

Aus der Laser-Immunologie-Forschungs-Einrichtung  
(LIFE Zentrum)

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Geschäftsführung: Prof. Dr. Christian Stief

Bereichsleitung: Prof. Dr. Ronald Sroka

**Beeinflussung von Tumor-initiierenden Zellen  
beim Nierenzellkarzinom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-  
Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Tedina Çela**

aus

Tirana, Albanien

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Sabine Brookman-May  
Prof. Dr. Michael Siebels

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der  
mündlichen Prüfung: 03.02.2022



4.1	Vorgehensweise bei der Suche nach speziesspezifischen Primern für die RT-PCR zur Quantifizierung von humanen mRNAs am Beispiel von Vimentin-mRNA und Überprüfung der Reproduzierbarkeit .....	27
4.2	Qualitätsprüfung der bei der RT-PCR entstandenen DNA-Fragmente .....	29
4.3	Funktionalitäts- und Spezifitätskontrolle der verwendeten humanspezifischen Primer.	31
4.4	Anreicherung von Tumorstammzellen und Beeinflussung der EMT-Genexpression nach Behandlung mit Sunitinib bei RCC-Xenotransplantaten .....	32
4.5	Ist die Expression von Tumorstammzell- und EMT-Genen in RCC-53- und SK-RC-17-Zellen verknüpft? .....	34
4.6	CXCR4-positive Zellen befinden sich in Sunitinib- und kontrollbehandelten RCC-Xenotransplantaten in Tumoren meist randständig .....	35
4.7	Eine hohe CXCR4-Proteinexpression im Primärtumor korreliert mit einem besseren Überleben neoadjuvant Sunitinib-behandelter mRCC-Patienten .....	38
5	<b>DISKUSSION</b> .....	42
5.1	Zusammenfassung .....	48
6	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	49
7	<b>ANHANG</b> .....	51
7.1	Einschluss- und Ausschlusskriterien der N06SUN-Studie .....	51
7.2	Einschluss- und Ausschlusskriterien der SURTIME Studie .....	52
8	<b>DANKSAGUNG</b> .....	54
9	<b>LEBENS LAUF</b> .....	55
10	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	56

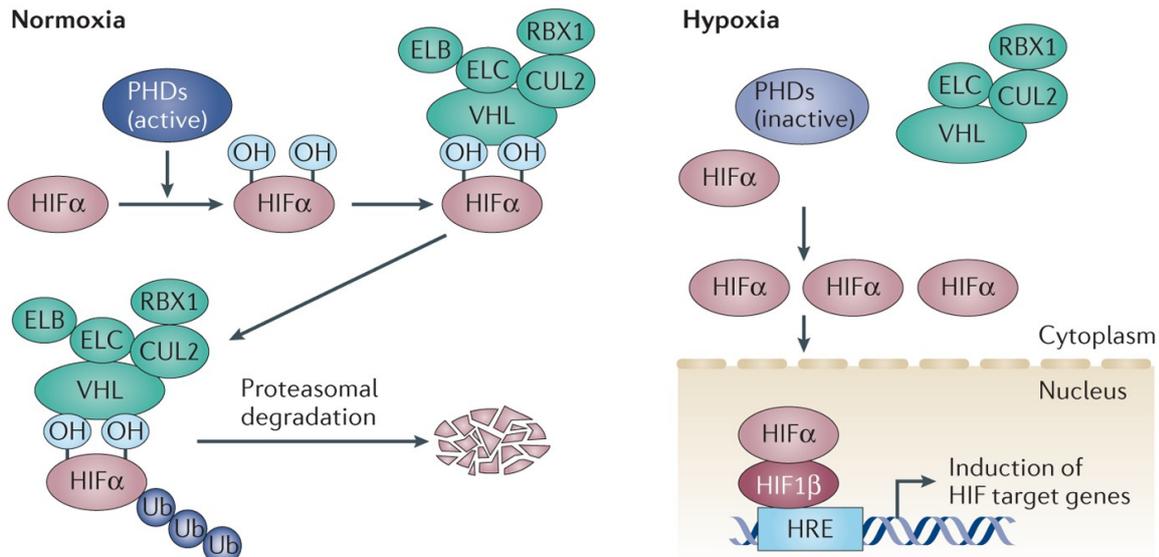
# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Nierenzellkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Klassifikation

Nierenzellkarzinome stellen mit einem Anteil von knapp 96 % aller Nierentumore im Erwachsenenalter die häufigsten bösartigen Tumore der Niere dar und verursachen 2,2 % aller malignen Erkrankungen weltweit (1, 2016) (Padala, Barsouk et al. 2020). Jährlich werden in Deutschland ungefähr 15.000 Menschen mit einem Nierenzellkarzinom neu diagnostiziert, wobei Männer fast doppelt so häufig wie Frauen betroffen sind. Für das Nierenzellkarzinom beträgt das mittlere Erkrankungsalter bei Männern 68 Jahre, bei Frauen tritt die Erkrankung später bei einem mittleren Alter von 72 Jahren auf. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 76 % für Männer und 77 % für Frauen hat das Nierenzellkarzinom eine relativ günstige Prognose (1, 2016). Die Prognose verschlechtert sich jedoch drastisch, je höher das Tumorstadium ist. Zum Beispiel nimmt die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Männern in Deutschland von 95 % im Stadium I über 85 % im Stadium II und 72 % im Stadium III auf nur 14 % im Stadium IV ab (1, 2016). Bei Erstdiagnose hat fast jeder dritte Patient bereits Metastasen und bei 25-50 % bilden sich diese im weiteren Krankheitsverlauf aus (Janzen, Kim et al. 2003). Nierenzellkarzinome setzen hämatogen und lymphogen Metastasen. Sie metastasieren bevorzugt in die Lunge, Knochen, Lymphknoten und Leber, aber auch in die kontralaterale Niere und ins Zentralnervensystem (ZNS) (Bianchi, Sun et al. 2012).

Ätiologisch werden mehrere Risikofaktoren diskutiert, wobei die Umwelt- und modifizierbare Risikofaktoren wie Rauchen, Hypertonie und Adipositas eine starke Assoziation zeigen (Navai und Wood 2012). Als größter modifizierbarer Risikofaktor für das Nierenzellkarzinom erhöht das Rauchen das Risiko für klarzellige und papilläre Nierenzellkarzinome, nicht aber für den chromophoben Subtyp. Dazu kommt es vermutlich durch eine von Tabakkarzinogenen hervorgerufene Verletzung durch oxidativen Stress von proximalen Tubuli, der vermutete Ursprung vom klarzelligen und papillären Nierenzellkarzinom, aber nicht vom chromophoben Nierenzellkarzinom (Patel, Attwood et al. 2015). Selten treten Nierenzellkarzinome im Rahmen von erblichen Tumorerkrankungen wie dem Von-Hippel-Lindau-Syndrom auf. Diesem liegt eine Genmutation im Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Gen zugrunde (Moore, Nickerson et al. 2011). Andererseits werden bei mehr als 80 % der klarzelligen Nierenzellkarzinome somatische und epigenetische Veränderungen in dem Von-Hippel-Lindau-Gen beobachtet (Motzer, Hutson et al. 2007). Dieses Gen reguliert den Hypoxie-induzierten Faktor alpha (HIF- $\alpha$ ), der unter normalen Sauerstoffkonzentrationen vom Von-Hippel-Lindau-Protein gebunden wird, um letztendlich abgebaut zu werden. Unter Hypoxie kann das Von-Hippel-Lindau-Protein HIF- $\alpha$  nicht binden, was zu dessen Anhäufung führt. So kann der Transkriptionsfaktor HIF- $\alpha$  seiner Aufgaben nachgehen, und die Transkription von Genen, die den Sauerstofftransport induzieren, die zelluläre Anpassung an Sauerstoffmangel und die Angiogenese erleichtern. Dementsprechend führen Mutationen, die die Von-Hippel-Lindau-Protein-Funktion ausschalten, zu einem Überschuss von HIF- $\alpha$  und somit zu einer ähnlichen Genexpression wie unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 1) (Gossage, Eisen et al. 2015; Schodel, Gramp et al. 2016).



Nature Reviews | **Cancer**

Abbildung 1. **Die Sauerstoff-abhängige Regulation vom Hypoxie-induzierenden Faktor alpha (HIF-α).** Unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie) wird HIF-α durch die Prolylhydroxylase 1 (PHD1), PHD2 und PHD3 hydroxyliert. Prolyl-hydroxyliertes HIF-α wird vom Ubiquitin-Ligase-Komplex pVHL/Elongin-C (ELC)/Elongin-B (ELB)/Cullin-2 (CUL2)/RBX1 (VCB-CR)/E3 erkannt und nach Ubiquitinylierung (Ub) im Proteasom abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen sind PHD1, PHD2 und PHD3 inaktiv (Sauerstoff ist ein wesentlicher Cofaktor). Daher akkumuliert HIF-α und bildet mit HIF1β Heterodimere. Letztendlich translozieren diese Heterodimere in den Kern, binden an *hypoxia response elements* (HREs) und induzieren die Transkription von Genen, die an der Anpassung an Hypoxie beteiligt sind (Gossage, Eisen et al. 2015).

Histologisch werden mehrere Nierenzellkarzinom-Typen differenziert. Die drei häufigsten sind das klarzellige (circa 70-80 %), das papilläre (circa 10-15 %) und das chromophobe Nierenzellkarzinom (circa 3-5 %) (Rini, Campbell et al. 2009). Seinen Namen hat das klarzellige Nierenzellkarzinom durch das typische klare Aussehen des Zytoplasmas unter dem Mikroskop bekommen, was eigentlich ein Artefakt der routinemäßigen Gewebeerarbeitung ist, da das zahlreich im Zytoplasma vorhandene Glykogen und Lipid verloren gehen (Goyal, Gersbach et al. 2013).

### 1.1.2 Symptome und Diagnostik

Die Mehrzahl der Nierenzellkarzinome fallen heutzutage als Zufallsbefunde im Rahmen von Ultraschalluntersuchungen auf. Das Auftreten von Symptomen ist mit einer Progression der Erkrankung assoziiert (Patard, Leray et al. 2003). Diese können in lokale und systemische Symptome unterteilt werden. Das häufigste lokale Symptom ist der akute oder chronische Flankenschmerz, sowie weniger häufig die Makrohämaturie und eine tastbare abdominelle Raumforderung. Selten tritt durch den erhöhten abdominellen Druck eine Varikozele auf. Systemische Symptome können bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom (mRCC), sowie bei allen Stadien im Rahmen von paraneoplastischen Syndromen auftreten. Dabei sind Bluthochdruck, Anämie und Tumorkachexie am häufigsten zu beobachten (Rini, Campbell et al. 2009; Capitanio und Montorsi 2016).

Die verdächtige renale Raumforderung fällt meistens bei einer abdominellen Sonographie auf, was aber eine geringe Spezifität aufweist. Daher werden zur genauen Beurteilung weitere bildgebende Verfahren wie die abdominelle Kontrastmittel-Computertomografie

(CT) oder Kontrastmittel-Magnetresonanztomografie (MRT) eingesetzt, wobei eine Anreicherung mit Kontrastmittel bei soliden Raumforderungen in 80 % der Fällen mit einer malignen Erkrankung korreliert (Rini, Campbell et al. 2009). Mit Hilfe dieser Schnittbildgebung kann die Raumforderung besser beschrieben, die Diagnose bestätigt und die Tumorausdehnung festgestellt werden (Capitanio und Montorsi 2016). Bestätigt sich die Verdachtsdiagnose eines Nierenzellkarzinoms in der bildgebenden Diagnostik, ist eine Ausbreitungsdiagnostik (zum Beispiel Thorax- und Schädel-CT) indiziert (Ljungberg, Bensalah et al. 2015).

Manche benigne Nierentumoren, vor allem Angiomyolipome, kann man mittels bildgebender Verfahren anhand ihres typischen Aussehens von einer malignen Raumforderung unterscheiden. Andererseits ist es bei anderen benignen Nierentumoren diese Unterscheidung radiologisch schwieriger. Aus diesem Grund kann eine histologische Untersuchung erforderlich sein, um eine endgültige Diagnose stellen zu können (Prasad, Surabhi et al. 2008). Außerdem kann bei potentiellen Kandidaten für eine aktive Überwachungsstrategie, sowie um die geeignetste zielgerichtete Therapie beim metastasierten Nierenzellkarzinom auswählen zu können, ebenfalls eine Nierenbiopsie indiziert sein (Ljungberg, Bensalah et al. 2015; Marconi, Dabestani et al. 2016; Cheung und Finelli 2017). Sie ist ein komplikationsarmer Eingriff und das Risiko einer Verschleppung von Tumorzellen entlang des Stichkanals ist durch die modernen Biopsie-Techniken extrem gering (Marconi, Dabestani et al. 2016; Ljungberg, Bensalah et al. 2015).

### **1.1.3 Therapeutische Ansätze**

Bei der Behandlung des Nierenzellkarzinoms gibt es je nach Tumorausdehnung die Möglichkeit des kurativen oder palliativen Therapieansatzes. Eine kurative Therapie setzt stets eine chirurgische Entfernung des Tumors voraus, die als eine Nierenteil- oder komplette Resektion der betroffenen Niere erfolgen kann. Beide können offen oder endoskopisch (laparoskopisch, retroperitoneoskopisch, Roboter-assistiert) verlaufen (Ljungberg, Bensalah et al. 2015).

Die Nierenteilresektion sollte wenn immer onkologisch sinnvoll gegenüber der früher in der Therapie des Nierenzellkarzinoms als Standard geltenden kompletten Nierenresektion bevorzugt werden (Capitanio und Montorsi 2016). Sie hat den Vorteil der Erhaltung von funktionsfähigem Nierengewebe und damit der Erhaltung der Nierenfunktion bei ähnlicher onkologischer Kontrolle (Van Poppel, Da Pozzo et al. 2011; Scosyrev, Messing et al. 2014). Die herkömmliche 'offene' Nierenteilresektion wird von den minimalinvasiven (laparoskopisch oder robotergestützt) Verfahren verdrängt. Die laparoskopische Operation bietet viele Vorteile, sie ist weniger invasiv, dauert weniger lang, der intraoperative Blutverlust ist geringer, das Risiko perioperativer Morbidität ist niedriger, sowie der stationäre Aufenthalt ist kürzer als bei offener Operation (Gill, Kavoussi et al. 2007). Dazu wurde kein Unterschied zwischen der offenen und der laparoskopischen Nierenteilresektion im Gesamt- und tumorspezifischen Überleben in Zentren mit Erfahrung in der Laparoskopie festgestellt (Lane und Gill 2010). Bei Patienten, bei denen eine Nierenteilresektion technisch nicht möglich ist, sollte die radikale Nephrektomie der betroffenen Niere laparoskopisch erfolgen, da sie bessere perioperative Ergebnisse als der offene Ansatz zeigt (MacLennan, Imamura et al. 2012). Ergänzend zur radikalen Nephrektomie wird eine systematische oder extendierte Lymphadenektomie und eine ipsilaterale Adrenalektomie bei unauffälliger

Bildgebung und unauffälligem intraoperativen Befund bei mangelnder Beweislage von einem Überlebensvorteil nicht mehr empfohlen (Blom, van Poppel et al. 2009; Bekema, MacLennan et al. 2013).

Durch die weit verbreitete Schnittbildgebung werden heutzutage vermehrt kleine asymptomatische Nierentumoren entdeckt. Per Definition wird ein Tumor mit einem Größendurchmesser von bis zu 4 cm als kleiner Nierentumor bezeichnet, was meistens einem Stadium pT1a entspricht und mittlerweile das am häufigsten vorgefundene Tumorstadium ist (Haferkamp 2018). Die sogenannte aktive Überwachungsstrategie bietet einen alternativen nierensparenden Ansatz bei Patienten mit kleinen, auf die Niere begrenzten Tumoren und Multimorbidität und/oder begrenzter Lebenserwartung und/oder erheblichem Potenzial für die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie, da sie eine extrem kleine Rate an Krankheitsprogression und ein niedriges metastatisches Potential zeigen (Smaldone, Kutikov et al. 2012). Nach Gewebeentnahme mittels Nierenbiopsie erfolgt ein anfängliches Monitoring der Tumorgröße durch Bildgebung des Abdomens (Ultraschall, CT oder MRT) und anschließende therapeutische Intervention bei Patienten mit klinischer Tumorprogression während der Nachsorge (Ljungberg, Bensalah et al. 2015). Weiterhin kommen die ablativen Techniken der perkutanen Radiofrequenzablation oder der laparoskopisch assistierten oder perkutanen Kryoablation als Therapieoptionen bei kleinen Nierentumoren in Frage (Ljungberg, Bensalah et al. 2015).

Bei mRCC ist vorwiegend ein palliatives Therapiekonzept erforderlich. Das Nierenzellkarzinom ist gegenüber einer systemischen Chemotherapie hoch resistent (Amato 2000). Aufgrund von Einzelfällen an Spontanremissionen galt die unspezifische Immuntherapie mit Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) und Interleukin-2 (IL-2) lange Zeit als Standardtherapie für das mRCC. Angesichts der unbefriedigenden Ansprechraten von lediglich 10-15 % und behandlungsbedingten schweren toxischen Effekten war die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien erforderlich (Motzer, Bacik et al. 2002; Capitanio und Montorsi 2016).

Die wissenschaftliche Erkenntnisse im Verständnis der RCC-Molekularbiologie führten zu der Entwicklung von zielgerichteten Therapeutika und einer damit verbundenen Verbesserung der Therapieergebnisse (Greef und Eisen 2016). Sie umfassen Axitinib, Bevacizumab, Pazopanib, Sorafenib und Sunitinib aus der Substanzgruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren, sowie Everolimus und Temozolomid aus der *mammalian target of rapamycin* (mTOR) Inhibitoren (Capitanio und Montorsi 2016). Die Angriffspunkte dieser innovativen Therapien sind im Wesentlichen die für Angiogenese und Tumorwachstum wichtige Wachstumsfaktorrezeptoren *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR), *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR), sowie der *mammalian target of rapamycin* (mTOR) Signalweg (Sanchez-Gastaldo, Kempf et al. 2017). Außerdem wurde 2015 der Antikörper Nivolumab aus der Substanzklasse der Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren für die Zweitlinientherapie des mRCCs zugelassen. *Checkpoint*-Inhibitoren binden an bestimmte inhibitorische Rezeptoren auf T-Zellen wie PD-1 oder dessen Liganden PD-L1 und CTLA4, verhindern so die Liganden/Rezeptorinteraktion und schalten damit immunsupprimierende Signale ab. Dies resultiert dann durch T-Zell-Aktivierung und -Proliferation zur Eliminierung von Tumorzellen (Abb. 2) (Carlo, Voss et al. 2016).

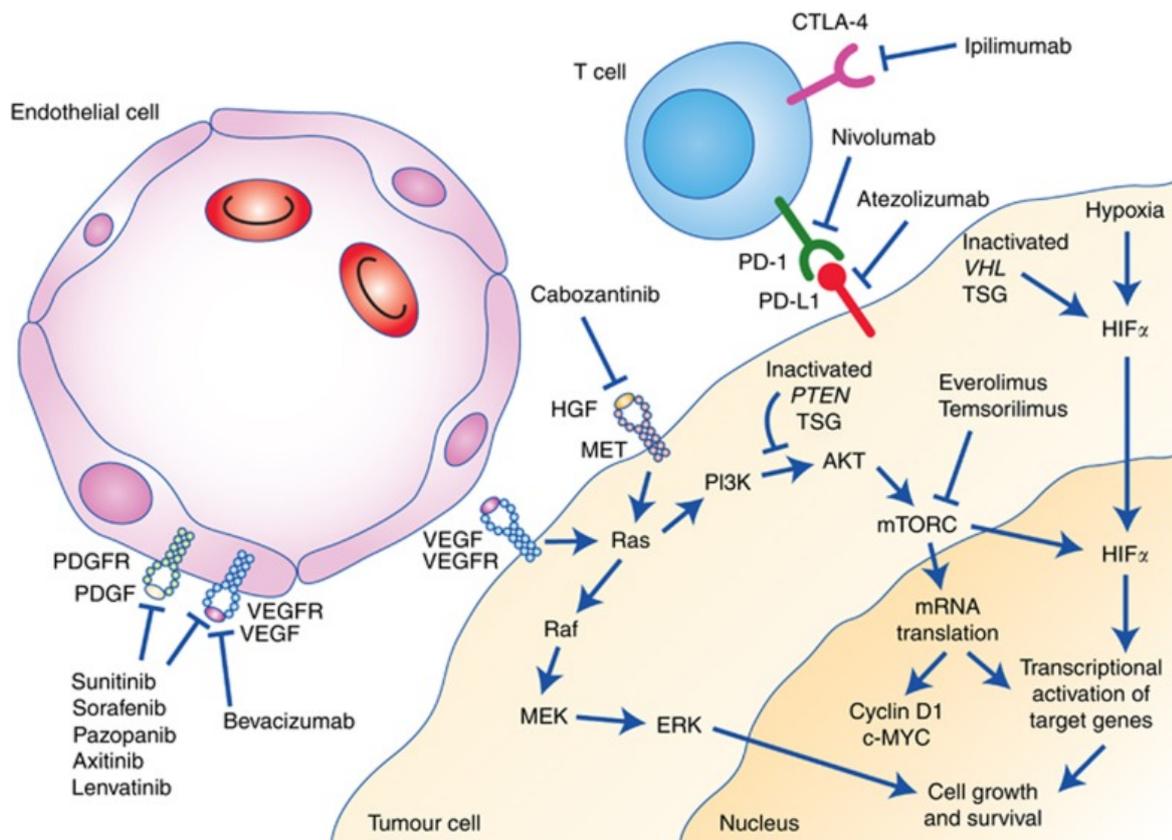


Abbildung 2. **Wirkweise von in der Therapie von mRCC-Patienten eingesetzten Medikamenten.** Sunitinib, Sorafenib, Pazopanib, Axitinib und Lenvatinib inhibieren den VEGF- und den PDGF-Rezeptor. Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen VEGF. Cabozantinib ist ein Multikinaseinhibitor gegen VEGF, AXL und MET. Everolimus und Temsirolimus hemmen den mTOR-Signalweg. Nivolumab richtet sich gegen den PD1-Rezeptor auf T-Zellen. Ipilimumab bindet an den CTLA-4-Rezeptor auf T-Zellen (Greef und Eisen 2016).

