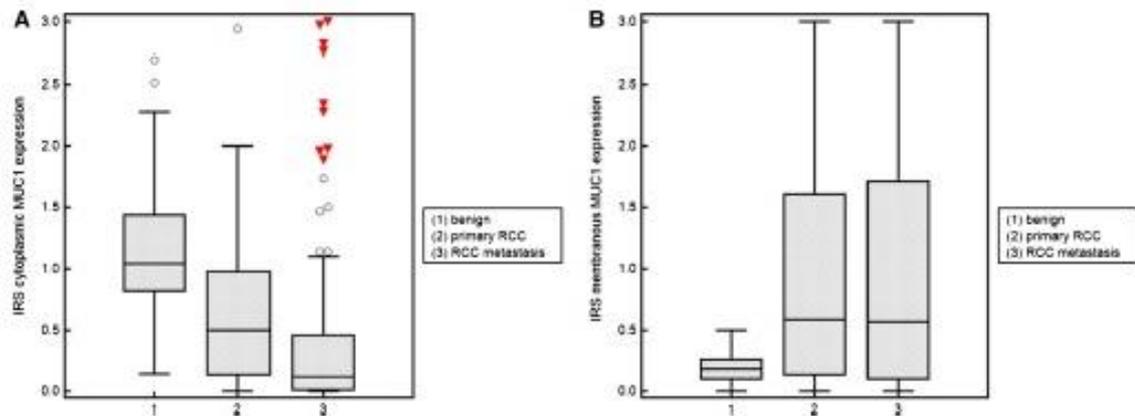


Fig. 1 Differential subcellular (a cytoplasmic, b membranous) expression of MUC-1 in benign tissue ($n = 50$), primary RCC ($n = 61$), and metastasis ($n = 151$), outliers are marked in red

Table 1 Immunoreactivity scores (IRS) for cytoplasmic and membranous MUC1 expression in benign renal tissue, primary RCC, and RCC metastasis

	IRS-MUC1 cytoplasmic expression				IRS-MUC1 membranous expression			
	Collective	(1) Benign tissue	(2) Primary RCC	(3) RCC metastasis	Collective	(1) Benign tissue	(2) Primary RCC	(3) RCC metastasis
Sample size	262	50	61	151	262	50	61	151
Lowest value	0	0.14	0	0	0	0	0	0
Highest value	3	2.70	2.94	3	3	1	3	3
Arithmetic mean	0.58	1.16	0.69	0.37	0.77	0.30	0.91	0.92
95 % CI for the mean	0.50–0.67	1.01–1.32	0.52–0.87	0.27–0.47	0.66–0.87	0.23–0.37	0.69–1.12	0.77–1.07
Median	0.31	1.04	0.5	0.12	0.36	0.21	0.59	0.57
95 % CI for the median	0.22–0.49	0.84–1.34	0.36–0.76	0.06–0.16	0.26–0.49	0.16–0.36	0.36–1.07	0.38–0.81
Different from factor (<0.01)*		(2)(3)	(1)(3)	(1)(2)		(2)(3)	(1)	(1)

CI confidence interval, RCC renal cell carcinoma

* P from Kruskal–Wallis analysis

intensity ($P < 0.05$). In contrast, membranous expression in benign tissue was significantly lower (0.21) compared with primary RCC (0.59) and metastasis (0.57) (Table 1). No correlation between membranous and cytoplasmic MUC1 expression was observed in benign tissue ($r < 0.01$, $P = 0.83$), while membranous and cytoplasmic expression in primary RCC and mRCC tissue were significantly associated ($r = 0.13$, $P < 0.001$ and $r = 0.21$, $P < 0.001$, respectively).

The evaluation of MUC1 expression at different metastasis sites is illustrated in Fig. 2a, b. Notable differences of MUC1 cytoplasmic and membranous expression were

observed between pulmonary, pleural, mediastinal and skin metastases (high expression) and intestinal, liver, bone, lymph node, or adrenal metastases, which showed only low to moderate MUC1 expression levels. When comparing expression levels of pulmonary versus non-pulmonary metastases (Fig. 2c, d), a significantly higher ($P = 0.014$) membranous expression was observed in pulmonary lesions. No significant differences of cytoplasmic MUC1 expression between pulmonary and non-pulmonary metastases were present. Mean and median MUC1 expression for the respective metastasis sites are summarized in Supplementary Table 2.