Sunitinib ist ein oraler Tyrosinkinaseinhibitor gegen VEGFR, PDGFR, dem Stammzellfaktor-Rezeptor c-Kit, sowie *FMS-like tyrosine kinase* (FLT-3), *colony-stimulating factor* (CSF-1R) und *neurotrophic factor receptor* (RET) (Motzer, Jonasch et al. 2017). In der Zulassungsstudie zeigte Sunitinib (11 Monate) im Vergleich zu IFN- $\alpha$  (6 Monate) eine signifikant längere progressionsfreie Überlebenszeit und bessere Lebensqualität (Motzer, Hutson et al. 2007). Pazopanib ist ein weiterer oraler Tyrosinkinaseinhibitor gegen VEGFR, PDGFR und c-Kit (Motzer, Jonasch et al. 2017). In der randomisierten Phase-III-Studie COMPARZ zeigten Sunitinib und Pazopanib ein vergleichbares Wirksamkeitsprofil bei unterschiedlichem Nebenwirkungsprofil (Motzer, Hutson et al. 2013). In der aktuellen Leitlinie der Europäischen Gesellschaft für Urologie (European Association for Urology [EAU]) wird in der Erstlinientherapie bei Patienten mit mRCC und günstigem Risikoprofil die Gabe von Sunitinib oder Pazopanib empfohlen. Der VEGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Tivozanib, Temsirolimus sowie die Kombination Bevacizumab/Interferon werden trotz Zulassung in der Erstlinientherapie nicht häufig verwendet. Andererseits wurde neuerdings aufgrund der Ergebnisse in der CheckMate214-Studie bei Patienten mit intermediären oder ungünstigem Risikoprofil die Kombination aus dem CTLA-4-Antikörper Ipilimumab und dem *Checkpoint*-Inhibitor Nivolumab in der Erstlinientherapie zugelassen (Powles, Albiges et al. 2017; Atkins und Tannir 2018; Motzer, Tannir et al. 2018).

Trotz Einführung dieser eindrucksvollen innovativen Therapien weist das Nierenzellkarzinom ein schlechtes *Outcome* auf (Powles, Staehler et al. 2016). Das mediane Überleben der Patienten mit mRCC beträgt weniger als 3 Jahre und langfristige komplette Remissionen sind die Ausnahme (Greef und Eisen 2016). Der wichtigste Grund dafür ist die nach anfänglichem Ansprechen auf die antiangiogene Therapie sich entwickelte Resistenz. Man weiß, dass antiangiogene Medikamente zu einer Hypoxie-induzierten Tumornekrose führen; aber der Mechanismus, wie die Hypoxie die Therapieresistenz induziert, bleibt rätselhaft (Varna, Gapihan et al. 2015). Vermutlich spielen Tumorstammzellen wegen ihrer Unempfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika und Hypoxie sowie ihrer tumorinitiierenden Fähigkeit eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese und Prognose des Nierenzellkarzinoms (Bussolati, Dekel et al. 2013). Zu diesem Zweck ist ein besseres Verständnis der molekularen Resistenzmechanismen von Tumorstammzellen erforderlich, um die derzeitigen Behandlungsbeschränkungen zu bewältigen und neue Strategien zu entwickeln (Varna, Gapihan et al. 2015). Im Folgenden wird auf die Tumorstammzellen und dessen Rolle beim Nierenzellkarzinom näher eingegangen.

## **1.2 Tumorstammzellen**

Stammzellen sind durch ihre Eigenschaft gekennzeichnet, sich selbst zu erneuern, sowie in mehreren Zelltypen ausdifferenzieren zu können. Es sind drei Typen von Stammzellen, nämlich die embryonalen, die adulten, sowie die Tumorstammzellen bekannt (Oren und Smith 2017). Die embryonalen Stammzellen sind nur im frühen Embryo vorhanden und sind pluripotent, das heißt sie haben das Potential, sich in alle Zelltypen des Organismus ausdifferenzieren zu können (Herrerros-Villanueva, Bujanda et al. 2014). Ihre Fähigkeit, sich unerschöpflich zu vermehren, haben sie unter anderem dem Enzym Telomerase zu verdanken, das die nach jeder Zellteilung erfolgte Verkürzung ihrer Telomere korrigiert. Im Gegensatz dazu unterliegen normale Zellen der Hayflick-Grenze (bei der bei Abwesenheit von Telomeraseaktivität eine kritische minimale Länge von Telomeren erreicht wird). Sie führen demnach eine beschränkte Anzahl von Zellteilungen durch, bevor der programmierte Zelltod aktiviert wird (Hiyama und Hiyama 2007). Die adulten Stammzellen kommen in Geweben Erwachsener vor und verfügen, in Analogie zu den embryonalen Stammzellen, über die Fähigkeit, sich selbst erneuern zu können. Ihr Differenzierungspotential ist aber eingeschränkt. Sie können sich lediglich zu den Zellen des Gewebes, dem sie angehören, entwickeln, und so dessen Homöostase dienen (Batlle und Clevers 2017).

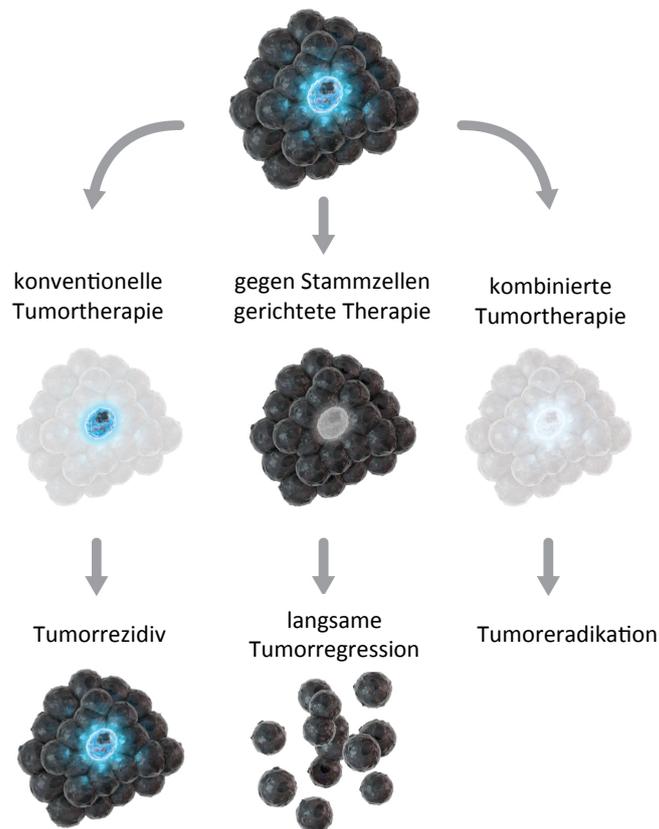


Abbildung 3. **Krebsstammzellen überstehen Chemotherapien und bilden den Tumor neu.** Laut der Tumorstammzelltheorie richten sich die derzeit verwendete Medikamente gegen sich schnell teilende Zellen innerhalb des Tumors, die die Mehrheit des Tumors ausmachen, lassen aber stammzellähnliche Tumorzellen unberührt. Diese Zellen lassen den besiegt geglaubten Tumor wieder aufflammen (links). Das alleinige Angreifen der Tumorstammzellen wäre nicht praktikabel, da es zu einer langsamen Tumorregression führen würde (Mitte). Deswegen ist eine Kombinationstherapie zur Tumoreradikation sinnvoll (rechts) (modifiziert nach (Kaiser 2015)).

Laut der Tumorstammzelltheorie enthalten Tumore ebenfalls eine kleine Zellfraktion, die Stammzellen im Normalgewebe ähnelt. Diese sogenannten Tumorstammzellen sind der Ursprung des Tumors und halten ihn durch Ihre Fähigkeit, sich selbst erneuern zu können, aufrecht (Oren und Smith 2017). Tumore bestehen aus mehreren Subpopulationen und sind hierarchisch organisiert. Diese Hierarchie spiegelt dabei oft die Hierarchie des Ursprungsorgans wider. An der Spitze dieser Hierarchie stehen die langsam und dennoch unerschöpflich proliferierenden Tumorstammzellen, gefolgt von den zahlreichen begrenzt proliferierenden, nicht tumorigenen Tumorzellen. Nur Tumorstammzellen können daher nach Transplantation einen Tumor bilden, weswegen sie auch tumor-initiiierende Zellen genannt werden (Batlle und Clevers 2017). Vermutlich sind Tumorstammzellen aufgrund ihrer Fähigkeit, einer Chemotherapie und/oder Bestrahlung besser zu widerstehen und Monate oder Jahre nach einer Therapie aus einem Ruhezustand wiederzuerwachen, für die häufig bei Tumorkranken beobachteten Rezidive verantwortlich (Oren und Smith 2017). Es besteht die Hoffnung, durch die Entwicklung von Medikamenten, die gezielt diese für das Wiederaufflammen der Tumorerkrankung verantwortlichen Tumorzellen und nicht nur die Haupttumorzellmasse angreifen, eine endgültige Heilung des Krebses zu erzielen (Abb. 3) (Clevers 2011; Kaiser 2015; Batlle und Clevers 2017).

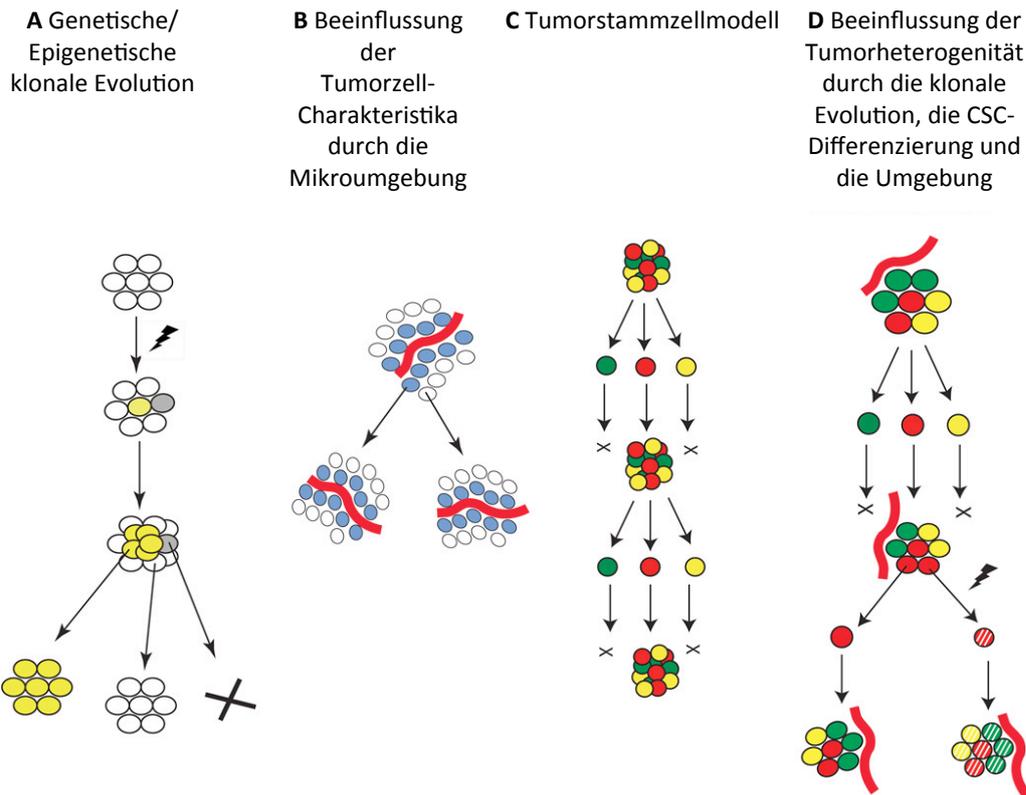


Abbildung 4. **Erklärungsansätze für die intratumorale Heterogenität.** (A) Zufällige genetische und epigenetische Änderungen in einem anfangs homogenen Tumor (weiß) führen zur Entstehung von Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Phänotypen (gelb, grau). Manche Zellen gewinnen dadurch einen Wachstumsvorteil (gelb) und expandieren zu einem Klon identischer Zellen. Die Zellen mit nachteiligen Mutationen (grau) andererseits proliferieren weniger gut und werden zurückgedrängt oder verlieren ihre tumorigene Eigenschaft und gehen zugrunde. (B) Die Mikroumgebung beeinflusst die Eigenschaften der Tumorzellen: die Zellen in der Nähe von Blutgefäßen (blau) entwickeln andere Eigenschaften als die Zellen in anderen Lokalisationen (weiß). (C) Die Tumorstammzelltheorie geht davon aus, dass Tumoren unterschiedliche Subpopulationen von stammzellähnlichen (rot) und nicht-stammzellähnlichen Zellen (gelb und grün) enthalten, die in einer Hierarchie organisiert sind. An der Spitze dieser Hierarchie sind die seltenen stammzellartigen Tumorzellen, die das Tumorstammwachstum erhalten, während die Masse der Tumorzellen diese Fähigkeit nicht besitzt. Die Tumorstammzellen können seriell transplantiert werden mit nachfolgender Rekapitulation des Originaltumors. (D) Das letzte Modell führt die drei Erklärungsansätze zusammen: sie schließen sich nicht gegenseitig aus, sondern ergänzen einander (modifiziert nach (Magee, Piskounova et al. 2012)).

Das Modell der klonalen Evolution ist ein anderes vorgeschlagene Modell zur Entstehung von Tumoren und deren Heterogenität. Dieses Modell besagt, dass durch zufällige genetische Mutationen und epigenetische Änderungen die Ursprungszelle des Tumors einen Wachstumsvorteil erhält, die sie dazu befähigt, Klone zu bilden und zu einem Tumor zu wachsen (Nowell 1976, Baylin und Jones 2011). Laut einer anderen Theorie beeinflusst die Tumormikroumgebung die Eigenschaften der Tumorzellen. So sind zum Beispiel Tumorstammzellen des Gehirns in der Nähe von Gefäßen zu finden, was die Progression der Gehirntumore direkt beeinflussen könnte (Charles, Ozawa et al. 2010). Wahrscheinlich tragen alle drei Modelle zur Tumorbildung und Tumorerheterogenität bei, da sie sich nicht gegenseitig ausschließen müssen (Abb. 4) (Magee, Piskounova et al. 2012).

Erstmals wurden Tumor-initiiierenden Zellen bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) entdeckt. Nur eine kleine Population der Tumorzellen, und zwar etwa eine in einer Million, in immundefiziente *severely compromised immunodeficient* (SCID)-Mäuse injiziert, konnte

eine AML auslösen. Die so entstandene AML verfügte über ein Zellverteilungsmuster und eine leukämische Zellmorphologie wie die ursprüngliche in den Patienten gefundene AML. Die AML-Zellen wurden auf der Grundlage der Zelloberflächenmarker-Expression mittels Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (*fluorescence-activated cell sorting* [FACS]) sortiert und die tumorerzeugende Zellpopulation als Oberflächenmarker CD34-positiv und CD38-negativ (CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>) charakterisiert, was auch für die normalen hämatopoetische Stammzellen kennzeichnend ist (Lapidot, Sirard et al. 1994; Bonnet und Dick 1997). Diese Beobachtung war ein Hinweis, dass Leukämiezellen eine heterogene Gruppe darstellen, die sich in ihrem Erneuerungspotenzial wesentlich unterscheiden, so wie normale blutbildende Stammzellen. Mittlerweile wurden Tumorstammzellen bei vielen soliden Tumoren wie beispielsweise bei Mammakarzinomen (Al-Hajj, Wicha et al. 2003), Gehirntumoren (Singh, Hawkins et al. 2004), Prostatakrebs (Collins, Berry et al. 2005), Bauchspeicheldrüsenkrebs (Li, Heidt et al. 2007), Kolonkarzinomen (O'Brien, Pollett et al. 2007), Ovarialkarzinomen (Zhang, Balch et al. 2008), Lungenkrebs (Eramo, Lotti et al. 2008) und Nierenzellkarzinomen (Bussolati, Bruno et al. 2008) nachgewiesen. Bei diesen Tumoren konnte analog zu AML eine Heterogenität der Tumorzellen innerhalb des Tumors beobachtet werden. Dazu war nur eine kleine Subpopulation an Zellen im Primärtumor, die mittels Oberflächenmarker identifiziert werden konnte, in der Lage, in immundefizienten Mäusen Tumoren zu generieren. Die Variabilität der Kapazität zur Tumorentstehung zwischen den verschiedenen Tumorsubpopulationen wurde als Beleg für die Existenz von Tumorstammzellen gedeutet (Kaiser 2015). So war beispielsweise im Mammakarzinom nur die CD44<sup>+</sup>-CD24<sup>-/niedrig</sup>-Subpopulation, sogar nach seriellen Tumorzelltransplantationen, fähig, in immundefizienten Mäusen einen Tumor zu erzeugen. Dafür reichten nur 100 dieser CD44<sup>+</sup>-CD24<sup>-/niedrig</sup>-Zellen aus, um das Tumorstadium auszulösen, während 10.000 Zellen mit anderem Marker-Phänotyp dazu nicht in der Lage waren (Al-Hajj, Wicha et al. 2003).

### 1.2.1 Tumorstammzellen beim Nierenzellkarzinom

Auch im Nierenzellkarzinom ist eine hohe intra- bzw. intertumorale Heterogenität zu beobachten (Gerlinger, Rowan et al. 2012). Bisher gab es viele Versuche, spezifische Biomarker zu etablieren, um Tumorstammzell-Populationen bei diesem Tumor zu identifizieren (Corro und Moch 2018). Mehrere Tumorstammzellmarker wurden entdeckt wie zum Beispiel CXCR4, CD133, CD105 und CD44 (Corro und Moch 2018; Gassenmaier, Chen et al. 2013). Zunehmend wird die Kombination mehrerer Marker vorgeschlagen (Khan, Czarnecka et al. 2015). In dieser Dissertation wurde zur Identifizierung von Tumorstammzellen auf mRNA-Ebene die Genexpression von mehreren *stemness* Genen untersucht. Dabei konzentrierten wir uns auf *CXCR4*, *POU5F1* (*OCT4*), *NANOG* und *SOX2*. Des Weiteren wurde die Expression vom Onkogen *MYC*, das durch Förderung einer unkontrollierten Proliferation eine wichtige Rolle beim klarzelligen Nierenzellkarzinom spielt, analysiert (Tang, Chang et al. 2009).

Der **CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-4 (CXCR4)** ist ein Transmembranprotein aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, der nach Aktivierung durch seinen *Liganden CXC-Motiv-Chemokin-12* (CXCL12, auch als *stromal cell-derived factor 1* (SDF1) bekannt) eine Vielzahl von biologischen Prozessen wie Proliferation, Überleben, Migration, *stemness* und Angiogenese hervorruft. Mehrere Tumoren exprimieren CXCR4 wie zum Beispiel das Mammakarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Neuroblastom und Nierenzellkarzinom (Corro und Moch 2018). Auf diese Tumorzellen zeigt CXCL12 eine chemotaktische Wirkung,

sodass CXCR4<sup>+</sup>-Zellen in Gewebe metastasieren, die hohe Spiegel an CXCL12 enthalten, wie beispielsweise Lymphknoten, Lunge, Leber und Knochenmark (Muller, Homey et al. 2001). Die chemotaktische Wirkung von CXCL12 auf die Tumorstammzellen im Nierenzellkarzinom wird durch NOTCH1 über die Hochregulation von CXCR4 gefördert (Xiao, Gao et al. 2017). Veränderungen im Von-Hippel-Lindau-Gen, die bei der Mehrheit der Nierenzellkarzinom-Patienten zu beobachten sind, sowie Hypoxie, erhöhen die CXCR4-Expression (Staller, Sulitkova et al. 2003). Gassenmeier et al. identifizierten im Nierenzellkarzinom eine CXCR4<sup>+</sup>-Subpopulation, die im Vergleich zu CXCR4<sup>-</sup>-Zellen eine hohe Expression der Stammzellgene *NANOG*, *POU5F1 (OCT4)* und *SOX2*, eine höhere Resistenz gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren, sowie eine höhere Fähigkeit *spheres in vitro* und Tumore *in vivo* zu bilden, aufwies (Gassenmaier, Chen et al. 2013). Beim Nierenzellkarzinom zeigen regulatorische T-Zellen, die immunsupprimierend wirken und einen schlechten Prognosefaktor darstellen, eine starke Expression von CXCR4. Eine zielgerichtete Therapie mit CXCR4-Antagonisten wäre möglicherweise eine gute Ergänzung zu der derzeit verfügbaren Therapien, da sie dadurch die Immunantwort verbessern würden (Santagata, Napolitano et al. 2017). Zudem weisen klarzellige Nierenzellkarzinome eine Assoziation zwischen einer hohen CXCR4-Expression und einem aggressiverem Tumorverhalten auf (Gassenmaier, Chen et al. 2013; Chen, Gassenmaier et al. 2014).

**CD133 (Prominin-1)** ist einer der am häufigsten untersuchten Marker für Tumorstammzellen bei soliden Tumoren, einschließlich des Nierenzellkarzinoms (Saeednejad Zanjani, Madjd et al. 2017). CD133<sup>+</sup>-Tumorzellen zeigten Stammzeleigenschaften bei mehreren Tumoren, wie dem Kolorektalkarzinom, hepatozellulärem Karzinom, Lungenkarzinom, Glioblastom, Bauchspeicheldrüsenkarzinom und Ovarialkarzinom (Corro und Moch 2018). Demgegenüber wiesen CD133<sup>+</sup>-Tumorzellen beim Nierenzellkarzinom nach subkutaner Injektion in SCID-Mäuse keine tumorigene Eigenschaft auf, sie waren erst nach Kotransplantation mit CD133<sup>+</sup>-Nierenzellkarzinomzellen in der Lage, Tumoren in SCID-Mäuse zu erzeugen, was auch mit aus dem normalen Nierengewebe stammenden CD133<sup>+</sup>-Progenitorzellen erreicht wurde (Bruno, Bussolati et al. 2006; Myszczyzyn, Czarnecka et al. 2015; Corro und Moch 2018). Aus diesem Grund repräsentieren die CD133<sup>+</sup>-Zellen beim Nierenzellkarzinom keine tumorinitiierende Zellen, sondern sie wurden als renale Progenitorzellen charakterisiert, die durch ihre Fähigkeit, in epitheliale und endotheliale Zellen zu differenzieren, zur Tumolvaskularisierung beitragen (Bruno, Bussolati et al. 2006). Interessanterweise hatte die CD133<sup>+</sup>-CD24<sup>+</sup>-Zellpopulation aus Nierenzellkarzinom-Zelllinien ACHN und Caki1 Tumorstammzeleigenschaften (Xiao, Gao et al. 2017). Varna et al. konnten in primärem Nierenzellkarzinom eine höhere Anreicherung von CD133/CXCR4-koexprimierenden Zellen in perinekrotischen Arealen im Vergleich zu den perivaskulären Arealen beobachten, dessen Anzahl sogar nach der Behandlung mit Sunitinib signifikant anstieg (Varna, Gapihan et al. 2015). Des Weiteren ist eine hohe zytoplasmatische CD133-Expression mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert, die sich als Prognosefaktor eignet (Saeednejad Zanjani, Madjd et al. 2017).