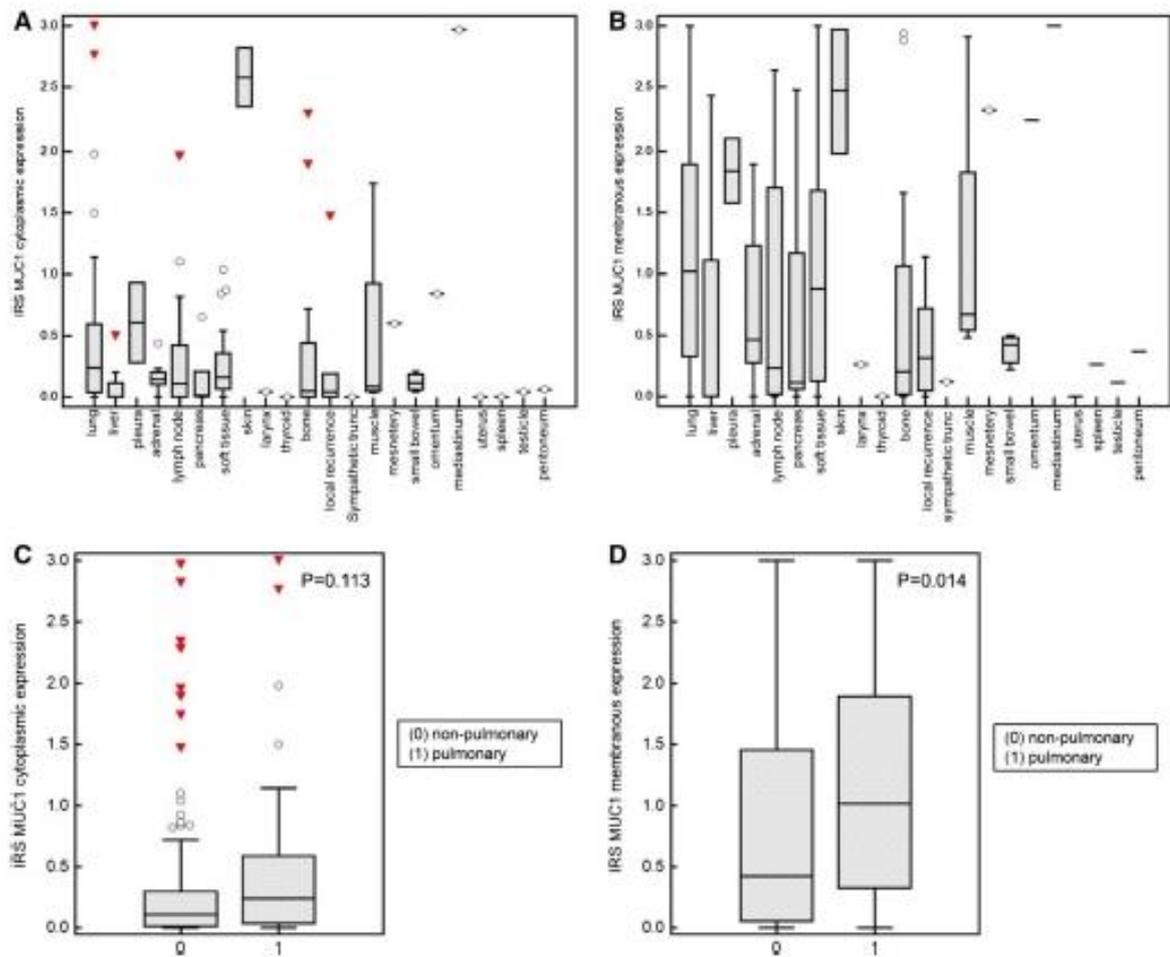


Fig. 2 MUC1 expression (a cytoplasmic, b membranous) in dependence of metastasis localization and pulmonary ($n = 40$) or non-pulmonary metastasis ($n = 111$) c, d outliers are marked in red

Prognostic value of MUC1 expression in mRCC

Median OS for mRCC patients was 66.1 months (95 % CI 51.3–66.1). Kaplan–Meier survival analysis for the mRCC cohort in dependence of MUC1 expression is given in Supplementary Figure 2. Median OS in dependence of MUC1 cytoplasmic expression level was similar with 64.6 months (36.9–64.6) in the high expression, and 66.1 months (43.1–66.1) in the low expression subgroup, respectively. Patients with high membranous MUC1 expression showed a median OS of 51.3 (23.9–51.3) months, while patients with low membranous MUC1 expression survived a median of 66.1 months (58.0–66.1). No significant association of OS with MUC1 cytoplasmic ($P = 0.767$), membranous ($P = 0.183$) or overall ($P = 0.518$) expression was observed. Univariate Cox regression analysis identified

anemia ($P = 0.028$), elevated lactate dehydrogenase (LDH; $P = 0.045$), and Karnofsky performance status <80 % ($P = 0.031$) as significant determinants of OS in mRCC. No determinant was identified as an independent prognosticator of OS in multivariate analysis (Table 2).

Discussion

MUC1 expression in association with cancer prognosis and metastasis has been discussed based on the observation of multiple interactions of MUC1 with transmembrane proteins, cytoplasmic signaling pathways and transcription regulation of pro-invasive genes [1, 3, 19]. While the extracellular domain of MUC1 may be aberrantly glycosylated in cancer, leading to putative revelation of immunogenic

Table 2 Univariate and multivariate Cox regression analysis for overall survival in the mRCC cohort (n = 76)

Covariate	Univariate						Multivariate					
	b	SE	Wald	P	exp(b)	95 % CI of exp(b)	b	SE	Wald	P	exp(b)	95 % CI of exp(b)
MUC1 cytoplasmic > median	-0.12	0.39	0.09	0.767	0.89	0.41-1.92						
MUC1 membranous > median	-0.61	0.40	2.37	0.124	0.54	0.25-1.18						
MUC1 overall expression	-0.32	0.50	0.41	0.520	0.72	0.27-1.92						
Anemia	0.92	0.42	4.81	0.028	2.50	1.11-5.64	0.66	0.49	1.82	0.177	1.94	0.75-5.07
Sex male/female	0.51	0.43	1.43	0.232	1.67	0.72-3.84						
Thrombocytosis	0.49	0.42	1.35	0.245	1.63	0.72-3.73						
LDH elevation	1.11	0.55	4.03	0.045	3.05	1.03-8.99	0.31	0.70	0.19	0.662	1.36	0.35-5.37
Elevated calcium	1.13	0.75	2.29	0.130	3.10	0.72-13.31						
CRP elevation	1.10	0.62	3.12	0.077	3.00	0.89-10.09						
BMI > 30	0.13	0.54	0.05	0.817	0.88	0.31-2.55						
Karnofsky < 80	1.07	0.50	4.68	0.031	2.93	1.11-7.71	0.78	0.60	1.65	0.198	2.18	0.67-7.07
Gamma-GT elevation	0.58	0.46	1.58	0.208	1.78	0.73-4.35						
Leukocyte count elevation	0.65	0.62	1.09	0.296	1.92	0.57-6.49						
Creatinine elevation	-0.38	0.42	0.83	0.364	0.69	0.31-1.54						

Significant changes are highlighted in bold

exp(b) hazard ratio, CI confidence interval, SE standard error, BMI body mass index, LDH lactate dehydrogenase, CRP C reactive protein

cancer epitopes, the cytoplasmic domain of MUC1 is involved in signal transduction. As the HIF-1-alpha signaling is known as the main renal carcinogenic pathway, the reported link between MUC1 and this pathway is of special interest. Using different renal cell models and small interfering RNA assays targeting either HIF-1-alpha or YC-1, a HIF-1 pharmacologic inhibitor, Aubert et al. showed induction of MUC1 expression under hypoxia by a HIF-1-alpha dependent mechanism. Moreover, a direct binding of HIF-1-alpha at the MUC1 promoter and a MUC1 knockdown reduced invasive and migration properties of RCC cells under hypoxia. A concomitant increase in HIF-1-alpha and MUC1 in metastatic versus non-metastatic RCC cells was reported [5].