**CD105 (Endoglin)** ist ein Oberflächenmarker für mesenchymale Stammzellen und spielt hoch exprimiert auf aktivierten Endothelzellen eine entscheidende Rolle in der Angiogenese, was wichtig für das Tumorwachstum und die Metastasen-Initiierung ist. Dazu fördert CD105 als Teil eines Rezeptors für TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3 die Zellproliferation und -differenzierung (Khan, Czarnecka et al. 2014). Im klarzelligen Nierenzellkarzinom stellen CD105<sup>+</sup>-Zellen weniger als

10 % der Tumormasse dar (Corro und Moch 2018). Sie verfügen über mehrere Stammzellcharakteristika wie zum Beispiel die Expression der Stammzellmarker Nestin, NANOG und OCT4, die Fähigkeit in SCID-Mäusen seriell transplantierbare Karzinome, sowie *spheres* unter nicht-adhärenenten Wachstumsbedingungen zu erzeugen (Bussolati, Bruno et al. 2008). Darüber hinaus zeigte die *CD105*-Expression im klarzelligen Nierenzellkarzinom eine Assoziation mit einem aggressiveren Tumorverhalten, fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechterer Prognose (Saeednejad Zanjani, Madjd et al. 2018). Nichtsdestotrotz wurde die Verwendung von *CD105* als Nieren-Tumorstammzellmarker in vielen Studien bezweifelt, da *CD105*<sup>-</sup>-Zellen ebenfalls tumorstammähnliche Merkmale aufwiesen (Corro und Moch 2018).

**CD44** ist ein Transmembran-Glykoprotein mit Hyaluronsäure als wichtigsten Liganden, der Kontakte zur extrazellulären Matrix vermittelt. Hyaluronsäure ist an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt, einschließlich Wundheilung, Zellwachstum, -überleben und -differenzierung, sowie Tumorzellmigration, -invasion und -metastasierung (Khan, Czarnecka et al. 2015). *CD44* ist ein negativer Prognosefaktor beim klarzelligen Nierenzellkarzinom (Zanjani, Madjd et al. 2018).

Die Transkriptionsfaktoren **POU5F1 (OCT4)**, **NANOG** und **SOX2** sind hoch exprimiert im Embryoblasten und spielen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Selbsterneuerungsfähigkeiten von embryonalen Stammzellen, indem sie ihre eigene und die Transkription einer Vielzahl anderer Gene über kombinatorische Interaktionen regulieren (Surani, Hayashi et al. 2007; Ng und Surani 2011). Sie werden ebenfalls von Tumorstammzellen exprimiert und deren Überexpression, zusammen oder getrennt, führt zu Tumorentstehung, -progression und -metastasierung und zu Tumorrezidiven nach einer Chemoradiotherapie (Herreros-Villanueva, Bujanda et al. 2014). Dennoch ist das Expressionsmuster dieser Transkriptionsfaktoren durch die Heterogenität von Tumoren und die Plastizität von Tumorstammzellen in verschiedenen Tumoren und sogar innerhalb desselben Tumors sehr heterogen (Herreros-Villanueva, Bujanda et al. 2014).

### 1.3 Der Epitheliale-Mesenchymale-Übergang

Der Epitheliale-Mesenchymale-Übergang (epithelial-mesenchymal transition; EMT) ist ein Beispiel für die zelluläre Plastizität, also der Fähigkeit der Zellen, ihren Phänotyp zu verändern (Fabregat, Malfettone et al. 2016). Während dieses Prozesses, welcher unter physiologischen Bedingungen in der Embryogenese und unter pathologischen Bedingungen in soliden Tumoren beobachtet wird, gewinnen Epithelzellen mesenchymale Eigenschaften (Nieto 2013). Das verleiht den Tumorzellen die Fähigkeit, migrieren und in andere Organe metastasieren zu können (Chen, Gassenmaier et al. 2014; Chaffer, San Juan et al. 2016). Mehrere Signalwege beeinflussen die EMT, beispielsweise die des *transforming growth factor-β* (TGF-β) und des *fibroblast growth factor* (FGF), die bei fortgeschrittenen Tumoren vom Tumorstroma oder von den Tumorzellen produziert werden (Heldin, Vanlandewijck et al. 2012). Außerdem wurde beobachtet, dass die zirkulierenden Tumorzellen über Stammzeleigenschaften verfügen, was eine Verbindung zwischen dem EMT- und dem *stemness* Phänotyp zeigt (Brabletz, Kalluri et al. 2018). Der umgekehrte Vorgang, der Mesenchymale-Epitheliale-Übergang (*mesenchymal-epithelial transition*; MET) wird bei der Etablierung von Metastasen aus disseminierten Tumorzellen beobachtet (Nieto 2013). Im

Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mittels reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (*reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) die Expression von vier mit dem EMT in Beziehung stehenden Genen *CDH1*, *CDH2*, *ZEB1* und *VIM* in xenotransplantierten RCC-Tumoren von Sunitinib- bzw. kontrollbehandelten Mäusen, sowie in als *spheres* und adhären gewachsene Zellen aus RCC-53- und SK-RC-17-Tumorzelllinien stammenden Zellen untersucht. *CDH1* ist ein Tumorsuppressorgen, das für das epitheliale, während dem EMT herunterregulierte Zell-Zell-Adhäsionsprotein E-Cadherin, kodiert (Pal, Bhattacharya et al. 2018). *CDH2* kodiert für das mesenchymale Adhäsionsprotein N-Cadherin, das bei Tumorprogression hochreguliert wird. Während dieses E-Cadherin/N-Cadherin-Wechsels verlieren die Epithelzellen ihre Zellpolarität und gewinnen an Migrationskapazität (Pal, Bhattacharya et al. 2018). *ZEB1* (*Zinc finger E-box binding homeobox 1*) ist ein EMT-aktivierender Transkriptionsfaktor, der gleichzeitig die Stammzeleigenschaften und die Migrationskapazität auslöst (Krebs, Mitschke et al. 2017). *VIM* kodiert für Vimentin, ein Typ3-Intermediärfilament und Teil des Zytoskeletts von mesenchymalen Zellen, das während dem EMT hochreguliert wird (Liu, Lin et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression an *VIM*-mRNA in den Primärtumoren von Patienten mit Nierenzellkarzinom mit einem schlechteren *Outcome* assoziiert ist (Chen, Gassenmaier et al. 2014). Induktoren und Effektoren der EMT sind interessante Ziele für die Entwicklung neuer Therapiestrategien in der Tumorthherapie (Heldin, Vanlandewijck et al. 2012).

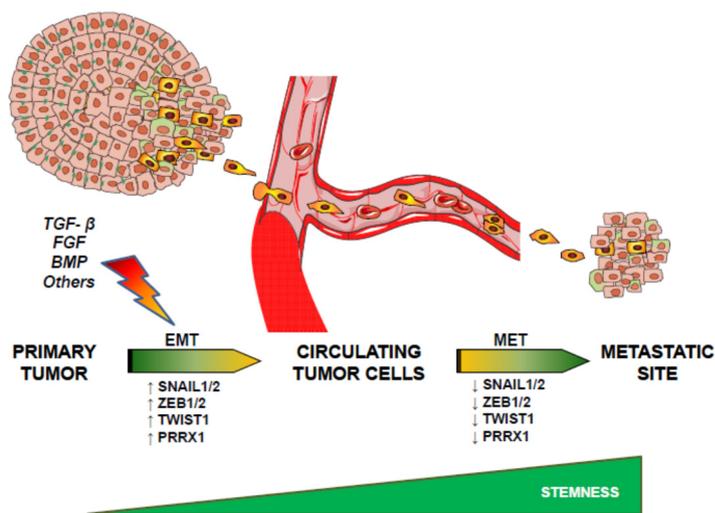


Abbildung 5. Der Epitheliale-Mesenchymale-Übergang (EMT) und der Mesenchymale-Epitheliale-Übergang (MET) sind wichtig für die Migration von Tumorzellen und eine effiziente Metastasierung. Mehrere EMT-induzierende Faktoren wie zum Beispiel TGF-β, FGF und BMP führen über die Aktivierung von mehreren Signalwegen zur Expression von einer Reihe von Transkriptionsfaktoren (zum Beispiel SNAIL, ZEB, TWIST, PRRX1). Dadurch gewinnen die Tumorzellen mesenchymale und Stammzeleigenschaften und können über die Lymph- und Blutgefäße migrieren. Im Zielgewebe angekommen, findet die Umkehr des EMT, nämlich MET statt, der für die Etablierung der Metastasen wichtig ist (Fabregat, Malfettone et al. 2016).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Tumorstammzellen machen eine kleine Population von Zellen bei Tumoren aus, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung, beim Wachstum und Metastasierung von Tumoren zu spielen scheinen. Sie können ein Grund sein für die Unempfindlichkeit von Tumoren gegenüber Tumormedikamenten und Bestrahlung, sowie für das Wiederwachstum von Tumoren trotz zunächst erfolgreicher Therapie.

Tumorstammzellen lassen sich mittels Oberflächenmarker, sowie über die Expression von Stammzellen-assoziierten Transkriptionsfaktoren identifizieren. In Vorarbeiten konnte *in vitro* beim klarzelligen Nierenzellkarzinom CXCR4 als ein Oberflächenrezeptor charakterisiert werden, der bevorzugt von Tumorstammzellen gebildet wird. Dazu konnte *in vitro* gezeigt werden, dass CXCR4-exprimierende Zellen eine Behandlung mit Sunitinib und anderen Rezeptortyrosinkinase-Hemmern wie Sorafenib und Pazopanib besser überstehen und somit angereichert werden. Des Weiteren korrelierte hohe CXCR4-mRNA-Expression in primären RCC-Tumoren bei Patienten mit nicht metastasiertem Nierenzellkarzinom mit einem kürzeren Überleben.

Vor diesem Hintergrund sollten in dieser Dissertation mit Hilfe in immundefiziente Mäuse transplantierte menschlicher Tumorzellen sowie klarzelliger Nierenzellkarzinome Sunitinib-behandelter Patienten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kommt es durch die Behandlung mit Rezeptortyrosinkinase-Hemmern am Beispiel von Sunitinib *in vivo* ebenfalls zu einer Anreicherung der Tumorstammzellen?
2. Ist CXCR4 *in vivo* ein Tumorstammzellmarker?
3. Haben die CXCR4-positive Zellen *in vivo* einen Überlebensvorteil bei Rezeptortyrosinkinase-Hemmung?
4. Korreliert der Gehalt an CXCR4-positiven Tumorzellen nach Sunitinib-Behandlung mit dem Überleben von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom?

Dazu sollten Veränderungen in der Expression von CXCR4 und Stammzellen-assoziierten Transkriptionsfaktoren NANOG, SOX2 und POU5F1 (auch bekannt als OCT3/4) in xenotransplantierten klarzelligen Nierenkarzinomzellen (RCC-53, SK-RC-17) in NOD-SCID-Mäusen mit und ohne Sunitinib-Behandlung ermittelt werden. Außerdem sollte die Expression von CXCR4 auf Proteinebene mittels immunhistologischer Färbungen in Nierenzellkarzinomen neoadjuvant Sunitinib-behandelter Patienten untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit ist, weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Tumorstammzellen bei der Therapieresistenzentwicklung beim Nierenzellkarzinom zu finden. Dies würde die Notwendigkeit der Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe gegen Tumorstammzellen beim Nierenzellkarzinom unterstreichen.

## 2 MATERIALIEN

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Firma
BioCut 2035 Mikrotom	Leica Mikrosysteme GmbH, Bensheim
Deckgläser	Menzel-Gläser, Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Einmalhandschuhe Sempercare	Semperit Technische Produkte GmbH & Co. KG, Wien, Österreich
Einmalspritzen, 1 ml (Omnifix-F)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Elektrophoresekammer, horizontal	Gibco BRL, Karlsruhe
Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf AG, Hamburg
Fotokamera Nikon Eclipse E800 Digital Sight DS-5M-L1	Nikon, Düsseldorf
Geldokumentationssystem Fluor-S MultiImager®	Bio-Rad, München
Histoplate	Leica Mikrosysteme GmbH, Bensheim
Kryotom LEICA CM 3050	Leica Microsystems
Kühlbox	
Küvetten	
Laborkühlschrank UF80-450S	Colora Messtechnik GmbH, Lorch
Laborkühlschränke	Liebherr GmbH
Labormarker	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Light Cycler 8-Tube strips (weiß)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler® 96	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer RCT Basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mikropipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Leica TCS SP5 DMI 6000 CS	Leica, Heidelberg
Mikrotom-Klingen	FEATHER Safety Razor Co., Ltd, Japan
Mikrowelle Micromat	AEG, Nürnberg
NanoDrop 2000c, Spektrophotometer	Thermo Scientific, Erlangen
Objektträger SuperFrost Ultra Plus®	Menzel-Gläser, VWR International GmbH, Ismaning
Objektträger SuperFrost® Plus	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettierassistent Pipetboy accu	Hirschmann, Neckartenzlingen
Präparierbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Präzisionswaage BP2100	Sartorius AG, Göttingen
Reagenzröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml; LidBac)	Eppendorf AG, Hamburg
Sicherheitswerkbank HERA safe HS12	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Skalpelle	PFM-Produkte für die Medizin, Köln
Sterile Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Thermocycler PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research Inc., Watertown, USA
Thermomixer, Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex VF2	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad Leica HI1210	Leica Mikrosysteme GmbH, Bensheim
Wasserbad von Lauda, Typ M12	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg

## 2.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
ActinGreen 488	Life Technologies Corporation, Willow Creek Road Eugene, USA
3-Amino-9-ethylcarbazol tablets	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose (UltraPure™)	Invitrogen, Karlsruhe
Aqua dest (Chomasolv)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aquatex®	Merck, Darmstadt
Brij® L23 solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citratpuffer pH 9 (10x)	DSC Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg
DAPI, NucBlue® Fixed Cell ReadyProbes® Reagent	Life Technologies Corporation, Willow Creek Road Eugene, USA
DNA-Größenmarker 100-bp-Leiter (GeneRuler 100 bp DNA Ladder)	Fermentas, Thermo Scientific, Schwerte
Dulbecco's Modified Essential Medium DMEM/F12	Life Technologies, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethanol S 99 % VG 1 % Petrolether	SAV LP GmbH, Flintsbach
GelRED Nucleic Acid Gel Stain	Biotium Inc., Fremont, USA
IMM Ibbidi Mounting Medium	Ibbidi GmbH, Martinsried
Isoflurane	Forene, Abbott, Heidelberg
Loading Dye 6x	Fermentas, Life Technologies, Darmstadt
Matrigel Matrix High Concentration	BD Biosciences, Heidelberg
Mayers Hämalunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
N-N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS, 10x	Gibco BRL, Karlsruhe
Rotihistol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sunitinib, Malatsalz	LC Laboratories, Woburn, USA

TAE-Puffer, 10x	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek, VWR International GmbH, Darmstadt
TRIS/EDTA-Stammlösung pH 9 (10x)	DSC Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg; Dako North America, Inc. Via Real
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Wasser für die Chromatographie	Merck, Darmstadt

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Primärantikörper

Die mit Sternchen markierten Antikörper wurden vom Pathologischen Institut in München verwendet.

Primärantikörper	reagiert mit Protein aus Spezies	Hersteller
Monoklonaler Kaninchen anti-CXCR4-Antikörper [UMB2], (ab124824)	Maus, Mensch	Abcam, UK
Monoklonaler Kaninchen anti-SOX2-Antikörper [D6D9], Alexa Fluor 647-konjugiert (#5067)	Mensch	Cell Signaling, USA
Polyklonaler Kaninchen anti-Nanog-Antikörper (ab80892)	Maus, Mensch	Abcam, UK
Polyklonaler Kaninchen anti-POU5F1/OCT4-Antikörper (ab19857)	Maus, Mensch	Abcam, UK
Monoklonaler Maus anti-Ki67-Antikörper*	Mensch	Agilent Technologies, USA
Monoklonaler Kaninchen anti-CD133-Antikörper (A3G6K)*	Mensch	Cell Signaling Technology, USA
Monoklonaler Maus anti-OCT-3/4-Antikörper N1NK*	Mensch	Leica Biosystems, UK

### 2.3.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller
Alexa Fluor 488 Huhn anti-Kaninchen IgG (H+L)	Life Technologies/Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor 568 Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)	Life Technologies/Invitrogen, Darmstadt

## 2.4 Primer

Nachfolgend sind alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten Primerpaare aufgeführt. Sie wurden von der Firma Eurofins (Ebersberg, Deutschland) erworben und die Stammlösungen wurden mit Wasser für die Chromatographie (Merck, Darmstadt) erstellt.

Die mit Sternchen markierten Primerpaarsequenzen sind diejenigen, die sich als geeignet für die Fragestellung herausgestellt haben.

Gen (Protein)	Referenz-Sequenz	Primer	Sequenz (5'→3')	Position	Länge (bp)
<i>ACTB*</i> <i>β-Actin Kit</i>		hACTB-f	<i>LC-Primer Set</i> (Sequenz unbekannt)		329
		hACTB-r			
<i>CDH1</i>	NM_004360.3	hCDH1_f1	GAGCTTGC GGAAGTCAGTTCA	Exon 1	321
		hCDH1_r1	GAATCGGGTGTGAGGGAAA	Exon 3	
<i>CDH1*</i>	NM_004360.3	hCDH1_f2	CACCCCCTGTTGGTGTCTTT	Exon 5	203
		hCDH1_r2	GACCTCCTGGGTGAATTCGG	Exon 6	
<i>CDH2</i>	NM_001792	hCDH2_f1	TGGTGTATGCCGTGAGAAGC	Exon 3	341
		hCDH2_r1	CCCAGTTACTGTACCGCA	Exon 5	
<i>CDH2*</i>	NM_001792	hCDH2_f2	ATGCCCAAGACAAAGAGACCC	Exon 3	145
		hCDH2_r2	TGGCCACTGTGCTTACTGAAT	Exon 4	
<i>CXCR4*</i>	NM_003467	hCXCR4-E1-f	AACCAGCGGTTACCATGGAG	Exon 1	480
		hCXCR4-E2-r	CCACCTTTTCAGCCAACAGC	Exon 2	
<i>Cxcr4</i>	NM_009911	mCxcr4-f1	CATGGAACCGATCAGTGTGAG	Exon 1	378
		mCxcr4-r1	ACGCTGCTGTAGAGGTTGAC	Exon 2	
<i>CTNNB1</i> ( <i>β-Catenin</i> )	NM_001904	hCTNNB1-f_sp	GTCTGAGGAGCAGCTTCAGT	Exon 1	148
		hCTNNB1-r_sp	GAGTAGCCATTGTCCACGCT	Exon 2	
<i>CTNNB1</i> ( <i>β-Catenin</i> )	NM_001904	hCTNNB1-f1	TTGAAGGTTGTACCGGAGCC	Exon 11	735
		hCTNNB1-r1	TCCCACCCTACCAACCAAGT	Exon 15	
<i>CTNNB1</i> ( <i>β-Catenin</i> )	NM_001904	hCTNNB1-f2	TGTACCGGAGCCCTTCACAT	Exon 11	722
		hCTNNB1-r2	CCCTACCAACCAAGCTTTCTG	Exon 15	
<i>HPRT*</i>	NM_000194	hHPRT1-f	AGGCGAACCTCTCGGCTTT	Exon 1	275
		hHPRT1-r	TCTCGAGCAAGACGTTTCAGT	Exon 3	
<i>HPRT</i>	NM_000194	hHPRT1-f1	CCTCAGGCGAACCTCTCGG	Exon 1	362
		hHPRT1-r1	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT	Exon 3	
<i>Hprt</i>	NM_013556	mHprt-f1	GGTTAAGCAGTACAGCCCCA	Exon 6	618
		mHprt-r1	ATCGAGAGCTTCAGACTCGT	Exon 9	
<i>Hprt</i>	NM_013556	mHprt-f2	GAGCGTTGGGCTTACTCA	Exon 1	338
		mHprt-r2	ATCCAGCAGGTCAGCAAAGAA	Exon 3	
<i>Hprt</i>	NM_013556	mHprt-f3	TGCTTTCCGAGCGGTAGC	Exon 1	238
		mHprt-r3	TGACATCTCGAGCAAGTCTTTCA	Exon 3	
<i>MYC</i>	NM_002467	hMYC-f-sp_E1	GCGCTGAGTATAAAAAGCCGG	Exon 1	464
		hMYC-r-sp_E2	AGCTAACGTTGAGGGGCATC	Exon 2	

MYC*	NM_002467	hMYC-f-sp_E2	CAGCGACTCTGAGGAGGAAC	Exon 2/3	332
		hMYC-r-sp_E3	TGTGTGTTGCCTCTTGACA	Exon 3	
NANOG*	NM_024865	hNANOG-f	GGCAAACAACCCACTTCTGC	Exon 2	189
		hNANOG-r	AGGCCTTCTGCGTCACAC	Exon 3/4	
POU5F1 (OCT3/4)	NM_002701	hPOU5F1-f_sp	AGTAGTCCCTTCGCAAGCCC	Exon 1	880
		hPOU5F1-r_sp	CACATCCTTCTCGAGCCCAA	Exon 4/5	
POU5F1* (OCT3/4)	NM_002701	hPOU5F1-f1/2	CCCACACTGCAGCAGATCA	Exon 4	343
		hPOU5F1-r1	CATTCCTAGAAGGGCAGGCA	Exon 5	
POU5F1 (OCT3/4)	NM_002701	hPOU5F1-f1/2	CCCACACTGCAGCAGATCA	Exon 4	442
		hPOU5F1-r2	TTCCAATTCCTTCTTAGTGAATG	Exon 5	
SOX2*	NM_003106	hSOX2-f_sp	ATGGGTTCGGTGGTCAAGTC	Exon 1	399
		hSOX2-r_sp	AGCTGTCATTTGCTGTGGGT	Exon 1	
TBP	NM_003194	hTBP-E2-f	TAGTGAGACGAGTTCCAGCG	Exon 2	491
		hTBP-E3-r	CCACCTTTTCAGCCAACAGC	Exon 3	
TWIST1	NM_000474	hTWIST_f1	CTACGCCTTCTCGGTCTGGA	Exon 1	238
		hTWIST_r1	CCCACGCCCTGTTTCTTTGAA	Exon 2	
TWIST1	NM_000474	hTWIST_f2	TCGGACAAGCTGAGCAAGATT	Exon 1	459
		hTWIST_r2	AGAATGCAGAGGTGTGAGGATG	Exon 2	
VIM* (Vimentin)	NM_003380	hVIM-f-sp_E7	AAATGGCTCGTCACCTTCGT	Exon 7	317
		hVIM-r-sp_E10	TTGCTGGTAATATATTGCTGCACTG	Exon 10	
ZEB1	NM_00117409 6.1	hZEB1_f1	GATGACCTGCCAACAGACCAGA	Exon 2	104
		hZEB1_r1	TCTTGCCCTTCCTTCTGTG	Exon 3	
ZEB1*	NM_00117409 6.1	hZEB1_f2	ACTGCATATTGTGGAAGAAGAAAGTG	Exon 2	164
		hZEB1_r2	CTTGCCCTTCCTTCTGTGT	Exon 3	