In accordance to these functional interrelations, MUC1 expression has been identified as a prognostic parameter in multiple cancers, including breast, lung, ovarian, pancreatic, salivary gland, or small bowel cancer [2, 7-10, 17, 20]. Several authors have evaluated the clinical relevance of immunohistochemical MUC1 expression in primary RCC specimen, describing MUC1 as a putative diagnostic and prognostic marker [11-14, 21].

Knowledge on MUC1 expression patterns and their prognostic relevance in RCC metastases is limited. Leroy et al. analyzed 22 consecutive cases of metastases from RCC and ten cases of corresponding primary renal tumor. Nineteen of 22 metastasis cases (86.6 %) were positive for MUC1. The percentage of stained cells varied from 15-90 % (mean 62 %). In corresponding primary renal cancer, 90 % of tumors expressed MUC1, with more than

50 % of cells showing immunoreactivity [22]. In the present study, the percentage of MUC1 overall positive samples was 100 % in benign renal tissue, 83.6 % in primary RCC, and 82.9 % in RCC metastases. Membranous MUC1 expression was significantly higher in both malignant tissue types (primary and metastasis) compared to benign renal tissue. However, no significant difference in membranous MUC1 expression between primary cancer and metastasis was noted. In contrast, cytoplasmic proportions of MUC1 were reduced in primary RCC and RCC metastasis compared to benign tissue. Moreover, the observed difference between primary cancer and metastasis tissue was significant. While knowledge on the relevance of cytoplasmic MUC1 expression in RCC is limited, it has been described as a predominant feature of chromophobe RCC, or type 1 papillary RCC [13, 23]. The prognostic relevance of discriminating MUC1 cellular localization in primary RCC was outlined by Langner et al., describing a differential apical or circumferential membranous staining pattern of MUC1 in conventional (clear cell) RCC as related to pT-stage ($P = 0.002$) and tumor grade ($P = 0.001$) [13].

The observed high cytoplasmic MUC1 expression levels in benign renal tissue and lower levels in primary RCC and RCC metastasis in the present study may reflect differences in biological behavior and aggressiveness between these lesions. Nevertheless, no association between MUC1 cytoplasmic expression levels and mRCC prognosis was detected. As this limitation was also present for membranous and overall MUC1 expression patterns, the utility of MUC1 expression as a prognostic biomarker in mRCC

appears limited. Eichelberg et al. earlier concluded that besides the existence of promising molecular markers for RCC, currently available data were not yet valid enough for routine, clinical application of any RCC marker. Stratification for RCC type and treatment modalities was demanded by the authors, in order to lift the use of molecular markers in RCC to a practical level [24]. The latter recommendation appears especially interesting with regard to MUC1.

MUC1 has been used as a target for specific cancer immunotherapy and clinical trials have been performed integrating MUC1 as a target peptide for anti-cancer vaccination or direct functional inhibition [15–17, 25, 26]. Interestingly, differences between metastasis sites with high MUC1 expression, like lung, pleura, mediastinum, or skin and low MUC1 cytoplasmic and membranous expression, like the small bowel, liver, bone, lymph node, or adrenal metastases were observed in this study. Pulmonary metastases showed significantly higher membranous expression levels compared to non-pulmonary lesions, which may be clinically relevant with regard to the application of MUC1-based systemic therapies. Earlier investigations have indicated individual clinical and biological characteristics of pulmonary RCC metastases. Unspecific combination immunotherapy with low-dose IL-2 plus IFN- α has been reported to be particularly effective for mRCC patients with metastasis limited to lung [27]. Moreover, retrospective studies have suggested a survival benefit following pulmonary metastasectomy in selected patients [28] and the rare events of spontaneous regression of RCC metastases have been frequently reported with pulmonary involvement [29].

While it remains to be elucidated, whether the individual cancer biology of pulmonary metastases contributes to these effects and observations, further analyses should aim at the evaluation of divergent clinical effectiveness of MUC1-based therapies in dependence of MUC1 expression and RCC metastasis localization. In consequence, more individualized approaches of MUC1-based treatment strategies will be possible.