## 2.5 Zelllinien

Zelllinien	Bemerkung	Referenz
<i>Renal Cell Cancer 53</i> (RCC-53)	von einem Patienten aus Großhadern, LMU, München klarzelliges Nierenzellkarzinom Stadium IV (pT2 N1 Mx G2-3)	(Djafarzadeh, Noessner et al. 2006)
<i>Sloan Kettering Renal Cancer 17</i> (SK-RC-17)	stammt vom Sloan Kettering Cancer Center in New York, klarzelliges Nierenzellkarzinom	Geschenk von J. Vissers, Nijmegen

## 2.6 Mäuse

Mäuse	Vertreiber
NOD.CB17-Prkdc <sup>scid</sup> /J (NOD/SCID)	Charles River, Sulzfeld

## 2.7 Kits

Kits	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Frankfurt
Fast Start Essential DNA Green Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Reverse Transkription System	Promega, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
ImmPRESS HRP Peroxidase Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit, CatNo.MP7401	Vector Laboratories

## 2.8 Software und Internet

Software und Internet	Webseite
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
GraphPad Prism	<a href="http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/">http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/</a>
Microsoft Office 365	<a href="http://www.microsoftstore.com">http://www.microsoftstore.com</a>
Network Protein Sequence Analysis (NPS@)	Pôle BioInformatique Lyonnais <a href="http://npsa-prabi.ibcp.fr">http://npsa-prabi.ibcp.fr</a>
Primer-BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/</a>
Light Cycler® 96	<a href="https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?catalogId=10001&amp;tab=Software&amp;identifier=Real-Time+PCR+Overview&amp;langId=-1">https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?catalogId=10001&amp;tab=Software&amp;identifier=Real-Time+PCR+Overview&amp;langId=-1</a>

## 3 METHODEN

### 3.1 Tierexperimentelle Methoden

#### 3.1.1 Generierung und Behandlung von Tumoren xenotransplanteder RCC-Zelllinien

Die Generierung der Tumore und Behandlung der Mäuse wurden von Maximilian Gassenmeier, Labor für Tumorimmunologie durchgeführt. Für die Durchführung der Tierversuche lag eine Genehmigung von der Regierung von Oberbayern vor (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-44-10). Es wurden  $1 \times 10^4$  RCC-53- oder SK-RC-17-Tumorzellen in die rechten und linken Rückenseite von weiblichen 6-9 Wochen alten *non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency* (NOD/SCID)-Mäusen in 100  $\mu$ l Matrigel : Dulbecco's Modified Essential Medium F12 (DMEM/F12) (1:1) subkutan injiziert. Dafür wurde eine 1 ml Spritze mit einer 23-Gauche-Kanüle verwendet. Die Injektionen wurden unter Kurznarkose mit Isoflurane durchgeführt. RCC-53-Zellen wurden in insgesamt 10 Mäuse und SK-RC-17-Zellen in 6 Mäuse gespritzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben (Gassenmaier et al., 2013). Die RCC-53-Zelllinie stammt von einem Patienten im Stadium IV (pT2N1MxG2-3) mit klarzelligem Nierenzellkarzinom und zeichnet sich durch eine hohe proliferative Kapazität aus (Djafarzadeh, Noessner et al. 2006). Die SK-RC-17-Zelllinie stammt ebenfalls von einem Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom und wurde von J. Vissers, Nijmegen zur Verfügung gestellt. Als die Tumoren ein Volumen von 100 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, wurden die Mäuse in zwei Gruppen mit gleicher Tumorgößenverteilung aufgeteilt. Die Tumorgöße wurde mit einem digitalen Messschieber gemessen und das Tumolvolumen wurde als Länge x Breite<sup>2</sup>/2 berechnet. Die eine Hälfte der Mäuse wurde mittels einer Schlundsonde mit Lösungsmittel (Zitratpuffer pH 3,5) (Kontrollgruppe) und die andere Hälfte mit 40 mg/kg Körpergewicht Sunitinib als Zitrat-gepufferte Lösung täglich für 14 Tage behandelt. Dazu erhielten die mit der RCC-53-Zelllinie injizierten Mäuse alle 2 Tage parallel zur Sunitinib-/Kontrolle-Behandlung subkutane Injektionen von 100  $\mu$ l einer 5 %igen Glukoselösung über insgesamt 14 Tage. Die 5 %ige Glukoselösung diente als Placebo im Rahmen eines unabhängigen Experiments, was nicht Teil dieser Doktorarbeit ist. Nach 14 Behandlungstagen wurden die Mäuse getötet und die Tumoren entfernt.

#### 3.1.2 Schneiden von Paraffinblöcken

Vor dem Schneiden wurden die Paraffinblöcke für einigen Minuten auf Eis gekühlt, woraufhin das Schneiden mit einer Dicke von ca. 2  $\mu$ m erfolgte. Im Anschluss daran wurden die geschnittenen Gewebeproben zum Strecken in ein Wasserbad von 40 °C überführt, auf SuperfrostPlus-Objektträger aufgezogen und schließlich auf einer Wärmeplatte bei 75 °C für mindestens 10 Minuten getrocknet.

### 3.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1 Herstellung von Maustumorkryoschnitten für die RNA-Isolierung

Die Maustumoren wurden vor dem Schneiden bei -80 °C in Kryoröhrchen im Gefrierschrank gelagert. Sie wurden in Trockeneis transportiert und auf etwas Trockeneis in das Mikrotom gelegt. Nachdem sie mit etwas Tissue-Tek auf dem Probenhalter festfrozen waren, wurden Schnitte mit einer Dicke von ca. 20  $\mu$ m angefertigt. Schließlich wurden die Schnitte (maximal 30 mg) in 2-ml-Eppendorfröhrchen überführt und im -80 °C-Gefrierschrank bis zur RNA-Isolierung aufbewahrt.

### 3.2.2 RNA-Isolierung

Zuerst wurden die Tumorschnitte mit je 0,6 ml aus einer Mischung aus  $\beta$ -Mercaptoethanol und RLT-Puffer im Verhältnis 1:100 für ca. 30 min aufgelöst, in einen QIAshredder überführt und bei 1.400 rpm bei 14 °C zentrifugiert. Anschließend wurde RNA mit dem RNeasy Mini Kit gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert. Zum Schluss wurden die Qiagen-Säulen in neue 1,5 ml Reaktionsgefäßen platziert und 50  $\mu$ l RNase-freies Wasser wurde auf die Mitte der Säulenmembran pipettiert. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm bei Raumtemperatur wurden die RNA-Proben eluiert, auf Eis gekühlt und bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.2.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Im Anschluss an der RNA-Isolierung wurde mit dem NanoDrop Spektrophotometer 2000c die Konzentration in jeweils 1,5  $\mu$ l RNA-Lösung bestimmt. Dafür wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Eine optische Dichte ( $OD_{260\text{ nm}}$ ) von 1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration (c) von 40  $\mu$ g/ml. Somit wurde die RNA-Konzentration mit der folgenden Formel berechnet:

$$c_{\text{RNA}} (\mu\text{g/ml}) = 40 \mu\text{g/ml} \times OD_{260}$$

Als Indikator für die RNA-Reinheit wurde das Verhältnis der  $OD_{260}$  zur  $OD_{280}$  berechnet, was im Idealfall bei 2,0 liegen sollte. Das  $OD_{260}/OD_{280}$ -Verhältnis der in dieser Arbeit verwendeten RNAs lag zwischen 2,04 - 2,1.

### 3.2.4 Kontrolle der RNA-Intaktheit

Es wurden repräsentativ mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit einige RNA-Proben analysiert. Bei dem Elektropherogramm gab es keinen Hinweis auf Degradation und DNA-Kontamination. Die *RNA integrity number* (RIN)-Werte lagen zwischen 8 und 10, wobei 10 den maximal erreichbaren Wert darstellt. RIN-Werte liegen auf einer Skala von 1 bis 10, wobei 1 eine komplett degradierte RNA und 10 eine vollständig intakte RNA anzeigt.

### 3.2.5 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Für dieses Experiment wurde das Reverse Transcriptase System Kit von Promega, sowie das RNase-freie Wasser aus dem RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Zuerst wurden die Lösungen aus 1  $\mu$ g RNA verdünnt in 9,82  $\mu$ l RNase-freiem Wasser hergestellt. Die RNA-Lösungen wurden 10 min bei 70 °C denaturiert und dann auf Eis schnell abgekühlt. Im Anschluss wurden die im Tabelle 1 angegebenen Reagenzien der Reihe nach zu dem Ansatz gegeben. Um eine Primeranlagerung zu gewährleisten, wurden die fertigen Lösungen 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die darauffolgende cDNA-Synthese erfolgte in einem Thermocycler wie im Tabelle 2 geschildert. Zum Schluss wurde die dabei entstandene cDNA mit 80  $\mu$ l PCR grade H<sub>2</sub>O (Roche, Penzberg) verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt.

**Tabelle 1:** Reaktionsansatz reverse Transkription

Reagenzien	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen pro Probe (µl)
RNA	-	1 µg/20 µl	9,82
Random Hexamer Primer	0,5 µg/µl	25 ng/µl	1
RT-Puffer*	10x	1x	2
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5 mM	4
dNTP	10 mM	1 mM	2
RNasin RNase-Hemmer	40 U/µl	1 U/µl	0,5
AMV Reverse Transkriptase	25 U/µl	17 U/20 µl	0,68
Endvolumen	-	-	20

\*10x = 10 mM Tris-Cl pH 9.0, 50 mM KCl, 0,1 % Triton X100

**Tabelle 2:** Inkubationsbedingungen reverse Transkription

Versuchsschritt	Temperatur	Dauer
Inkubation	70 °C	10 min, dann auf Eis schnell abkühlen
Inkubation	bei RT*	10 min
	42 °C	60 min
Erhitzen	95 °C	5 min
Inkubation	0-5 °C	5 min

\*RT, Raumtemperatur

### 3.2.6 Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Diese Methode wurde verwendet, um die mRNA-Expression der untersuchten Genen zu quantifizieren. Die RT-PCR-Reaktionen wurden im LightCycler96 durchgeführt. Die jeweils verwendeten Primerpaare sind im Abschnitt 2.4 dargestellt. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 3:** Reaktionsansatz RT-PCR

Zusammensetzung	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen pro Probe (µl)
cDNA	10 µg/ml	2,5 µg/ml	2,5
H <sub>2</sub> O	-	-	1,5
Primer f	10 µM	0,5 µM	0,5
Primer r	10 µM	0,5 µM	0,5
FastStart Essential DNA Green Master	2x	1x	5
Endvolumen	-	-	10

Die Reagenzien wurden in die weißen 8-Röhrchen-Streifen von Roche überführt, anschließend 2 min bei 1.200 rpm herunterzentrifugiert und in dem LightCycler96 eingeführt. Die Reaktionsbedingungen in dem LightCycler96 waren wie folgt:

**Tabelle 4:** Inkubationsbedingungen RT-PCR

Versuchsschritt		Dauer und Temperatur	Zyklen
Präinkubation	Initiale Denaturierung	600 s bei 95 °C	1
Amplifikation	Denaturierung	10 s bei 95 °C	40
	Primerhybridisierung	10 s bei 60 °C	
	Elongation	15 s bei 72 °C	
Schmelzanalyse	Denaturierung	10 s bei 95 °C	1
	Entstehung vom Doppelstrang	60 s bei 65 °C	
	Schmelzen	1 °C/s 65-97 °C	
Abkühlung		30 s bei 37 °C	1

Die relative normalisierte Menge an cDNA für das untersuchte Gen wurde mit der folgenden

Formel errechnet: 
$$\frac{2^{Cp \text{ Haushaltsgen } (h)}}{2^{Cp \text{ gesuchtes Gen } (g)}} = 2^{Cp \text{ h} - Cp \text{ g}}; Cp, \text{ crossing point}$$

Es wurden mehrere Haushaltsgene geprüft  $\beta$ -Actin (*ACTB*),  $\beta$ -Catenin (*CTNNB1*), Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (*HPRT*) und *TATA-binding protein* (*TBP*). Die Expressionsdaten wurden für den Gehalt der HPRT- oder ACTB-mRNA normalisiert.

Um zu verdeutlichen was der Cp-Wert ist wird im Folgenden kurz das Prinzip der RT-PCR erläutert (Rasmussen, 2001):

Die Echtzeit-PCR ist eine in der Forschung häufig verwendete Methode zur Amplifikation von bestimmten Bereichen der DNA. Die DNA-Amplifikation kann durch die Einlagerung eines Fluoreszenz-Farbstoffes in die amplifizierte DNA in Echtzeit quantifiziert werden. Im Verlauf der Echtzeit-PCR steigt durch die Zunahme des PCR-Produktes auch das Fluoreszenzsignal an. Um die Akkumulation der PCR-Produkte in der sogenannten Amplifikationskurve zu visualisieren trägt man die Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl auf. Die Amplifikationskurve besteht aus drei Phasen: der Hintergrundphase, der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase) und der Plateau-Phase. Die Hintergrundphase dauert so lange das Hintergrundsignal vom System nicht vom PCR-Produkt-Signal unterscheidbar ist. Sobald ausreichend PCR-Produkt akkumuliert ist und dessen Signal das Hintergrundsignal überschritten hat, beginnt die exponentielle Wachstumsphase. Der PCR-Zyklus bei dem die Fluoreszenz erstmals über den Hintergrund wächst ist abhängig von der mRNA-Menge am Anfang der Reaktion und wird als Cp-Wert bezeichnet. Je größer die anfängliche mRNA-Menge, desto weniger PCR-Zyklen müssen durchlaufen werden bis der Cp-Wert erreicht ist. Sobald die Reaktion zum Erliegen kommt, wird das Plateau erreicht (Abb. 6).

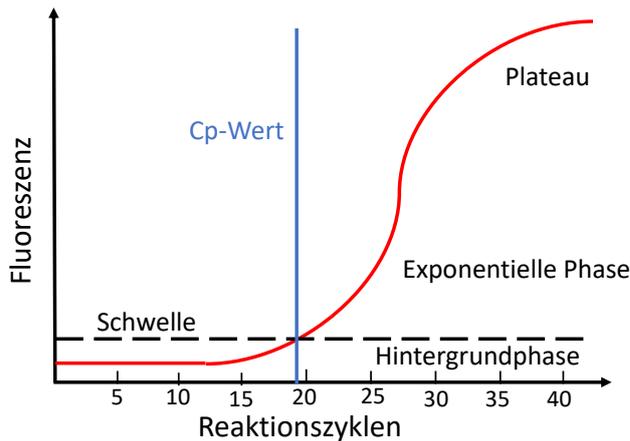


Abbildung 6. **Phasen der Echtzeit-PCR-Amplifikation.** Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz gegen die Zahl der Reaktionszyklen. Die Amplifikationskurve (in rot) besteht aus drei Phasen: der Hintergrundphase, der exponentiellen Phase und der Plateau-Phase. Nach jedem Reaktionszyklus steigt produktabhängig die Fluoreszenz. Die Zyklenzahl wo das Fluoreszenz-Signal den von der Software vorgegebenen Schwellenwert (gestrichelte Linie) überschreitet bezeichnet man als Cp-Wert (blaue Linie).

### 3.2.7 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um die Größe sowie die Reinheit der PCR-DNA-Fragmente zu überprüfen. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern unterschiedlich schnell je nach Größe unter Einfluss eines elektrischen Felds durch das Gel in Richtung positiv geladener Anode. Dabei wandern die kleinsten DNAs am schnellsten. Es wurde ein 2 %iges Agarosegel aus 2 g Agarose in 10 ml 10 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer und 90 ml entionisiertem Wasser hergestellt. Nach dem Erhitzen der Agarose-Suspension in der Mikrowelle, wurde vor dem Erstarren 5 µl von dem unter UV-Licht fluoreszierenden GelRED-Farbstofflösung hinzugefügt. Zur Erleichterung der Probenauftragung und um die DNA-Migration während der Elektrophorese zu visualisieren, gab man zu dem PCR-Produkt im Verhältnis 1:6 einen 6X DNA-Loading Dye hinzu. In jede Tasche wurden je 10 µl von den Mischungen, in eine Tasche 7,5 µl 100 bp-DNA-Leiter zum Größenvergleich pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 90 V in 1 x TAE-Puffer in einer horizontalen Elektrophoresekammer für ungefähr 90 Minuten ausgeführt. Zum Schluss wurde die Mobilität der DNA-Fragmente mit dem Geldokumentationssystem Fluor-S von Bio-Rad dokumentiert.

## 3.3 Immunologische Methoden

### 3.3.1 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Für die immunhistologischen Färbungen wurden Gewebeschnitte von Tumoren von jeweils 19 neoadjuvant Sunitinib-behandelten Patienten aus der N06SUN Studie (Powles, Kayani et al. 2011) und 22 neoadjuvant Sunitinib-behandelten Patienten aus der SURTIME Studie (Bex, Mulders et al. 2018) von Prof. Dr. Axel Bex, Department of Urology, National Cancer Institute, Amsterdam, Netherlands erhalten. Es lag eine Genehmigung der lokalen Ethikkommission für die Durchführung dieser Experimente vor (Prof. Dr. Axel Bex, persönliche Mitteilung). Die Einschluss- und Ausschlusskriterien dieser beiden Studien sind im Anhang aufgeführt.

Die Schnitte wurden zweimal je 5 min in Rotihistol entparaffiniert und anschließend durch Inkubation in absteigender Alkoholreihe in 100 %igem, 96 %igem, 75 %igem Ethanol, sowie

in destilliertem Wasser rehydriert. Nachdem sie 5 min in Leitungswasser gespült waren, wurden sie in auf 95 °C vorgewärmter Target Retrieval Lösung (DAKO) bestehend aus 10 ml Tris/EDTA pH 9 (Konzentration von der Firma nicht offengelegt) in 90 ml destilliertem Wasser gegeben und daraufhin für 30 min im Wasserbad bei 95 °C inkubiert. Nach einer 20-minütigen Abkühlung bei Raumtemperatur, folgten drei Waschschrte mit PBS und die Peroxidaseblockierung in einer Mischung aus 80 ml PBS, 10 ml Methanol und 10 ml 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nachdem die Objektträger in PBS gewaschen waren, wurden sie für 20 min mit 2,5 %igem normalem Pferdeserum aus dem ImmPRESS Reagent Kit blockiert. Im Anschluss daran inkubierte man sie mit dem Primärantikörper, verdünnt mit 2,5 %igem normalem Pferdeserum in der jeweils als optimal ermittelten Konzentration für eine Stunde in einer Feuchtkammer (lichtdichte Kunststoffkammer mit Wasser-getränktem Haushaltspapier ausgeschlagen) bei Raumtemperatur. Nachher folgte noch ein 5-minütiger Waschschrte in PBS, woraufhin die Inkubation mit der ImmPRESS-Zweitantikörperlösung stattfand. Darauf erfolgte nach zwei Waschschrten in PBS die Peroxidasefärbung in 50 ml Färbelösung bestehend aus 4 ml 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC; 20 mg AEC in 5 ml Dimethylformamid) und 46 ml Acetat-Puffer, pH 5,2 mit 60 µl 30 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 15 min. Zum Schluss fand eine Gegenfärbung der Kerne in Hämalaun für ca. 30 s statt. Anschließend wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckelt.

Die Ki67-Färbung erfolgte in Kooperation mit dem Pathologischen Institut, LMU München nach Standardverfahren.

### **3.3.2 Auswertung/Quantifizierung der Färbung der immunhistologisch gefärbten Gewebeschnitte**

Für die Auswertung der Überlebenszeiten abhängig von der CXCR4-Expression wurden Kaplan-Meier-Analysen verwendet. Die Auswertung der CXCR4-Färbung erfolgte unter Einbeziehung der Färbeintensität (Kategorie A) und des prozentualen Anteils CXCR4-positiver Tumorzellen (Kategorie B). Die Färbeintensität wurde mit 0 bis 3 Punkten (0 - keine Färbung, 1 - schwache Färbung, 2 - mäßige Färbung, 3 - starke Färbung), der Anteil positiver Tumorzellen mit 0 bis 4 Punkten (0 - keine, 1 - 0 bis 10 %, 2 - 10 bis 50 %, 3 - 50 bis 80 %, 4 - über 80 % positive Tumorzellen) gewertet. Dessen Summe ergab den CXCR4-Färbescore. Der Median des CXCR4-Färbescores von Tumorzellen diente als cut-off, um die Tumore in hoch bzw. niedrig CXCR4-exprimierend zu unterteilen. Es wurden zwei Varianten gerechnet: einmal wurden Proben mit dem Score des Medianwertes zur Gruppe der hohen (Abb. 15A), einmal zur Gruppe der niedrigen CXCR4-Positivitätsgruppe (Abb. 15B) gerechnet. Die Gewebeproben der Serie 1 und Serie 2 haben einen unterschiedlichen cut-off-Wert von A (Intensität) + B (Ausmaß) CXCR4-Score = 4 (Serie 1) bzw. 2 (Serie 2) ergeben. Die Überlebensdaten der Patienten der Serie 1 und Serie 2 in Abhängigkeit vom CXCR4-Färbescore wurden zusammen in einem Graphen ausgewertet.

Für die Analyse der Überlebenszeitdaten abhängig von der Ki67-Expression wurde das Kaplan-Meier-Verfahren und als *cut-off* der Median der Mittelwerte der Häufigkeit der Ki-67-positiven Tumorzellen verwendet. Die Auszählung Ki-67-positiver Zellen ergab unterschiedliche cut-off-Werte (Proben Serie 1: 10,4 und Serie 2: 12,0 [Median der Mittelwerte von Ki67-positiven Tumorzellen pro 10x10-Auszählraster bei 20x Objektiv-Vergrößerung]). Es wurden je nach der Häufigkeit der Ki-67-positiven Zellen zwischen 12-69 Raster und im Mittel 427 positive Zellen (31-1376) pro Tumorschnitt ausgezählt. Für die

Ki67-Auswertung wurden nicht alle Gewebeproben der Serie 1 aufgrund einer zum Teil zu schwachen Färbung verwendet. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde der Log-rank Test (Mantel-Cox) verwendet.

### **3.3.3 Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten**

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte bis zum Schritt mit der Inkubation im Wasserbad und Abkühlung bei Raumtemperatur in Target Retrieval Solution gleich wie bei der immunhistologischen Färbung beschrieben. Die Waschschriffe in PBS verliefen hier jeweils 5 min in PBS/0,1 % Brij L23.