The present study is limited by the retrospective approach and the sample size. Moreover, analyses of central nervous system metastases cannot be given due to the unavailability of corresponding surgical specimen. To overcome the limitation of post hoc comparison of independent primary RCC and mRCC patient cohorts and to gain information on intra-individual MUC1 expression differences, it would be of additional interest to compare MUC1 primary tumor expression with corresponding metastatic tissue from the same patient. To obtain this, the evaluation of larger tissue biobanks appears appropriate. The study is further inherent to the limitations of semi-quantitative TMA analysis, such as inter-observer variability and variable performance of immunoassays. Future studies should

additionally try to evaluate the possible integration of automated TMA analysis.

However, to the authors' knowledge, the present report is the first to describe the relevance of differential MUC1 expression in RCC metastasis along with a prognostic evaluation of MUC1 in a patient cohort with mRCC.

Conclusions

MUC1 is differentially expressed in benign renal tissue, primary RCC and RCC metastasis. In addition, MUC1 expression was found to be different at distinct metastasis sites. Membranous MUC1 expression was significantly higher in pulmonary metastases compared to non-pulmonary lesions, which may reflect individual biology and response to MUC1-based anti-cancer therapy. MUC1 expression was not associated with metastatic RCC prognosis. Since MUC1-based treatment regimen for advanced and metastatic cancer are subject to clinical investigation, future analyses should aim at the evaluation of MUC1 expression in primary cancer and metastases as a predictive biomarker for treatment response and survival in these patients.

Acknowledgments We thank Claudia Hermann, Department of Pathology, University of Tübingen for technical assistance with the immunohistochemical analysis. SR is supported by a Ferdinand-Eisenberger-Grant of the German Society of Urology (RaSI/FE-14).

Authors' contributions Steffen Rausch, Stephan Kruck, and Jens Bedke contributed to conception and design, data collection, data analysis, and manuscript writing/editing. Jörg Hennenlotter was involved in conception and design, collection of samples, data analysis. Daniel Schollenberger, Johanna Beermann, and Marcus Scharpf collected and analyzed the data. Arnulf Stenzl and Falko Fend supervised the study.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Steffen Rausch, Johanna Beermann, Marcus Scharpf, Jörg Hennenlotter, Falko Fend, Arnulf Stenzl, Daniel Schollenberger, Jens Bedke, and Stephan Kruck declare that no competing financial interests exist.

References

1. Bouillez A, Gnemmi V, Gaudelot K, Hemon B, Ringot B, Pottier N, Glowacki F, Butruille C, Cauffiez C, Hamdane M, Sergeant N, Van Seuningem I, Leroy X, Aubert S, Perrais M (2014) MUC1-C nuclear localization drives invasiveness of renal cancer cells through a sheddase/gamma secretase dependent pathway. *Oncotarget* 5(3):754–763
2. Kufe DW (2013) MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene* 32(9):1073–1081. doi:10.1038/ncr.2012.158