Nachdem die Objektträger dreimal in PBS gewaschen waren, wurden sie für 20 min mit 2,5 %igem normalem Pferdeserum aus dem ImmPRESS Reagent Kit blockiert. Im Anschluss daran wurden sie zuerst mit dem Primär- und danach mit dem Sekundärantikörper, verdünnt mit 2,5 %igem normalem Pferdeserum in der jeweils als optimal ermittelten Konzentration für je eine Stunde in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Dazwischen und danach wurden sie je dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte, um die Kerne zu färben, mit 2 Tropfen 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Lösung (DAPI)/ml PBS für 10 Minuten inkubiert, gefolgt von zwei Waschschriffen in PBS. Zum Schluss wurden sie mit 2 Tropfen ActinGreen 488 für 30 Minuten inkubiert, nach zwei Waschschriffen in PBS mit IMM Ibbidi Mounting Medium eingedeckelt und lichtgeschützt bei 4 °C bis zum Mikroskopieren aufbewahrt.

### **3.4 Mikroskopie und Bildbearbeitung**

Die Immunhistologischen Färbungen wurden mit dem Nikon Eclipse E800 Mikroskop (Nikon, Düsseldorf) untersucht und mit der digitalen Fotokamera Nikon Digital Sight DS-5M-L1 dokumentiert. Mit dem konfokalen Mikroskop Leica TCS SP5 DMI 6000 CS (Leica, Heidelberg) wurden die Immunfluoreszenz-gefärbten Schnitte analysiert. Die Helligkeit der Bilder wurde mit Microsoft Office bearbeitet.

### **3.5 Zellbiologische Methoden**

#### **3.5.1 Sphere formation assay**

Ein Teil der von mir benutzten RNAs wurde aus Zellen isoliert, die unter *sphere formation assay* Bedingungen von Maximilian Gassenmeier kultiviert wurden. Dafür ließ er RCC-53- und SK-RC-17-Zellen unter *sphere formation* oder adhärenente Bedingungen für 7 Tagen wachsen (Gassenmaier, Chen et al. 2013). Für die RNA-Isolierung wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen und die QUAschredder-Säulen eingesetzt.

### **3.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Signifikanz wurde mit dem GraphPad Prism8 unter Verwendung des parameterfreien Mann-Whitney-Tests berechnet, wobei p-Werte <0,05 als signifikant galten. Zur Analyse der Überlebenszeitdaten wurde das Kaplan-Meier-Verfahren und der Log-rank Test (Mantel-Cox) verwendet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Vorgehensweise bei der Suche nach speziesspezifischen Primern für die RT-PCR zur Quantifizierung von humanen mRNAs am Beispiel von Vimentin-mRNA und Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Für die Quantifizierung von humanen Transkripten in xenotransplantierten humanen Tumorzelllinien in NOD/SCID-Mäusen durch RT-PCR war die Suche nach humanspezifischen Primern notwendig da Xenotransplantattumoren Gewebe murinen Ursprungs, wie Blutgefäße und Bindegewebe, enthalten. Es wurde das Vimentin-Gen (*VIM*) ausgewählt, weil humane Vimentin (hVIM)- und murine Vimentin (mVim)-Transkripte in Tumoren relativ häufig vorkommen.

Das Primerpaar wurde unter folgenden Bedingungen gesucht:

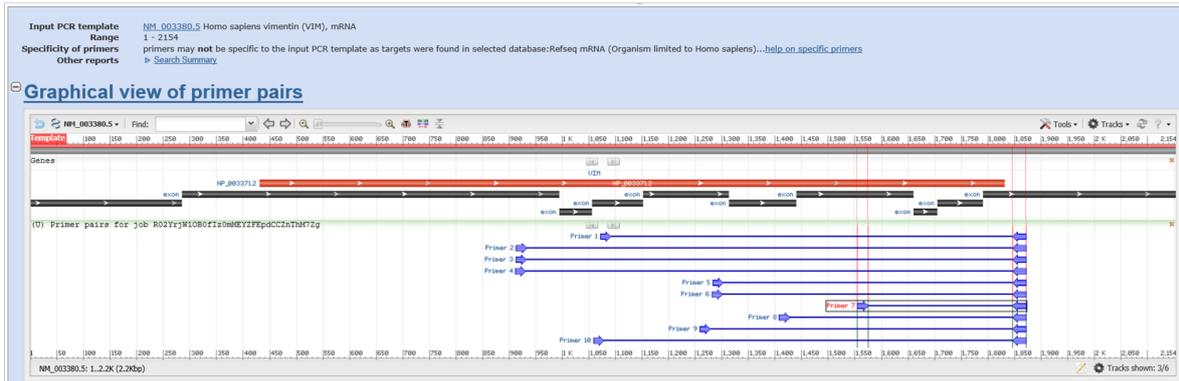
- es sollte spezifisch für Vimentin-mRNA des Menschen sein und es sollten keine anderen mRNAs dieser Spezies mitdetektiert werden;
- die Primer sollten keine Maus-mRNAs insbesondere nicht Maus-Vimentin-mRNA erkennen.

Dazu sollten Primerpaare allgemein eine ähnliche Schmelztemperatur ( $T_m$ ) und einen vergleichbaren G/C-Gehalt haben, ohne Homodimere mit sich selbst oder interne Haarnadel-Strukturen (*hair-pin structures*) auszubilden (Ye, Coulouris et al. 2012). Zuerst wurde die Referenzsequenz für das Transkript mit der Endung -001 bzw. -201 (die Variante mit den meisten Exonen) für dieses Gen bei Mensch und Maus in Ensembl ausgewählt (VIM-201; Nukleotidreferenzsequenz NM\_003380). Danach wurden bei PubMed/Nucleotide durch Eingabe der Referenzsequenznummer die Nukleotid-Sequenzen im FASTA-Format gefunden. Die Primersuche erfolgte bei Primer-BLAST unter Eingabe der Referenzsequenz von Mensch-Vimentin und Ausschluss von Maus-Sequenzen (Abb. 7A).

Um die zwei Sequenzen von Mensch und Maus vergleichen zu können, wurde ein Nukleotidsequenzalignment mit Hilfe des CLUSTALW-Programms ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa\\_clustalwan.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_clustalwan.html)) durchgeführt.

Die Suche nach geeigneten humanspezifischen Primern war erschwert, da die VIM mRNA-Nukleotidsequenzen von Mensch und Maus sehr ähnlich sind. Daher wurde die Eignung der vom Primer-BLAST vorgeschlagenen Primerpaare zusätzlich kontrolliert. Sie wurden dazu in dem Nukleotidsequenzalignment eingetragen, um zu überprüfen, ob sie bei ihrer Anlagerung wirklich nur Vimentin-mRNA des Menschen erkennen würden. In rot sind die identische Basenpaare zwischen Mensch- und Maus-mRNA markiert. In unserem Beispiel sind die getesteten Primerpaare hellblau und gelb markiert (Abb. 7B).

A



Primer pair 7

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	Primer
Forward primer	AAATGGCTCGTCACCTTCGT	Plus	20	1537	1556	59.97	50.00	3.00	0.00	hVIM-f-sp_E7
Reverse primer	TTGCTGGTAATATATTGCTGCACTG	Minus	25	1853	1829	59.99	40.00	8.00	3.00	hVIM-r-sp_E10
Product length	317									

Products on intended target  
>NM\_003380.3 Homo sapiens vimentin (VIM), mRNA

product length = 317

```

Forward primer 1 AAATGGCTCGTCACCTTCGT 20
Template        1537 ..... 1556
Reverse primer 1 TTGCTGGTAATATATTGCTGCACTG 25
Template        1853 ..... 1829
  
```

B

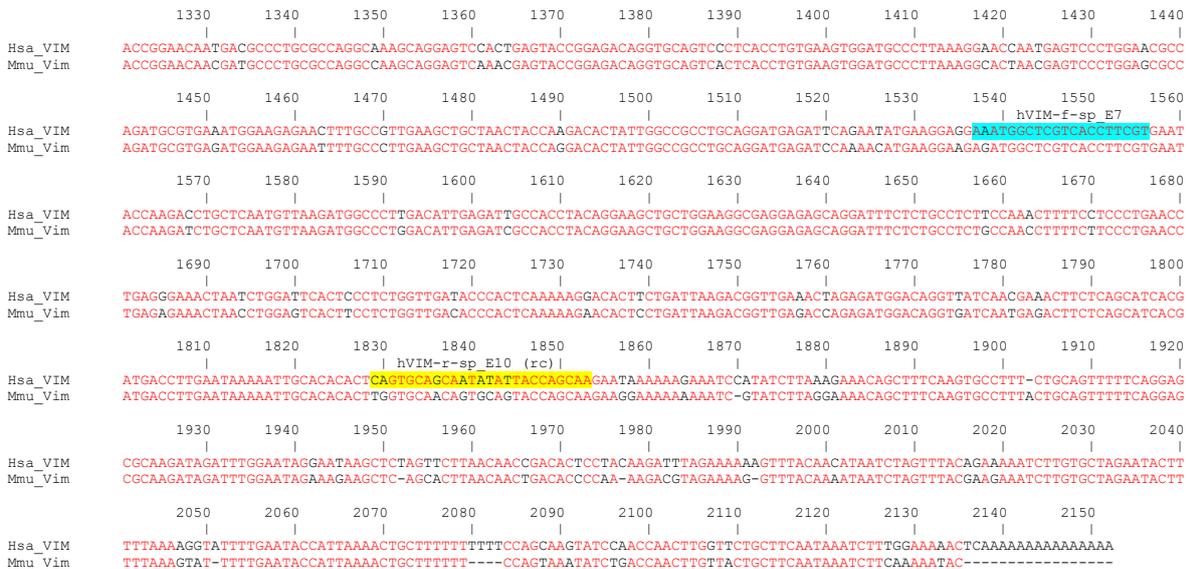


Abbildung 7. Vorgehensweise zur Identifizierung von speziesspezifischen Kandidaten-Primern am Beispiel von Vimentin-cDNA. (A) Zehn Kandidaten-Primerpaare wurden von Primer-BLAST nach Eingabe der Referenzsequenz von Mensch-Vimentin und Ausschluss von Maus-Sequenzen vorgeschlagen. Das Primerpaar Nummer 7 wurde ausgewählt, weil die beiden Primerpaare eine ähnliche Schmelztemperatur, einen vergleichbaren G/C-Gehalt haben und ihre Primerlänge geeignet erscheint. Des Weiteren ist das PCR-Fragment mit 317 Basenpaare nicht sehr groß und kann daher in hoher Ausbeute amplifiziert werden. (B) Nucleotidsequenzvergleich zwischen VIM Mensch- und Maus-mRNA, um die Eignung des Primerpaars 7 zu überprüfen. Rot markiert sind übereinstimmende Nucleotide, schwarz markiert sind unterschiedliche Nucleotide. Hellblau markiert ist die Sequenz des forward Primers und gelb markiert die des reverse Primers (komplementäre Sequenz, rc). Bei der Abweichung der humanen Primersequenz zur Maussequenz wurde darauf geachtet, dass die unterschiedlichen Basen vor allem am 3' -Ende von mindestens einem Primer liegen, da dort die Elongation stattfindet. Primernamen: E, Exon.

Zunächst wurden die Primerpaare auf ihre Spezifität getestet. Als Negativkontrollen wurden Maus-Milz-cDNA und Wasser genommen. Die Maus-Milz-RNA wurde freundlicherweise von Prof. Georg Enders, LMU München zur Verfügung gestellt. Eine Mischung aus SK-RC-17- und RCC-53-cDNA aus adhären und als *spheres* gewachsenen Zellen diente als Positivkontrolle. Um zu beurteilen ob das Primerpaar menschspezifisch ist und nur ein Amplifikationsprodukt liefert, wurden die Schmelzkurven und Größe der amplifizierten DNAs sowie die Cp-Werte (siehe unten) der Kontrollen miteinander verglichen. Die Größe der PCR-DNA-Fragmente wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Das gleiche Verfahren wurde für jedes Primerpaar durchgeführt. Folgende Cp-Werte der sich als geeignet gefundenen Primerpaare wurden erhalten (ein repräsentatives Experiment ist gezeigt):

**Tabelle 5:** *Crossing points* (Cp) der als geeignet gefundene humanspezifischen Primerpaare

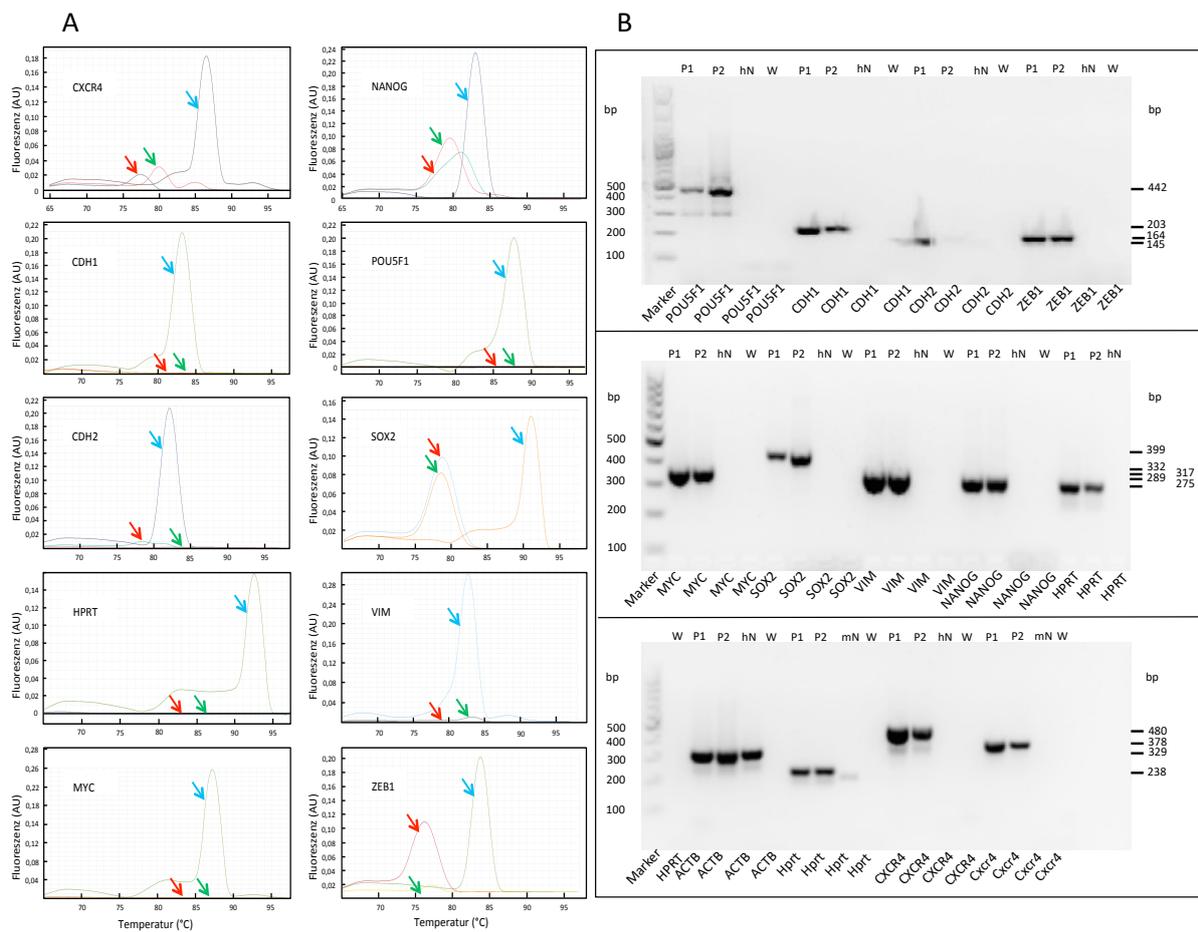
Primerpaare	CXCR4	CDH1	CDH2	HPRT	MYC	NANOG	POU5F1	SOX2	VIM	ZEB1
Positivkontrolle*	22,53	23,90	18,74	24,55	19,32	26,33	23,04	26,92	16,09	23,52
Mausmilz-cDNA	37,03	-	-	-	-	34,98	-	34,64	38,38	38,82
Wasser	37,81	-	37,88	-	-	34,50	-	34,13	-	34,92

\*, cDNA-Gemisch aus adhären und als *spheres* gewachsenen menschlichen SK-RC-17- und RCC-53-Zelllinien  
 -, nicht angezeigt/nicht detektierbar

Wie in Tabelle 5 zu sehen ist, gab es bei den Negativkontrollen (Mausmilz-cDNA, Wasser) entweder kein Fluoreszenzsignal oder der Fluoreszenzschwellenwert wurde viel später überschritten (höherer Cp-Wert) als bei der Positivkontrolle. Da wahrscheinlich viele der analysierten Gene auch in der Milz der Maus exprimiert sind, spricht dieses Ergebnis für die Menschspezifität der Primerpaare. Das cDNA-Gemisch aus adhären und als *spheres* gewachsenen menschlichen SK-RC-17- und RCC-53-Zelllinien wurde als Positivkontrolle genommen, weil es zu erwarten war, dass die Tumorstammzellen-assoziierte Gene (*CXCR4*, *NANOG*, *SOX2*, *POU5F1*, *MYC*) und das mesenchymale Marker gen *VIM* exprimiert sind (Gassenmaier, Chen et al. 2013).

#### 4.2 Qualitätsprüfung der bei der RT-PCR entstandenen DNA-Fragmente

Es wurden Schmelzkurvenanalysen und Gelelektrophorese zur Überprüfung der Reinheit und der Größe der mittels PCR amplifizierten cDNAs verwendet (Abb. 8). Für CXCR4- und POU5F1-cDNA sieht man jeweils zwei Produkte, was auch in den Schmelzkurven ersichtlich ist. Für  $\beta$ -Actin (ACTB) ergab die Negativkontrolle Mausmilz-cDNA ein Produkt, was ebenfalls in der Schmelzkurvenanalyse und am Cp-Wert erkennbar war (hier nicht dargestellt). Dies zeigt, dass die kommerziell erhaltenen ACTB-Primer humanes und murines ACTB-cDNA amplifizieren und somit nicht speziesspezifisch sind. Die übrigen Primer ergaben DNA-Fragmente der erwartenden Größe und waren spezifisch für Mensch- bzw. Maus-cDNAs, d.h. sie sollten in der Lage sein, in einem Gemisch von Mensch- und Maus-cDNAs, die jeweiligen cDNAs speziesspezifisch nachzuweisen und zu quantifizieren.



**Abbildung 8. Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese der mittels RT-PCR amplifizierten Stammzell- und EMT-Markergen-cDNAs zur Überprüfung der Humanspezifität der verwendeten Primer. (A)** Schmelzkurven der amplifizierten cDNAs der analysierten Genen am Beispiel eines repräsentativen Tumors aus einer nicht-therapierten Maus (hellblauer Pfeil). Die Proben der anderen Tumore zeigten vergleichbare Schmelzkurven (hier nicht dargestellt). Zusätzlich sind die Schmelzkurven der zwei Negativkontrollen Mausmilz-cDNA (grüner Pfeil) und Wasser dargestellt (roter Pfeil). Sie zeigten entweder kein Signal oder eine meist deutlich niedrigere Schmelztemperatur als die Positivkontrollen, was auf eine deutlich kleinere Größe hinweist (die Schmelztemperatur ist positiv mit der Länge und dem GC-Gehalt der Doppelstrang-DNA korreliert). **(B)** Analyse der Größe der von zwei unterschiedlichen Tumoren (P1, P2) amplifizierten cDNAs durch Agarosegelelektrophorese. Die erwartete Größe der PCR-Produkte ist am rechten Rand angegeben. Für CXCR4 und POU5F1 sieht man jeweils zwei Produkte, was auch in den Schmelzkurven ersichtlich ist. Bei (P2) für CDH2 wurde in der Tasche nichts aufgetragen. Für ACTB ergab die Negativkontrolle Mausmilz-cDNA hN ein Produkt, was ebenfalls in der Schmelzkurvenanalyse und am Cp-Wert erkennbar war (hier nicht dargestellt). Dies zeigt, dass die ACTB-Primer humanes und murines ACTB-cDNA amplifizieren und somit nicht speziesspezifisch sind. Dazu wurden die PCR-Produkte der getesteten Mausgene *Cxcr4* und *Hprt* analysiert (in B unten dargestellt). Für die Mausgene diente Mausmilz-cDNA als Positivkontrolle, was jeweils ein Produkt ergab, was am Cp-Wert und in der Schmelzkurvenanalyse ersichtlich war (Daten nicht gezeigt). P1, Positivkontrolle 1 (cDNA von kontrollbehandeltem Tumor); P2, Positivkontrolle 2 (cDNA von Sunitinib-behandeltem Tumor); hN, negative Speziesspezifitätskontrolle für menschliche Gene (Mausmilz-cDNA), mN, negative Speziesspezifitätskontrolle für Mausgene (cDNA-Gemisch aus adhären und als *spheres* gewachsenen menschlichen SK-RC-17- und RCC-53-Zelllinien.); W, Negativkontrolle Wasser.

### 4.3 Funktionalitäts- und Spezifitätskontrolle der verwendeten humanspezifischen Primer

Zur Kultivierung und Quantifizierung von Tumorstammzellen wird der *sphere formation assay* angewendet. Unter diesen Kulturbedingungen sind nur Tumorstammzellen in der Lage, *spheres* zu bilden. Gassenmaier *et al.* ließen Tumorzellen aus der RCC-53- und SK-RC-17-Zelllinie für 7 Tage unter adhärennten und *sphere formation assay* Bedingungen wachsen und bestimmten die mRNA-Expression mehrerer Tumorstammzellen-assoziiierter Gene (*CXCR4*, *NANOG*, *SOX2*, *POU5F1*, *MYC*) (Gassenmaier, Chen et al. 2013). Wie erwartet zeigte sich in beiden Zelllinien eine höhere Expression der Tumorstammzellen-assoziierten Gene (*CXCR4*, *NANOG*, *SOX2*, *POU5F1*) mit Ausnahme des *MYC*-Gens in den aus *spheres* stammenden Tumorzellen im Vergleich zu den adhärennt gewachsenen Tumorzellen (Gassenmaier, Chen et al. 2013). Hingegen zeigte sich die mRNA-Expression von *MYC* entweder nicht oder nur leicht erhöht in *spheres* im Vergleich zu adhärennt wachsenden Zellen.

Um zu überprüfen ob unsere humanspezifischen Primerpaare dasselbe nachweisen wie die in dem früheren Projekt verwendeten Primer, die nicht im Hinblick auf Speziespezifität ausgewählt wurden, wiederholten wir das Experiment mit unseren humanspezifischen Primern. Die Tumorstammzellen-assoziierten Gene (*CXCR4*, *NANOG*, *SOX2*, *POU5F1*) zeigten ebenfalls eine höhere Expression in den *spheres* der beiden Zelllinien, verglichen mit den dazugehörigen adhärennten Zellen. Das *MYC*-Gen war ebenfalls entweder weniger oder leicht stärker exprimiert in *spheres* (Abb. 9).

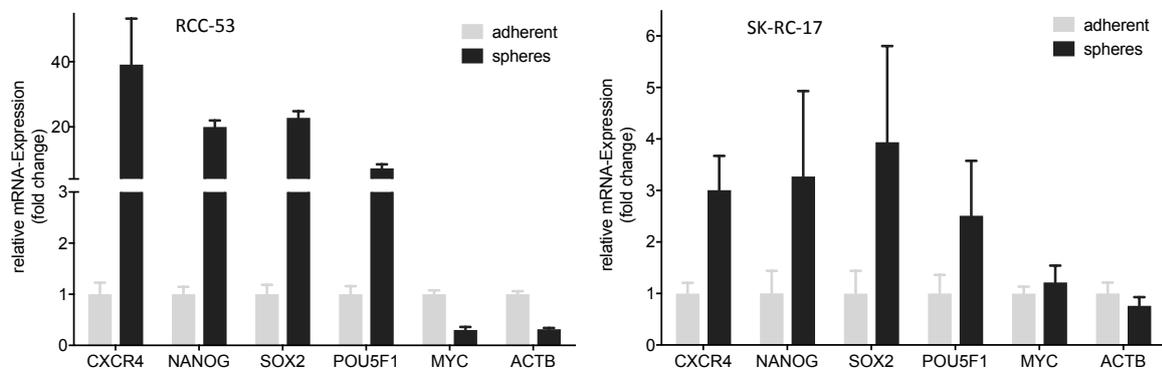


Abbildung 9. **Humanspezifische Primer sind für die Quantifizierung der Expression Tumorstammzellen-assoziiierter Gene geeignet.** Tumorzellen aus der RCC-53- und SK-RC-17-Zelllinie wuchsen für 7 Tage unter adhärennten bzw. *sphere formation assay* Bedingungen. Die Kultivierung der Tumorzellen und die mRNA-Isolierung wurden von Maximilian Gassenmaier, Labor für Tumorummunologie durchgeführt. Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der humanspezifischen Primerpaare wurden CXCR4-, NANOG-, SOX2-, POU5F1- und MYC-mRNA mittels RT-PCR quantifiziert und für den mRNA-Gehalt des Haushaltsgens *ACTB* normalisiert. Das Verhältnis der mRNA-Expression der unter *sphere formation assay* Bedingungen gewachsenen Tumorzellen und der mRNA-Expression der unter adhärennten Bedingungen gewachsenen Tumorzellen ist gezeigt (*fold change*). Die *ACTB*-mRNA-Mengen sind ohne *ACTB*-mRNA-Normalisierung dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Der Mittelwert der Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. RCC-53 adhärennt: n=3, *spheres*: n=2; SK-RC-17 adhärennt: n=3, *spheres*: n=3. n, Anzahl der biologischen Replikate.

#### 4.4 Anreicherung von Tumorstammzellen und Beeinflussung der EMT-Genexpression nach Behandlung mit Sunitinib bei RCC-Xenotransplantaten

Ein Wiederaufflammen vom Tumorwachstum wird bei Nierenzellkarzinom-Patienten nach initialem Ansprechen auf die Standardtherapie z.B. mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib beobachtet. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob Tumorstammzellen durch ihre Fähigkeit die Standardtherapie zu überleben eine Rolle für die Ausbildung dieser Tumorresistenz spielen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden RCC-53- oder SK-RC-17-Tumorzellen in immundefizienten NOD/SCID-Mäusen subkutan injiziert und nachdem die Tumore innerhalb von 10-20 Tagen ein Volumen von ca. 100 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, wurden die Mäuse oral entweder mit Sunitinib oder Zitratpuffer (Kontrolle) einmal täglich für 14 Tage behandelt (Abb. 10A). Die Behandlung mit Sunitinib führte sowohl in den RCC-53-, als auch in den SK-RC-17-Tumoren zu einer deutlichen Hemmung des Tumorwachstums (Abb. 10B). Diese Versuche wurden von Maximilian Gassenmaier im Labor für Tumorummunologie durchgeführt. Anschließend analysierten wir mittels RT-PCR die Expression Tumorstammzellen-assoziiierter Gene (*CXCR4*, *NANOG*, *SOX2*, *POU5F1*, *MYC*) in RCC-53 und SK-RC-17-Xenotransplantattumoren von Sunitinib- und kontrollbehandelten Mäusen. Bei einem selektiven Überlebensvorteil von Tumorstammzellen nach Behandlung mit Sunitinib würden wir eine erhöhte Expression der Tumorstammzellen-assoziierten Gene erwarten. Das konnten wir für *NANOG*, *SOX2*, *POU5F1* bei Tumoren beider Zelllinien und für *CXCR4* und *MYC* für Tumore jeweils nur einer Zelllinie zeigen (Abb. 10C).

Des Weiteren ist der Übergang in Zellen von einem epithelialen in einen mesenchymalen Zustand (*epithelial-mesenchymal transition*; EMT) ein Prozess der in soliden Tumoren beobachtet wird und den Tumorzellen die Fähigkeit zu migrieren und in andere Organe zu metastasieren verleiht. Diese mesenchymalen Eigenschaften werden insbesondere Tumorstammzellen zugeschrieben (Nieto 2013). Um zu überprüfen, ob dieser Prozess durch die Behandlung mit Sunitinib beeinflusst wird, wurde mittels RT-PCR die mRNA-Expression von vier mit der EMT in Beziehung stehenden Genen *CDH1*, *CDH2*, *ZEB1* und *VIM* in RCC-53- und SK-RC-17-Tumoren Sunitinib- und kontrollbehandelter Mäuse untersucht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die mesenchymalen Markergene *CDH2*, *ZEB1* und *VIM* in ihrer Aktivität meist hochreguliert, die des epithelialen Markergens *CDH1* herunterreguliert wird. Es konnte eine Zunahme der *ZEB1*- und *CDH2*-Expression nach Behandlung mit Sunitinib in beiden xenotransplantierten Tumoren gezeigt werden. *VIM*- und *CDH1*-Expression nahm in jeweils nur einem der beiden Tumoren nach Sunitinib-Behandlung zu (Abb. 10D). Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass es durch Sunitinib-Behandlung in xenotransplantierten Tumoren zu einer verstärkten Expression von Tumorstammzellgenen sowie von Genen kommt, die bei EMT aktiviert werden. Dies ist im Einklang mit einer postulierten Anreicherung von Tumorstammzellen möglicherweise aufgrund ihrer höheren Resistenz gegenüber Sunitinib.

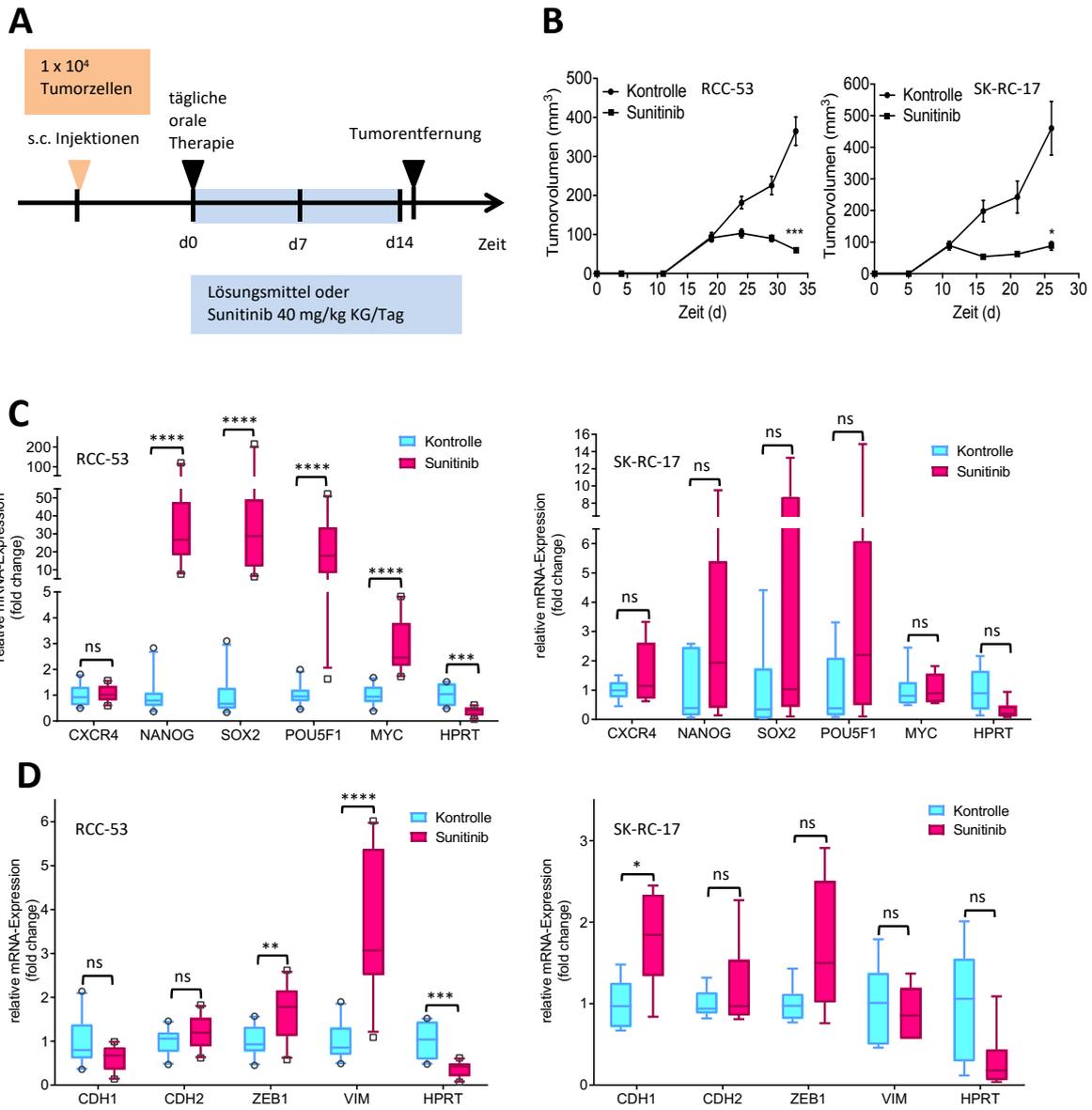


Abbildung 10. Sunitinib-Behandlung führt zu erhöhter Tumorstammzell-Genexpression und beeinflusst die EMT-assoziierte Genexpression in xenotransplantierten RCC-Tumoren. (A) Schematische Darstellung des Behandlungsplans der Xenotransplantat-tragenden Mäuse. Es wurden entweder je  $1 \times 10^4$  RCC-53- oder SK-RC-17-Tumorzellen in die rechten und linken Rückenseite von weiblichen 6-9 Wochen alten NOD/SCID-Mäusen subkutan injiziert. Als die Tumoren ein Volumen von ca.  $100 \text{ mm}^3$  erreicht hatten, wurden die Mäuse in zwei Gruppen mit gleicher Tumorgößenverteilung aufgeteilt und mittels einer Schlundsonde für 14 Tage täglich entweder mit Sunitinib (40 mg/kg Körpergewicht in Zitratpuffer pH 3,5) oder mit dem gleichen Volumen Zitratpuffer pH 3,5 behandelt. Nach 14 Behandlungstagen wurden die Mäuse getötet und die Tumoren entfernt. Zahl der Mäuse, RCC-53: n=10; SK-RC-17: n=6. Die Generierung und Vermessung der Tumore und Behandlung der Mäuse wurden von Maximilian Gassenmeier, Labor für Tumorimmunologie durchgeführt. KG, Körpergewicht; d0, d7, d14, 0,7,14 Tage nach Beginn der Therapie. (B) Durch die Sunitinib-Behandlung kommt es zum Stagnieren des Tumorwachstums. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Die zwei Grafen wurden freundlicherweise von Maximilian Gassenmeier zur Verfügung gestellt (nicht publizierte Daten). (C, D) mRNAs von Tumorstammzellgenen (C) und EMT-Markergenen (D) wurden mit Hilfe von RT-PCR quantifiziert und für den mRNA-Gehalt des Haushaltsgens *HPRT* normalisiert. Das Verhältnis der mRNA-Expression der Tumoren aus Sunitinib-behandelten Mäusen und der mRNA-Expression der Tumoren aus Kontroll-Mäusen ist gezeigt (fold change). Der *HPRT*-mRNA-Gehalt ist ohne *HPRT*-mRNA-Normalisierung gezeigt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und SEM dargestellt. Die untere Begrenzung vom Boxplot markiert den Median vom unteren Quartil, die obere Begrenzung markiert den Median vom oberen Quartil. Der im

Boxplot liegende Strich entspricht dem Median aller Daten. Der Mittelwert der Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Zahl der Tumoren: RCC-53, n=10; SK-RC-17, n=6. n, Anzahl der biologischen Replikate. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde der parameterfreie Mann-Whitney-Test verwendet, wobei p-Werte < 0,05 als signifikant galten. \*\*\*\* p < 0,0001; \*\*\* p < 0,0003; \*\* p = 0,0068; \* p = 0,0260; ns, nicht signifikant.

#### 4.5 Ist die Expression von Tumorstammzell- und EMT-Genen in RCC-53- und SK-RC-17-Zellen verknüpft?

Es konnte gezeigt werden, dass die Tumorstammzellen-assoziierten Gene (*CXCR4*, *NANOG*, *SOX2*, *POU5F1*) in den aus *spheres* stammenden Tumorzellen bevorzugt exprimiert werden (siehe Abschnitt 4.3). Da eine Verbindung zwischen dem EMT- und dem *stemness* Phänotyp der xenotransplantierten Tumorzellen beobachtet werden konnte, war es interessant zu überprüfen wie sich die Expression der mit dem EMT in Beziehung stehenden Genen *CDH1*, *CDH2*, *ZEB1* und *VIM* bei den als *spheres* gewachsenen Zellen im Vergleich zu den als adhären wachsenden Zellen verhält. Die Genexpression von *CDH1* nahm erwartungsgemäß in RCC-53-*Spheres* ab, die von *CDH2*, *ZEB1* und *VIM* zu. In SK-RC-17-*Spheres* war das Bild unklarer und nur kleine EMT-Gen-Expressionsunterschiede konnten beobachtet werden (Abb. 11).

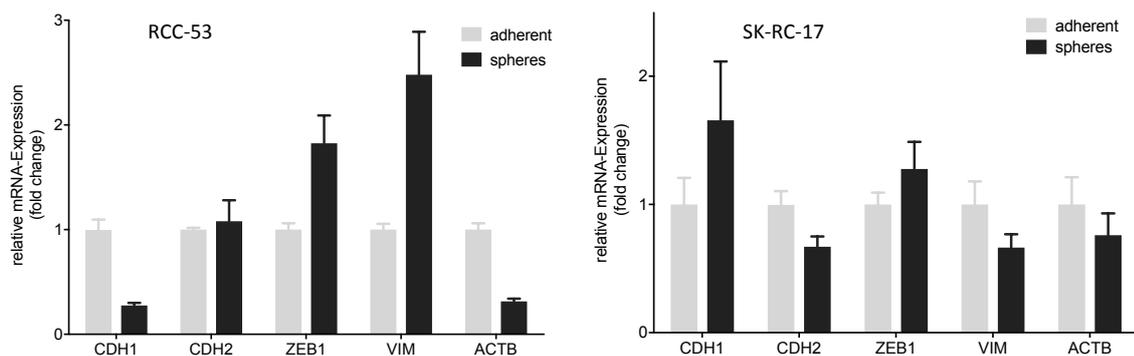


Abbildung 11. **Nur RCC-53-*Spheres* weisen ein erwartetes Expressionsmuster EMT-assoziiierter Genen auf.** Tumorzellen aus der RCC-53- und SK-RC-17-Zelllinie wuchsen für 7 Tage unter adhären und *sphere formation assay* Bedingungen. Die Kultivierung der Tumorzellen und die mRNA-Isolierung wurden von Maximilian Gassenmeier, Labor für Tumorimmunologie durchgeführt. mRNAs wurden mittels RT-PCR quantifiziert und normalisiert für den mRNA-Gehalt des Haushaltsgens *ACTB* der Proben. Das Verhältnis der mRNA-Expression der unter *sphere formation assay* Bedingungen gewachsenen Tumorzellen und der mRNA-Expression der unter adhären Bedingungen gewachsene Tumorzellen ist gezeigt (*fold change*). Die *ACTB*-mRNA-Mengen sind ohne *ACTB*-mRNA-Normalisierung gezeigt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und SEM dargestellt. Der Mittelwert der Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. RCC-53: adhären: n=3, *spheres*: n=2; SK-RC-17: adhären: n=3, *spheres*: n=3, für Vimentin-mRNA in *spheres*: n=2. n, Anzahl der biologischen Replikate.

Zusammen genommen belegt dieses Experiment einen Zusammenhang zwischen der Expression von Stammzell- und EMT-regulierten Genen in RCC-53- nicht jedoch in SK-RC-17-Zellen. Interessanterweise sind die Änderungen in der Expression der EMT-Gene in *spheres* und in Tumoren Sunitinib-behandelter Mäuse sehr ähnlich.

#### **4.6 CXCR4-positive Zellen befinden sich in Sunitinib- und kontrollbehandelten RCC-Xenotransplantaten in Tumoren meist randständig**

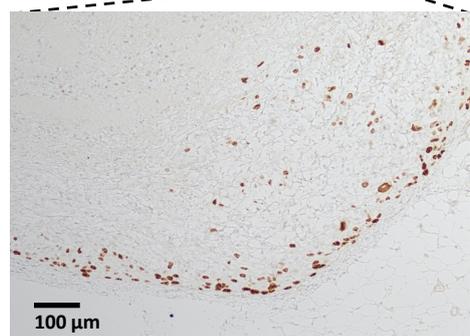
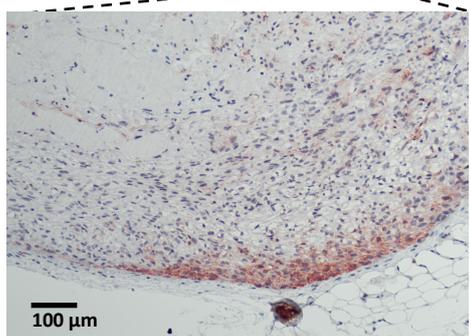
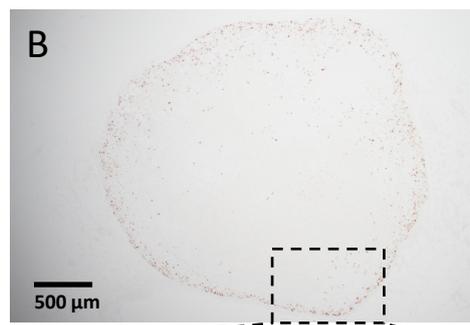
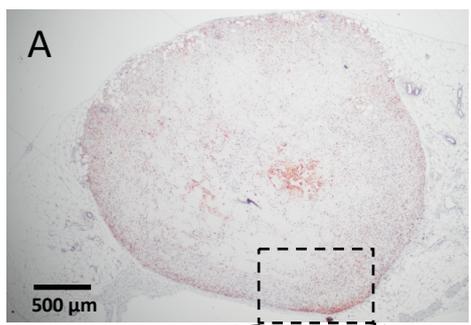
Wir konnten aufgrund der erhöhten Expression von Tumorstammzell- und mesenchymalen EMT-Genen zeigen, dass es nach Behandlung mit Sunitinib möglicherweise zu einer Anreicherung von Tumorstammzellen bei RCC-Xenotransplantaten kommt (siehe Abschnitt 4.4). Dabei zeigten sich *in vivo* auf mRNA-Ebene NANOG, SOX2, POU5F1, als Tumorstammzellmarker nicht aber CXCR4 d.h. CXCR4-Transkripte waren nicht verstärkt in RCC-53- und SK-RC-17-Transplantaten Sunitinib-behandelter Mäuse zu finden. Nichtsdestotrotz wiesen die RCC-Xenotransplantate auf mRNA-Ebene eine hohe *CXCR4*-Expression auf. Die Untersuchung der Expression von diesen Tumorstammzellmarkern auf Proteinebene mittels immunhistologischer Färbungen der RCC-Xenotransplantate sollte diese Diskrepanz klären. Trotz intensiver Suche nach passenden Antikörpern zur Färbung von Tumorstammzellen und in Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut in München gelang uns keine spezifische Färbung mit Antikörpern für die Tumorstammzellmarker NANOG, SOX2, POU5F1 und CD133. Der NANOG-Antikörper färbte keine Tumorzellen, sondern Muskelfasern. Bei der SOX2-Färbung zeigte sich keine Färbung der Tumorzellkerne, sondern eher eine zytoplasmatische Färbung. Der POU5F1-Antikörper zeigte hauptsächlich eine Zytoplasmafärbung der Tumorzellen und nur vereinzelt eine Tumorzellkern-Färbung. Bei den mit CD133-gefärbten Tumoren war fast keine Färbung zu sehen, nur kleine Regionen an Tumorzellen waren gefärbt. Nur für CXCR4 stand uns ein erprobter, wenn auch nicht Spezies-spezifischer Antikörper (der monoklonale anti-CXCR4-Antikörper UMB2 erkennt humanes und murines CXCR4) zur Verfügung (Gassenmaier et al., 2013).

Es erfolgte die immunhistologische Färbung von Tumoren aus Sunitinib-behandelten (Abb. 12A, B) bzw. kontrollbehandelten NOD/SCID-Mäusen (Abb. 12C, D) mit einem anti-CXCR4-Antikörper und in Kooperation mit dem Pathologischen Institut in München mit einem den Proliferationsmarker Ki-67-erkennenden Antikörper. CXCR4-positive Tumorzellen waren sowohl bei den mit Sunitinib- (Abb. 12A) als auch bei den kontrollbehandelten Tumoren bevorzugt am Tumorrand exprimiert (Abb. 12C, vergrößertes Areal 2). Des Weiteren waren Ki-67-positive Zellen bei Tumoren Sunitinib-behandelter Mäuse ebenfalls vor allem am Tumorrand zu finden (Abb. 12B). Demgegenüber zeigten sich Ki-67-positive Tumorzellen bei kontrollbehandelten Tumoren über den ganzen Tumor verteilt (Abb. 12D). Des Weiteren wurden in den kontrollbehandelten Tumoren Kapillarendothelzellen (Pfeile in C, Areal 1) über den ganzen Tumor verteilt durch den CXCR4-Antikörper markiert (Abb. 12C).