3. Horn TM, Schroeder JA (2013) MUC1 and metastatic cancer: expression, function and therapeutic targeting. *Cell Adhes Migr* 7(2):187–198. doi:10.4161/eam.23131
4. Cowey CL, Rathmell WK (2009) VHL gene mutations in renal cell carcinoma: role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy. *Current Oncol Rep* 11(2):94–101
5. Aubert S, Fauquette V, Hemon B, Lepoivre R, Briez N, Bernard D, Van Seuningen I, Leroy X, Perrais M (2009) MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer Res* 69(14):5707–5715. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4905
6. Deguchi T, Tanemura M, Miyoshi E, Nagano H, Machida T, Ohmura Y, Kobayashi S, Marubashi S, Figuchi H, Takoda Y, Ito T, Mori M, Doki Y, Sawa Y (2010) Increased immunogenicity of tumor-associated antigen, mucin 1, engineered to express alpha-gal epitopes: a novel approach to immunotherapy in pancreatic cancer. *Cancer Res* 70(13):5259–5269. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4313
7. Deng J, Wang L, Chen H, Li L, Ma Y, Ni J, Li Y (2013) The role of tumour-associated MUC1 in epithelial ovarian cancer metastasis and progression. *Cancer Metastasis Rev* 32(3–4):535–551. doi:10.1007/s10555-013-9423-y
8. Lakshmanan I, Ponnusamy MP, Macha MA, Haridas D, Majhi PD, Kaur S, Jain M, Batra SK, Ganti AK (2015) Mucins in lung cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *J Thorac Oncol* 10(1):19–27. doi:10.1097/JTO.0000000000000404
9. Liu S, Ruan M, Li S, Wang L, Yang W (2014) Increased expression of MUC1 predicts poor survival in salivary gland mucoepithelial carcinoma. *J Cranio-Maxillo-Fac Surg* 42(8):1891–1896. doi:10.1016/j.jcms.2014.07.008
10. Shibahara H, Higashi M, Koriyama C, Yokoyama S, Kitazono I, Kurumiya Y, Narita M, Kuze S, Kyokane T, Mita S, Arai T, Kato T, Yuasa N, Yamaguchi R, Kubota H, Suzuki H, Baba S, Rousseau K, Batra SK, Yonezawa S (2014) Pathobiological implications of mucin (MUC) expression in the outcome of small bowel cancer. *Plos One* 9(4):e86111. doi:10.1371/journal.pone.0086111
11. Fujita K, Denda K, Yamamoto M, Matsumoto T, Fujime M, Irimura T (1999) Expression of MUC1 mucins inversely correlated with post-surgical survival of renal cell carcinoma patients. *Br J Cancer* 80(1–2):301–308. doi:10.1038/sj.bjc.6690355
12. Kraus S, Abel PD, Nachtmann C, Linsenmann HJ, Weidner W, Stamp GW, Chaudhary KS, Mitchell SE, Franke FF, el Lalani N (2002) MUC1 mucin and trefoil factor 1 protein expression in renal cell carcinoma: correlation with prognosis. *Hum Pathol* 33(1):60–67
13. Langner C, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Zigeuner R (2004) Expression of MUC1 (EMA) and E-cadherin in renal cell carcinoma: a systematic immunohistochemical analysis of 188 cases. *Mod Pathol* 17(2):180–188. doi:10.1038/modpathol.3800032
14. Leroy X, Zerimech F, Zini L, Copin MC, Buisine MP, Gosselin B, Aubert JP, Porchet N (2002) MUC1 expression is correlated with nuclear grade and tumor progression in pT1 renal clear cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 118(1):47–51. doi:10.1309/1F99-BPDY-7DHH-9G97
15. Rausch S, Kruck S, Stenzl A, Bedke J (2014) IMA901 for metastatic renal cell carcinoma in the context of new approaches to immunotherapy. *Futur Oncol* 10(6):937–948. doi:10.2217/fo.14.61
16. Hisatsune A, Nakayama H, Kawasaki M, Horie I, Miyata T, Isohama Y, Kim KC, Katsuki H (2011) Anti-MUC1 antibody inhibits EGF receptor signaling in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 405(3):377–381. doi:10.1016/j.bbrc.2011.01.029
17. Oei AL, Moreno M, Verheijen RH, Sweep FC, Thomas CM, Massuger LF, von Mensdorff-Pouilly S (2008) Induction of IgG antibodies to MUC1 and survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer J Int Du Cancer* 123(8):1848–1853. doi:10.1002/ijc.23725
18. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4(7):844–847
19. Gnemmi V, Bouillez A, Gaudelot K, Hemon B, Ringot B, Pottier N, Glowacki F, Villers A, Vindricux D, Cauffiez C, Van Seuningen I, Bernard D, Leroy X, Aubert S, Perrais M (2014) MUC1 drives epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/beta-catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Lett* 346(2):225–236. doi:10.1016/j.canlet.2013.12.029
20. Mohr AM, Bailey JM, Lewallen ME, Liu X, Radhakrishnan P, Yu F, Tappich W, Hollingsworth MA (2013) MUC1 regulates expression of multiple microRNAs involved in pancreatic tumor progression, including the miR-200c/141 cluster. *Plos One* 8(10):e73306. doi:10.1371/journal.pone.0073306
21. Leroy X, Zini L, Leteurtre E, Zerimech F, Porchet N, Aubert JP, Gosselin B, Copin MC (2002) Morphologic subtyping of papillary renal cell carcinoma: correlation with prognosis and differential expression of MUC1 between the two subtypes. *Modern Pathology* 15(11):1126–1130. doi:10.1097/01.MP.0000036346.88874.25
22. Leroy X, Aubert S, Ballereau C, Birembaut P, Porchet N, Gosselin B, Copin MC (2005) Diffuse expression of MUC 1 in metastases of renal clear cell carcinoma as a possible therapeutic target for renal cancer. *Histopathology* 47(4):435–436. doi:10.1111/j.1365-2559.2005.02144.x
23. Perret AG, Clemenccon A, Li G, Tostain J, Peoc'h M (2008) Differential expression of prognostic markers in histological subtypes of papillary renal cell carcinoma. *BJU Int* 102(2):183–187. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.07605.x
24. Eichelberg C, Junker K, Ljungberg B, Moch H (2009) Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. *Eur Urol* 55(4):851–863. doi:10.1016/j.euro.2009.01.003
25. Loveland BE, Zhao A, White S, Gan H, Hamilton K, Xing PX, Pietersz GA, Apostolopoulos V, Vaughan H, Karanikas V, Kyriakou P, McKenzie IF, Mitchell PL (2006) Mannan-MUC1-pulsed dendritic cell immunotherapy: a phase I trial in patients with adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 12(3 Pt 1):869–877. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1574
26. Wierocky J, Mueller M, Brossart P (2006) Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1. *Cancer Immunol Immunother* 55(1):63–67. doi:10.1007/s00262-005-0673-6
27. Akaza H, Tsukamoto T, Fujioka T, Tomita Y, Kitamura T, Ozono S, Miki T, Naito S, Zembutsu H, Nakamura Y (2011) Combined immunotherapy with low-dose IL-2 plus IFN-alpha for metastatic renal cell carcinoma: survival benefit for selected patients with lung metastasis and serum sodium level. *Jpn J Clin Oncol* 41(8):1023–1030. doi:10.1093/jco/hyr067
28. Stuchler M (2011) The role of metastasectomy in metastatic renal cell carcinoma. *Nature Rev Urol* 8(4):180–181. doi:10.1038/nrurol.2011.30
29. Davis SD, Koizumi JH, Pitts WR (1989) Spontaneous regression of pulmonary metastases from renal cell carcinoma. *Urology* 33(2):141–144