Sunitinib

CXCR4

Ki67



Kontrolle

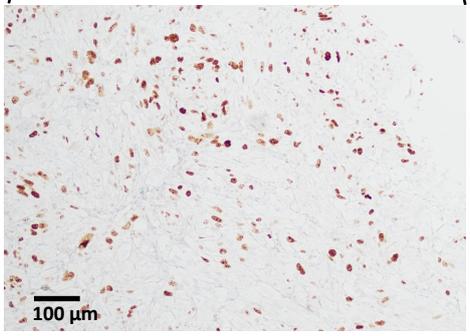
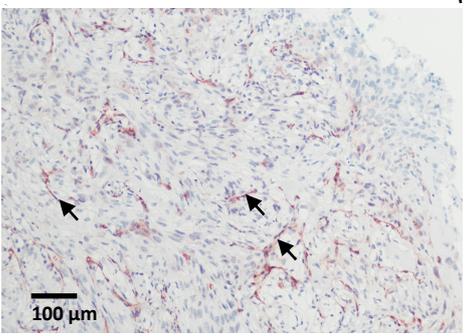
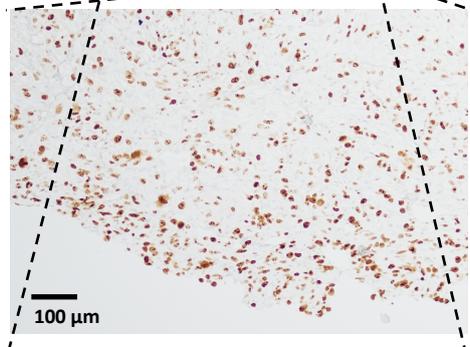
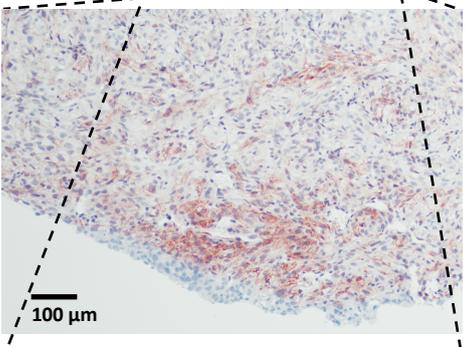
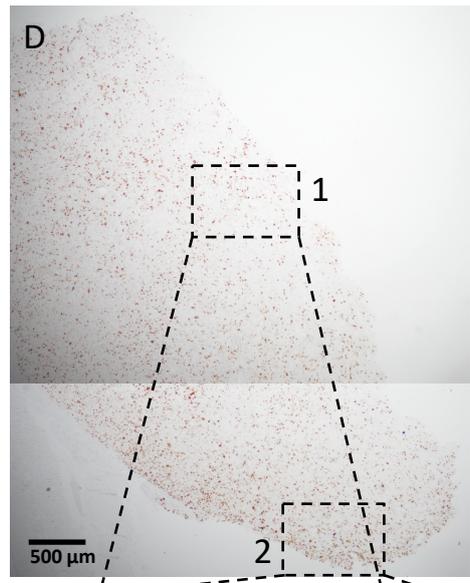
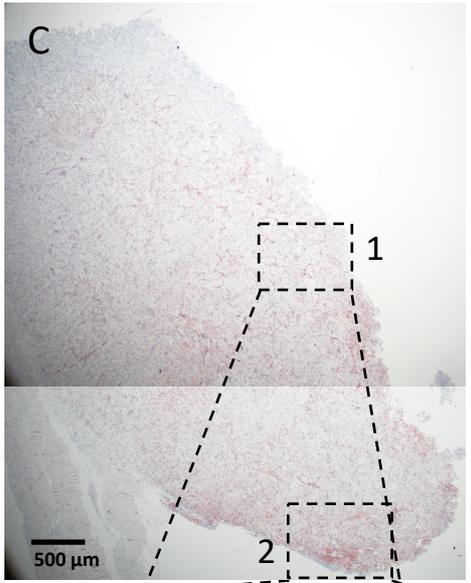


Abbildung 12. **Räumliche Verteilung CXCR4- und Ki-67-positiver Tumorzellen in Sunitinib- und kontrollbehandelten RCC-Xenotransplantaten.** Es wurden entweder je  $1 \times 10^4$  RCC-53- oder SK-RC-17-Tumorzellen in die rechten und linken Rückenseite von weiblichen 6-9 Wochen alten NOD/SCID-Mäusen subkutan injiziert. Als die Tumoren ein Volumen von ca.  $100 \text{ mm}^3$  erreicht hatten, wurden die Mäuse in zwei Gruppen mit gleicher Tumorgößenverteilung aufgeteilt und mittels einer Schlundsonde für 14 Tage täglich entweder mit Sunitinib (40 mg/kg Körpergewicht in Zitratpuffer pH 3,5) oder mit dem gleichen Volumen Zitratpuffer pH 3,5 behandelt. Nach 14 Behandlungstagen wurden die Mäuse getötet und die Tumoren entfernt. Schnitte Paraffin-eingebetteter Tumoren aus Sunitinib- (A, B) bzw. kontrollbehandelten NOD/SCID-Mäusen (C, D) wurden immunhistologisch mittels eines monoklonalen Kaninchen-anti-CXCR4-Antikörpers und eines monoklonalen Maus-anti-Mensch-Ki67-Antikörpers gefärbt. CXCR4-positive Tumorzellen konnten bevorzugt am Rand der Tumoren von sowohl Sunitinib- (A) als auch kontrollbehandelten Mäuse nachgewiesen werden (C, vergrößertes Areal 2). Des Weiteren waren Ki-67-positive Zellen bei Tumoren Sunitinib-behandelter Mäuse ebenfalls vor allem am Tumorrand zu finden (B). Hingegen zeigen sich Ki-67-positive Tumorzellen bei kontrollbehandelten Tumoren über den ganzen Tumor verteilt (D). Weiterhin wurden in den kontrollbehandelten Tumoren Kapillarendothelzellen (Pfeile in C, Areal 1) über den ganzen Tumor verteilt durch den CXCR4-Antikörper markiert (C). Die Färbungen sind repräsentativ für jeweils einen Tumor aus 4 Sunitinib- bzw. 5 kontrollbehandelten Mäusen.

Darüber hinaus färbten wir mittels Immunfluoreszenz einen RCC-53-Tumor einer Sunitinib-behandelten Maus mit dem anti-CXCR4-Antikörper. Die CXCR4-positiven Tumorzellen waren ebenfalls hauptsächlich am Tumorrand lokalisiert (Abb. 13). Die weiter zentral gelegenen Tumoreareale zeigen keine CXCR4-Färbung, enthalten jedoch basierend auf dem Vorhandensein definierter Kernstrukturen (DAPI-Färbung) und von Zytoplasma (F-Aktin-Färbung), vermutlich vitale Zellen. Eine Doppelfärbung mit einem anderen Tumorstammzellmarker gelang uns nicht.

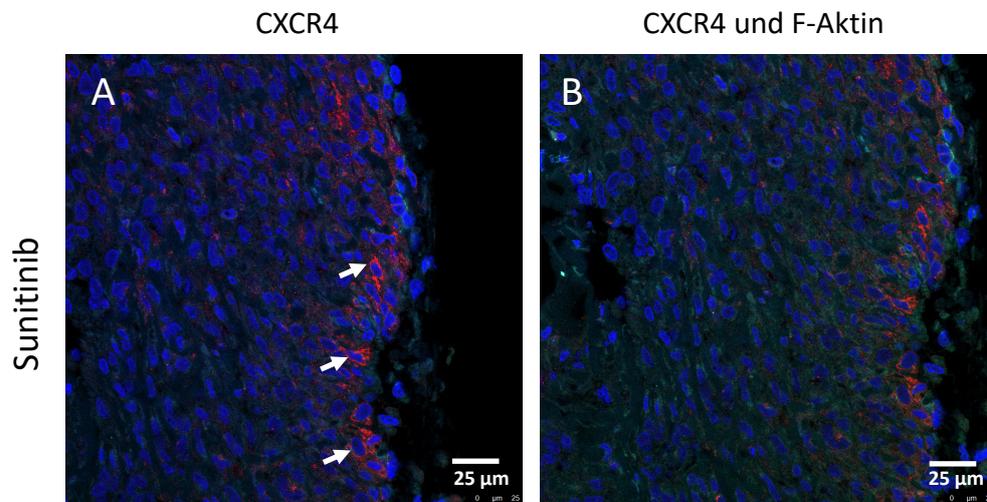


Abbildung 13. **CXCR4-positive Tumorzellen befinden sich bevorzugt in randständigen Tumorearealen bei RCC-Xenotransplantaten nach Behandlung mit Sunitinib.** Es wurden entweder je  $1 \times 10^4$  RCC-53- oder SK-RC-17-Tumorzellen in die rechten und linken Rückenseite von weiblichen 6-9 Wochen alten NOD/SCID-Mäusen subkutan injiziert. Als die Tumoren ein Volumen von ca.  $100 \text{ mm}^3$  erreicht hatten, wurden die Mäuse in zwei Gruppen mit gleicher Tumorgößenverteilung aufgeteilt und mittels einer Schlundsonde für 14 Tage täglich entweder mit Sunitinib (40 mg/kg Körpergewicht in Zitratpuffer pH 3,5) oder mit dem gleichen Volumen Zitratpuffer pH 3,5 behandelt. Nach 14 Behandlungstagen wurden die Mäuse getötet und die Tumoren entfernt (siehe das in dem Abschnitt 4.4 dargestellten Experiment). Paraffinschnitte eines RCC-53-Tumors aus einer Sunitinib-behandelten NOD/SCID-Maus wurden mittels Immunfluoreszenz mit einem monoklonalen Kaninchen-anti-CXCR4-Antikörper (rot) gefärbt (A, B). CXCR4-positive Tumorzellen waren hauptsächlich am Tumorrand zu finden (Pfeile in A). Zusätzlich wurde das Strukturprotein des Zytoskeletts F-Aktin mit dem Fluoreszenzfarbstoff *ActinGreen 488* gefärbt (grün) (B). Die DNA der Zellkerne sind blau durch die Färbung mit DAPI dargestellt.

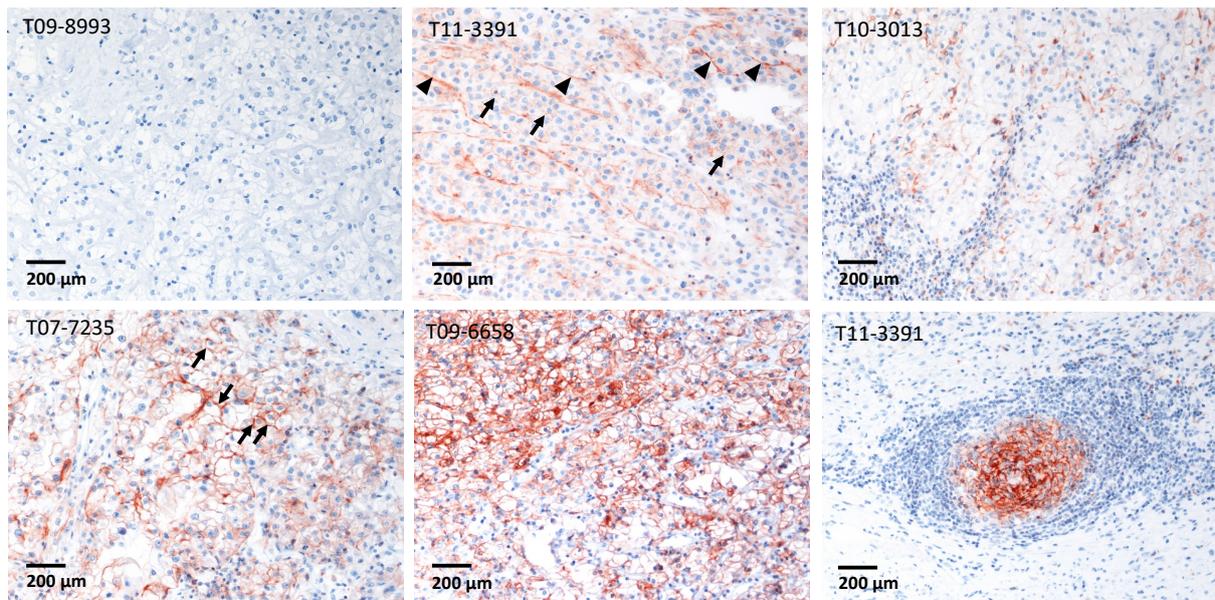
Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass CXCR4-positive Tumorzellen unabhängig von einer Behandlung mit Sunitinib sich vor allem am Rand von Tumoren befinden. Die Frage ob CXCR4 *in vivo* auf Proteinebene ein Tumorstammzellmarker ist konnte nicht geklärt werden, da eine Doppelfärbung mit einem anderen Tumorstammzellmarker nicht möglich war. Des Weiteren führt eine Behandlung mit Sunitinib vermutlich zu einer Abnahme der Proliferationskapazität von Tumoren, da im Gegensatz zu den kontrollbehandelten Tumoren die Ki-67-positive Tumorzellen bei Sunitinib-behandelten RCC-Xenotransplantaten hauptsächlich nur noch am Tumorrand gefunden wurden.

#### **4.7 Eine hohe CXCR4-Proteinexpression im Primärtumor korreliert mit einem besseren Überleben neoadjuvant Sunitinib-behandelter mRCC-Patienten**

CXCR4 zeigte sich auf mRNA-Ebene in Mäusen mit xenotransplantierten RCC-Zellen nicht als Tumorstammzellmarker im Gegensatz zu anderen etablierten Stammzellmarkern wie z.B. NANOG, POU5F1 und SOX2 (siehe Abschnitt 4.4). Diese Aussage erfolgt unter der Annahme, dass RCC-Stammzellen wie *in vitro* (Gassenmaier et al., 2013) auch *in vivo* resistenter gegenüber einer Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib sind und somit angereichert werden. Dabei bleibt allerdings unberücksichtigt, dass es möglicherweise keine strenge Korrelation zwischen CXCR4-mRNA- und CXCR4-Protein-Gehalt gibt. In der Tat konnte Gassenmaier *et al.* mittels Immunhistologie eine nicht quantifizierte Korrelation zwischen der CXCR4-mRNA- und CXCR4-Protein-Gehalt der Primärtumoren RCC-Patienten (n=6) zeigen. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Tumorzahl mit 6 relativ niedrig war. Zur Klärung dieser Fragestellung sind jedoch weitere Experimente mit mehr Tumorproben notwendig.

Um zu überprüfen, ob CXCR4-Protein einen Tumorstammzellmarker darstellt, wurde die CXCR4-Expression auf Proteinebene in RCC-Tumoren neoadjuvant Sunitinib-behandelter metastasierter Patienten immunhistologisch bestimmt und mit dem Überleben der Patienten korreliert. Dabei gingen wir von der Überlegung aus, dass eine extensivere CXCR4-Proteinexpression mit einem größeren Anteil von Tumorstammzellen einhergeht, was wiederum aufgrund der erwarteten erhöhten Aggressivität solcher Tumore (Gassenmaier, Chen et al. 2013; Yue, Zhang et al. 2020) zu einem kürzerem Überleben der Patienten führt.

Die Auswertung der CXCR4-Färbung erfolgte unter Einbeziehung der Färbeintensität (Kategorie A) und des prozentualen Anteils CXCR4-positiver Tumorzellen (Kategorie B). Die Färbeintensität wurde mit 0 bis 3 Punkten (0 - keine Färbung, 1 - schwache Färbung, 2 - mäßige Färbung, 3 - starke Färbung), der Anteil positiver Tumorzellen mit 0 bis 4 Punkten (0 - keine, 1 - 0 bis 10 %, 2 - 10 bis 50 %, 3 - 50 bis 80 %, 4 - über 80 % positive Tumorzellen) gewertet. Die Summe beider Zahlen ergab den CXCR4-immunohistochemischen Score. Im Folgenden wird anhand von mehreren Beispielen die Färbeintensität und -ausmaß mit dem CXCR4-Antikörper von RCC-Zellen (mit Positivkontrolle) für die Bestimmung des Färbescores näher definiert.

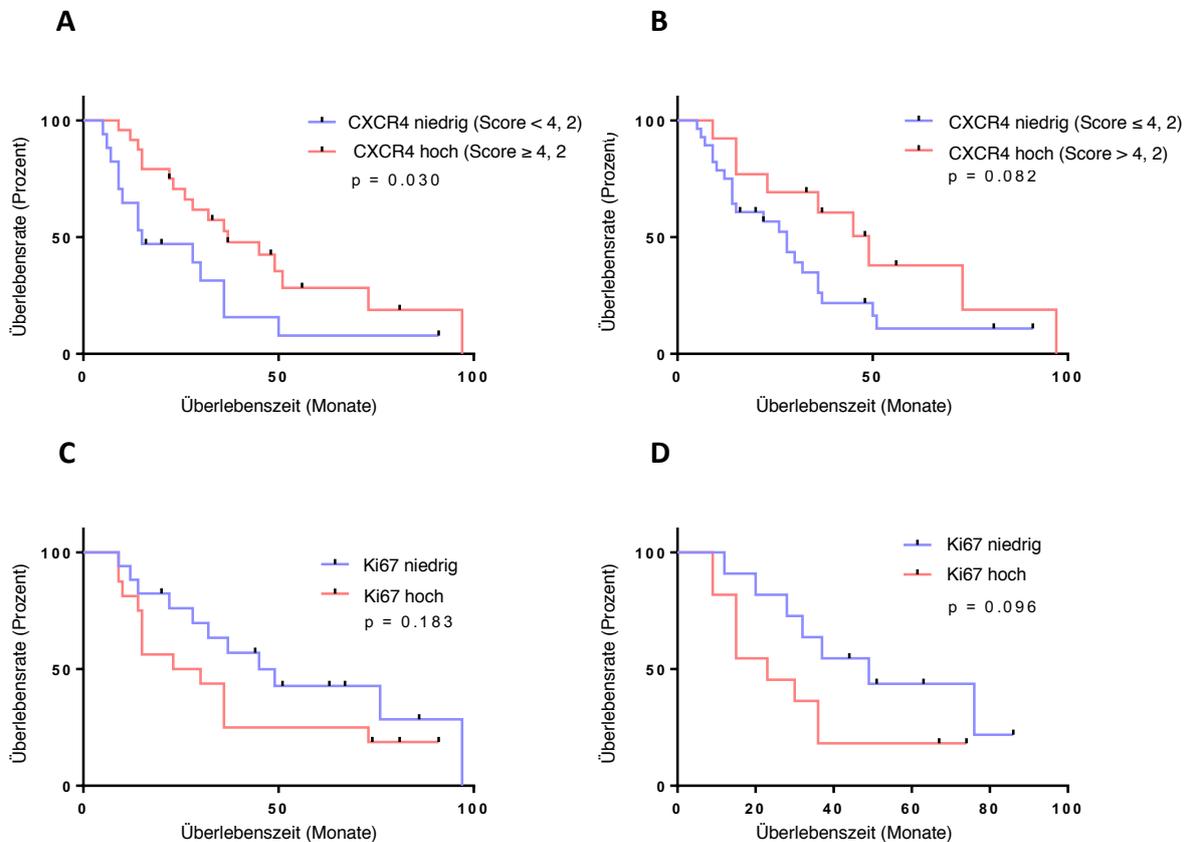


Färbeintensität (Kategorie A)	Prozentualer Anteil positiver Tumorzellen (Kategorie B)	CXCR4-immunhistochemischer Score
keine Färbung: 0 Punkte	keine positive Tumorzellen: 0 Punkte	Punkte Färbeintensität + Punkte prozentualer Anteil positiver Tumorzellen (0 – 7 Punkte)
schwache Färbung: 1 Punkt	0 bis 10 % positive Tumorzellen: 1 Punkt	
mäßige Färbung: 2 Punkte	10 bis 50 % positive Tumorzellen: 2 Punkte	
starke Färbung: 3 Punkte	50 bis 80 % positive Tumorzellen: 3 Punkte	
	über 80 % positive Tumorzellen: 4 Punkte	

Abbildung 14. **Definition der CXCR4-Färbeintensität und Ausmaß der Färbung in Sunitinib-behandelten mRCC-Gewebeschnitten.** Dargestellt sind repräsentativ immunhistologische Färbungen mit dem monoklonalen Kaninchen-anti-CXCR4-Antikörper von Gewebeschnitten Paraffin-eingebetteter Tumoren aus neoadjuvant Sunitinib-behandelten mRCC Patienten. Der Tumor T09-8993 ist ein Beispiel für einen Tumor mit keinen CXCR4-positiven Tumorzellen. Hingegen zeigte der Tumor T11-3391 eine schwache meist membranständige CXCR4-Färbung der Tumorzellen (mit Pfeilen markiert), sowie eine Färbung der Kapilarendothelzellen (Pfeilköpfe). Eine mäßige Färbung ist am Beispiel vom Tumor T10-3013 dargestellt. Des Weiteren wiesen die Tumoren T07-7235 und T09-6658 eine starke Färbung auf. Als Positivkontrolle diente die Färbung vom Keimzentrum der Sekundärlymphfollikel (am Beispiel vom Tumor T11-3391 dargestellt). Es ist bekannt, das B-Zellen in Keimzentren CXCR4 exprimieren (Caron, Le Gallou et al. 2009).

Für die immunhistologische Färbungen wurden Gewebeschnitte von Tumoren von jeweils 19 neoadjuvant Sunitinib-behandelten mRCC-Patienten (1. Serie) aus der N06SUN Studie (Powles, Kayani et al. 2011) und von 22 neoadjuvant Sunitinib-behandelten (2. Serie) aus der SURTIME Studie (Bex, Mulders et al. 2018) von Prof. Dr. Axel Bex, Department of Urology, National Cancer Institute, Amsterdam, Netherlands verwendet. Die Einschluss- und Ausschlusskriterien dieser beiden Studien sind im Anhang aufgeführt. Für die Auswertung der Überlebenszeiten abhängig von der CXCR4-Expression wurden Kaplan-Meier-Analysen verwendet. Dabei diente der Median des CXCR4-Färbescores von Tumorzellen als *cut-off*, um die Tumore in hoch bzw. niedrig CXCR4-exprimierend zu unterteilen. Es wurden zwei Varianten gerechnet: einmal wurden Proben mit dem Score des Medianwertes zur Gruppe der hohen (Abb. 15A), einmal zur Gruppe der niedrigen CXCR4-Positivitätsgruppe (Abb. 15B) geschlagen. Bei beiden Varianten korrelierte eine hohe CXCR4-Expression im Primärtumor mit einem besseren tumorspezifischen Überleben. Die statistische Signifikanz war höher in der Gruppe, in der die Proben mit dem Score des Medianwertes zur Gruppe der hohen

CXCR4-Positivitätsgruppe gerechnet wurde ( $p=0,030$ ) im Vergleich zur Gruppe wo sie zur niedrigen CXCR4-Positivitätsgruppe ( $p= 0,082$ ) gerechnet wurden. Das könnte dadurch erklärt werden, dass CXCR4 bei mRCC kein Tumorstammzellmarker, sondern ein Hypoxiemarker ist, was auch zur antiangiogenen Sunitinib-Behandlung passen würde.