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich verschiedenen Personen danken, ohne die das Erstellen dieser Dissertationsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank an Professor Dr. Arnulf Stenzl, den ärztlichen Direktor der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Tübingen für die gute Betreuung und die Überlassung verschiedenster Ressourcen.

Zudem danke ich meinem Doktorvater Herr Professor Dr. Jens Bedke für die Überlassung des Themas sowie die fachliche Unterstützung während der gesamten Dauer des Erstellens dieser Dissertationsarbeit und seine Geduld bei meinen zahlreichen Fragen.

Außerdem danke ich Herr PD Dr. Stephan. Kruck für die Unterstützung bei der Auswahl des Kollektivs und die zahlreichen fachlichen Ratschläge und Tipps.

Mein außerordentlicher Dank gilt auch Herr Dr. Steffen Rausch für die Hilfe und das Feedback bei der Erstellung der Arbeit sowie die statistische Auswertung und Aufarbeitung meiner Daten und der Publikation dieser.

Ich danke Herr Dr. Marcus Scharpf für seine tatkräftige Unterstützung im Rahmen der Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie und Neuropathologie am Universitätsklinikum Tübingen. Dabei bedanke ich mich insbesondere für die Einweisung und Hilfe beim Mikroskopieren und Einzeichnen der zu stanzenden Areale und die Betreuung der Immunhistochemie.

Desweiteren danke ich Herr Dr. Jörg Hennenlotter und seinen Mitarbeitern des urologischen Labors an der Universitätsklinik Tübingen für die Einweisung und Bereitstellung des Geräts zur Erstellung der Tissue Micro Arrays.

Zudem geht mein Dank an die Abteilung für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Herr Professor Dr. F. Fend für den Zugang zum Archiv, die Bereitstellung der Paraffinblöcke und dazugehörigen Schnitte zum Mikroskopieren, die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen sowie die Bereitstellung hochwertiger Mikroskope für die Auswertung der Färbungen.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und Großeltern danken, die mir ein unbeschwertes Aufwachsen ermöglicht haben und mich nicht nur während des Studiums und dem Verfassen dieser Arbeit bestmöglich unterstützt haben.