**Abbildung 15. Patienten mit einem hohen CXCR4- und niedrigen Ki67-Anteil positiver Tumorzellen nach Sunitinib-Behandlung haben eine bessere Prognose.** Das tumorspezifische Überleben von neoadjuvant Sunitinib-behandelten mRCC-Patienten in Abhängigkeit von CXCR4- und Ki67-Expression der Primärtumoren wurde berechnet. Für die immunhistologische Färbungen wurden Gewebeschnitte von Tumoren von jeweils 19 neoadjuvant Sunitinib-behandelten Patienten (Serie 1) aus der N06SUN Studie (Powles, Kayani et al. 2011) und 22 Patienten (Serie 2) aus der SURTIME Studie (Bex, Mulders et al. 2018) verwendet. Als *cut-off* für die Gruppeneinteilung der Patienten mit hohem bzw. niedrigem CXCR4-Färbescore wurde der Median der in unabhängigen Experimenten für Serie 1 und Serie 2 der bestimmten CXCR4-Färbescores errechnet: die Gewebeprobe der Serie 1 und Serie 2 haben einen unterschiedlichen *cut-off*-Wert von A (Intensität) + B (Ausmaß) CXCR4-Score = 4 (Serie 1) bzw. 2 (Serie 2) ergeben. Es wurden zwei Auswertungen durchgeführt: einmal wurden Patienten mit genau dem *cut-off*-Score zur hohen (A), einmal zur niedrigen (B) CXCR4-Positivitätsgruppe gerechnet. Die Überlebensdaten der Patienten der Serie 1 und Serie 2 in Abhängigkeit vom CXCR4-Färbescore wurden zusammen in einem Graphen ausgewertet. Die Ki67-Färbung erfolgte in Kooperation mit dem Pathologischen Institut, LMU München. Die Auszählung Ki-67-positiver Zellen ergab ebenfalls unterschiedliche *cut-off*-Werte (Proben Serie 1: 10,4 und Serie 2: 12,0 [Median der Mittelwerte von Ki67-positiven Tumorzellen pro 10x10-Auszählraster bei 20x Objektiv-Vergrößerung]). Es wurden je nach der Häufigkeit der Ki67-positiven Zellen zwischen 12-69 Raster ausgezählt. Die Überlebensdaten der Patienten der Serie 1 und Serie 2 wurden zusammen in einem Graphen ausgewertet. Es wurden nicht alle Gewebeprobe der Serie 1 aufgrund einer zum Teil zu schwachen Ki67-Färbung verwendet (C). Die Überlebensdaten der Patienten ausschließlich aus Serie 2 wurden ausgewertet (D). Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde der Log-rank Test (Mantel-Cox) verwendet.

Im Abschnitt 4.6 beobachteten wir, dass eine Behandlung mit Sunitinib zu einer Abnahme der Proliferationskapazität der Tumorzellen führte. Dies wurde sichtbar anhand der Reduktion der Anzahl von Ki-67-positiven Zellen in den RCC-Xenotransplantaten. Aus diesem Grund war es interessant, die prognostische Bedeutung der Expression des Proliferationsmarkers Ki67 in den Tumoren der Studienpatienten zu überprüfen. Die immunhistologische Ki-67-Färbung der oben angeführten Gewebeproben erfolgte in Kooperation mit dem Pathologischen Institut, LMU München. Für die Analyse der Überlebenszeitdaten abhängig von der *Ki67*-Expression wurde das Kaplan-Meier-Verfahren und als cut-off der Median der Mittelwerte der Häufigkeit der Ki-67-positiven Tumorzellen verwendet. Es zeigte sich, dass mRCC-Patienten mit hohem Ki-67-positiven Tumorzellanteil nach Sunitinib-Behandlung tendenziell eine schlechtere Prognose haben (Abb. 15C,D).

## 5 DISKUSSION

Die Entwicklung von Resistenzen nach anfänglichem Ansprechen auf die Therapie ist von hoher klinischer Relevanz beim Nierenzellkarzinom. Vermutlich spielen Tumorstammzellen aufgrund ihrer Fähigkeit, den derzeitigen Therapien besser zu widerstehen, eine wichtige Rolle bei diesem Prozess. In diesem Zusammenhang ist ein besseres Verständnis der molekularen Resistenzmechanismen erforderlich, um die derzeitigen Behandlungsbeschränkungen zu bewältigen und neue Strategien entwickeln zu können. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob es durch die Behandlung mit Rezeptortyrosinkinase-Hemmern am Beispiel von Sunitinib *in vivo* zu einer Anreicherung von Tumorstammzellen kommt, die eine Rolle in der Therapieresistenzentwicklung spielen könnten. Die Hypothese lautete daher: die Behandlung mit Sunitinib führt zu einer Anreicherung von therapieresistenten Tumorstammzellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom.

Zur Überprüfung dieser Annahme untersuchten wir mittels RT-PCR die globale Expression Tumorstammzellen-assoziiierter Gene (*CXCR4*, *NANOG*, *SOX2*, *POU5F1* (*OCT4*)) in Xenotransplantattumoren RCC-53 und SK-RC-17 Sunitinib- bzw. kontrollbehandelter Mäuse. Des Weiteren wurde die Expression des Onkogens *MYC*, das durch Förderung einer unkontrollierten Proliferation eine wichtige Rolle beim klarzelligen Nierenzellkarzinom spielt, analysiert (Tang, Chang et al. 2009). Es konnte ein Anstieg der *NANOG*-, *SOX2*- und *POU5F1*-mRNA-Expression nach der Behandlung mit Sunitinib bei beiden Tumoren und der *CXCR4*- und *MYC*-mRNA-Expression nur in jeweils einem der Tumorentitäten gezeigt werden (nur für *MYC*-mRNA signifikant). Diese Daten weisen darauf hin, dass es durch die Behandlung mit Sunitinib zu einem selektiven Überlebensvorteil von Tumorstammzellen kommt. Diese Befunde stehen im Einklang mit Ergebnissen von Gassenmaier *et al.*, die für die Zelllinien RCC-53 und SK-RC-17 ebenfalls *in vitro* eine erhöhte Expression dieser Tumorstammzellen-assoziierten Genen in Tumorzellen aus dissoziierten *tumor spheres* im Vergleich zu adhärent gewachsenen Tumorzellen zeigten (Gassenmaier, Chen et al. 2013). *Tumor spheres* sind für ihren erhöhten Gehalt an Tumorstammzellen bekannt (Gassenmaier, Chen et al. 2013; Chen, Ingram et al. 2016).

Die Expression von Tumorstammzellgenen geht oft mit der Expression von EMT-Genen einher, die typisch für den mesenchymalen Zustand und mit der Neigung zur Metastasierung assoziiert ist. Um dies zu klären, untersuchten wir die mRNA-Expression von vier mit der EMT in Beziehung stehenden Genen *CDH1*, *CDH2*, *ZEB1* und *VIM* (Landolt, Eikrem et al. 2017; Pal, Bhattacharya et al. 2018) in RCC-53- und SK-RC-17-Tumoren Sunitinib- und kontrollbehandelter Mäuse. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die mesenchymalen Markergene *CDH2*, *ZEB1* und *VIM* in ihrer Aktivität meist hochreguliert, die des epithelialen Markergens *CDH1* herunterreguliert wird (Landolt, Eikrem et al. 2017; Pal, Bhattacharya et al. 2018). Es konnte eine Zunahme der *ZEB1*- und *CDH2*-Expression nach Behandlung mit Sunitinib in beiden xenotransplantierten Tumoren gezeigt werden. *VIM*- und *CDH1*-Expression nahm in jeweils nur einem der beiden Tumoren nach Sunitinib-Behandlung zu. Das konnten wir auch für die RCC-53-Zelllinie bei den als *spheres* gewachsenen Zellen im Vergleich zu den adhärent gewachsenen Zellen zeigen. Die Genexpression von *CDH1* nahm erwartungsgemäß in RCC-53-*Spheres* ab, die von *CDH2*,

*ZEB1* und *VIM* zu. In SK-RC-17-Spheres war das Bild unklarer und nur kleine nichtsignifikante EMT-Gen-Expressionsunterschiede konnten beobachtet werden. Interessanterweise sind die Änderungen in der EMT-Genexpression in *spheres* und in Tumoren Sunitinib-behandelter Mäuse für beide Zelllinien sehr ähnlich. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass es durch Sunitinib-Behandlung in xenotransplantierten Tumoren, sowie in RCC-53- und SK-RC-17-Zellen zu einer verstärkten Expression von Tumorstammzellgenen sowie von Genen kommt, die bei EMT aktiviert werden. Dies ist im Einklang mit einer postulierten Anreicherung von Tumorstammzellen aufgrund ihrer höheren Resistenz gegenüber Sunitinib (Gassenmaier, Chen et al. 2013).

Unter der Prämisse, dass Sunitinib-Behandlung von Tumor-tragenden Mäusen in der Tat zu einer Anreicherung von Tumorstammzellen führt, folgt, dass auf mRNA-Ebene NANOG, SOX2, POU5F1, nicht aber CXCR4 als Tumorstammzellmarker fungieren. CXCR4-Transkripte waren dagegen (obwohl deutlich exprimiert) nicht verstärkt in RCC-53- und SK-RC-17-Transplantaten Sunitinib-behandelter Mäuse zu finden. Dies war ein nicht erwarteter Befund, da Gassenmaier et al. für die Zelllinie RCC-53 und SK-RC-17 eine CXCR4<sup>+</sup>-Subpopulation identifizierten, die in der Lage war, mehr *spheres* und signifikant schneller Tumore in NOD/SCID-Mäusen im Vergleich zu den CXCR4<sup>-</sup>-Zellen zu bilden und somit als tumorinitiierende Zellen anzusehen waren. Das war ein starker Hinweis, dass CXCR4 Tumorstammzellen in RCC-Spheres markiert (Gassenmaier, Chen et al. 2013). Auch eine andere Forschungsgruppe konnte für die Nierenzellkarzinom-Zelllinien Caki-1 und 786-O zeigen, dass Wachstum als *spheres* verglichen mit adhärentem Wachstum, zur Expansion von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften, die den CXCR4-Oberflächenmarker trugen, sowie dessen Liganden *SDF1* exprimierten, kam (Micucci, Maticchione et al. 2015). Die Hemmung des CXCR4-Signalweges durch den CXCR4-Hemmer AMD3100 verringerte, wie bei RCC-53- und SK-RC-17, die Bildung von *spheres*. Es waren im Vergleich zu adhärent gewachsenen Zellen ebenfalls weniger aus *spheres* stammenden Zellen notwendig, um Tumore in NOD/SCID-Mäusen zu bilden, was für einen höheren Anteil an Tumorstammzellen in letzteren spricht (Gassenmaier, Chen et al. 2013; Micucci, Maticchione et al. 2015).

In zwei Studien, in denen Primärtumore von 240 bzw. 113 RCC-Patienten für CXCR4 immunhistologisch gefärbt wurden, korrelierte eine hohe CXCR4-Expression mit einem fortgeschritteneren Tumorstadium (D'Alterio, Cindolo et al. 2010), sowie mit dem Grad der Dedifferenzierung (Wehler, Graf et al. 2008). Das konnte auch in einer aktuellen Studie zusätzlich für das papilläre Nierenzellkarzinom belegt werden (Rasti, Abolhasani et al. 2017). Auch bei anderen Tumorentitäten wie zum Beispiel beim Endometriumkarzinom, kolorektalen Karzinom, Mammakarzinom, oralen Plattenepithelkarzinom, Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und Pankreaskarzinom scheint CXCR4 eine große Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung zu spielen. Diese Tumore metastasieren bevorzugt in SDF1-exprimierenden Organen (Hermann, Huber et al. 2007; Suer, Karatas et al. 2014; Mukherjee, Manna et al. 2016; Wu, Cao et al. 2016; Sun, Yoshida et al. 2017; Yue, Zhang et al. 2020). Zusammengefasst spricht dies ebenfalls dafür, dass CXCR4 einen Marker für das Tumorstammzellwachstum-vorantreibende Zellen, also Tumorstammzellen, darstellt.

Da die Expression von *CXCR4* auf mRNA-Ebene nach Sunitinib-Behandlung wider Erwarten nicht wie die anderer Tumorstammzellgene erhöht war, sollte auf Proteinebene mittels

immunhistologischer Färbungen geklärt werden, welche Zellen in welchem Ausmaß CXCR4 in Xenotransplantattumoren exprimieren. CXCR4-positive Tumorzellen waren sowohl bei den mit Sunitinib- als auch bei den kontrollbehandelten Tumoren bevorzugt am Tumorrand exprimiert. Dies konnten wir mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz beobachten. Interessanterweise waren Proliferationsmarker Ki-67-positive Zellen bei Tumoren Sunitinib-behandelter Mäuse ebenfalls vor allem am Tumorrand zu finden. Demgegenüber waren bei kontrollbehandelten Tumoren Ki-67-positive Tumorzellen und CXCR4-positive Kapillarendothelzellen, vermutlich murinen Ursprungs (der von uns verwendete CXCR4-Antikörper erkennt humanes und murines CXCR4), über den ganzen Tumor verteilt. Es ist bekannt, dass CXCR4 von Tumorendothelzellen exprimiert wird (Xu, Liang et al. 2017; Salazar and Zabel 2019). Möglicherweise ist CXCR4-Expression auch in diesen Zellen mit einer tumorfördernden Wirkung verknüpft: CXCR4-positive Tumorendothelzellen weisen Tip-Zell-Eigenschaften auf, fördern die Gefäßausprossung und erhöhen das Therapieansprechen auf Sorafenib beim hepatozellulären Karzinom (Xu, Liang et al. 2017). Zusammenfassend legen unsere Ergebnisse nahe, dass CXCR4 Tumorzellen am Rand von Nierenzellkarzinomen markiert, sowie Tumorendothelzellen. Es konnte für mehrere Tumore gezeigt werden, dass sich migrierende Tumorstammzellen bevorzugt in den invasiven Wachstumszonen am Tumorrand befinden (Hermann, Huber et al. 2007; Liu, Cong et al. 2014; Prager, Xie et al. 2019). In einer Studie über Pankreaskarzinome waren migrierende CD133<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>-Tumorstammzellen im Vergleich zu CD133<sup>+</sup>/CXCR4<sup>-</sup>-Tumorstammzellen vor allem am Tumorrand zu finden und zeigten sich abhängig von der CXCR4/SDF1-Signalkaskade *in vitro* und *in vivo* unentbehrlich für die Tumormetastasierung (Hermann, Huber et al. 2007). Im Rahmen dieser Doktorarbeit misslang eine Doppelfärbung mit einem anderen Tumorstammzellmarker wie SOX2, POU5F1, NANOG und CD133. Diese wurde durchgeführt um die Identifizierung von Tumorstammzellen zu erhärten. Aufgrund der Lokalisation der CXCR4<sup>+</sup>-Tumorzellen am Tumorrand lässt sich jedoch vermuten, dass CXCR4 am invasiven Wachstum beteiligte Tumorstammzellen markiert. Dennoch werden weitere Analysen benötigt, um diese Beobachtung zu erhärten. Eine Färbung mit einer Reihe unterschiedlicher Antikörper gegen verschiedene Stammzellfaktoren wie SOX2, NANOG und POU5F1 wäre notwendig, um zu untersuchen, ob die CXCR4-positiven Tumorzellen eine Kolo-kalisation dieser Marker zeigen. Eine Färbung mit epithelialen und mesenchymalen Markern wäre auch interessant, um zu klären, ob CXCR4-positive Tumorzellen migrierende Eigenschaften aufweisen. Viele Studien legen nahe, dass Tumorstammzellen keine homogene Population Tumor-initiiierender Zellen repräsentieren, sondern vielmehr in zwei Gruppen unterteilt werden können: in stationäre und in migrierende Tumorstammzellen (Hermann, Huber et al. 2007; Liu, Cong et al. 2014). Die stationären Tumorstammzellen sind im Tumorrinneren bevorzugt lokalisiert, können nicht migrieren und haben epithelähnliche Eigenschaften (Hermann, Huber et al. 2007; Liu, Cong et al. 2014). Hingegen befinden sich migrierende Tumorstammzellen hauptsächlich in der invasiven Front am Tumorrand, verfügen über invasive Kapazität und weisen mesenchymale Eigenschaften auf (Hermann, Huber et al. 2007; Liu, Cong et al. 2014). Aufgrund der zellulären Plastizität, die es Tumorstammzellen ermöglicht, zwischen epithelalem und mesenchymalem Zustand zu wechseln, ist es denkbar, dass sich diese Tumorstammzelltypen ineinander umwandeln können (Liu, Cong et al. 2014) und so die Tumormetastasierung fördern.

Auf der anderen Seite führt eine Behandlung mit Sunitinib nicht zuletzt aufgrund seiner antiangiogenen Wirkung zu einer Abnahme der Proliferationskapazität von Tumoren. Dies

könnte unsere Beobachtung erklären, dass im Gegensatz zu den kontrollbehandelten Tumoren Ki-67-positiven Tumorzellen bei Sunitinib-behandelten RCC-Xenotransplantaten hauptsächlich nur noch am Tumorrand gefunden wurden nicht aber in nekrotischen Bereichen im Tumorinneren. In diesem Zusammenhang sind Befunde von Varna *et al.* interessant, die zeigten, dass CD133/CXCR4-koexprimierende Zellen in Primärtumoren von mRCC-Patienten bevorzugt in perinekrotischen und weniger in perivaskulären Bereichen zu finden sind und ihre Anzahl sich durch Sunitinib-induzierte Hypoxie erhöhte. Darüber hinaus war HIF1 $\alpha$ , ein Hypoxiemarker, in 95% der CD133/CXCR4-Zellen koexprimiert (Varna, Gapihan et al. 2015). Das ist im Einklang mit der Untersuchung von Huang *et al.*, die herausgefunden haben, dass Sunitinib seine Tumorwachstum-inhibierende Wirkung hauptsächlich durch die Hypoxie-bedingte Tumornekrose ausübt (Huang, Ding et al. 2010). Die bevorzugte perinekrotische Lokalisation CD133/CXCR4-positiver Zellen konnte in sechs aus mRCC erstellten Xenotransplantaten reproduziert werden und korrelierte mit dem Ausmaß an Tumornekrose unabhängig davon ob die Ursache für die Nekrose spontan oder therapieinduziert war (Varna, Gapihan et al. 2015). Aus den Ergebnissen dieser Forschungsgruppe lässt sich ableiten, dass CD133/CXCR4-positive Zellen Hypoxie beim Nierenzellkarzinom anzeigen. Daher kann nicht abschließend entschieden werden, ob die Anwesenheit CXCR4<sup>+</sup>-Zellen durch Hypoxieinduktion des *CXCR4*-Gens oder durch ein selektives Überleben CXCR4<sup>+</sup>-Tumorstammzellen bedingt ist.

Unter der Annahme, dass CXCR4 Tumorstammzellen beim menschlichen Nierenzellkarzinom markiert, wurde die *CXCR4*-Expression auf Proteinebene in RCC-Tumoren neoadjuvant Sunitinib-behandelter metastasierter Patienten immunhistologisch bestimmt und mit dem Überleben der Patienten korreliert. Dabei gingen wir von der Überlegung aus, dass eine intensivere CXCR4-Proteinexpression mit einem größeren Anteil von Tumorstammzellen einhergeht, was wiederum aufgrund der erwarteten erhöhten Aggressivität solcher Tumore (Gassenmaier, Chen et al. 2013; Yue, Zhang et al. 2020) zu einem kürzeren Überleben der Patienten führt. So korrelierte in einer Metaanalyse von 25 Studien mit insgesamt 2673 Nierenzellkarzinom-Patienten eine hohe *CXCR4*-Expression mit einem schlechteren Gesamtüberleben, tumorspezifischen Überleben und krankheitsfreien Überleben (Cheng, Yang et al. 2016). Dies konnten wir in dieser Arbeit für neoadjuvant Sunitinib-behandelten mRCC-Patienten nicht bestätigen. Im Gegenteil korrelierte eine hohe CXCR4-Expression auf Proteinebene (hoher CXCR4 score) im Primärtumor mit einem besseren Überleben neoadjuvant Sunitinib-behandelter mRCC-Patienten. Das könnte dadurch erklärt werden, dass CXCR4 beim mRCC nach Sunitinib-Behandlung neben der Eigenschaft Tumorstammzellen zu identifizieren, auch ein Hypoxiemarker ist und neben Stammzellen vor allem Hypoxie-geschädigte Tumorzellen nachweist und somit eine erfolgreiche antiangiogene Therapie anzeigt. Falls diese Interpretation zutrifft, sollte die Expression von Ki-67 umgekehrt mit dem Überleben der Patienten korrelieren, da ein höherer Anteil von Ki-67-positiven Tumorzellen eine eingeschränkte Wirkung der antiangiogenen Therapie signalisiert. Es zeigte sich in der Tat, dass mRCC-Patienten mit hohem Ki-67-positiven Tumorzellanteil nach Sunitinib-Behandlung tendenziell eine schlechtere Prognose haben (Abb. 15C,D). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, die zum großen Teil dieselbe Patientenprobe analysierte, wo es ebenfalls ein hoher Anteil an Ki-67-positiven Tumorzellen im Primärtumor von neoadjuvant Sunitinib- bzw. Pazopanib-behandelten mRCC-Patienten mit einer schlechteren Prognose assoziiert war (Sharpe, Stewart et al. 2013). Belegt wird diese Interpretation durch Befunde anderer

Gruppen, die für das Nierenzellkarzinom, das Kolonkarzinom und das Lungenkarzinom zeigen konnten, dass *CXCR4* durch Hypoxie induziert wird (Staller, Sulitkova et al. 2003; Romain, Hachet-Haas et al. 2014; Kang, Choi et al. 2019). Wie in der Einführung schon erwähnt (Abschnitt 1.1.1), enthalten die meisten klarzelligen Nierenzellkarzinome somatische und epigenetische Veränderungen in dem Von-Hippel-Lindau-Gen, welches *HIF1A* (kodiert HIF1 $\alpha$ ) reguliert (Motzer, Hutson et al. 2007). Durch die Mutation des Gens oder unter hypoxischen Bedingungen häuft sich der Transkriptionsfaktor HIF1 $\alpha$  an. Dieser wiederum fördert die Transkription von Genen, die den Sauerstofftransport, die zelluläre Anpassung an Sauerstoffmangel und die Angiogenese erleichtern (Gossage, Eisen et al. 2015; Schodel, Grampp et al. 2016). Unter anderem führt der Funktionsverlust vom Von-Hippel-Lindau-Gen zu einer Überexpression von *CXCR4*, das einen HIF1 $\alpha$ -bindenden *enhancer* besitzt (Staller, Sulitkova et al. 2003). In einer kürzlich publizierten Studie konnte gezeigt werden, dass unter hypoxischen Bedingungen es zu einer Erhöhung der *CXCR4*-Expression über eine Demethylierung in dessen Promotor-Region kommt, was zur Erlangung von EMT- und Stammzeleigenschaften führt (Kang, Choi et al. 2019). Zu einer Steigerung der *CXCR4*-Expression kam es unter Hypoxie in vier Lungenkarzinom-Zelllinien unterschiedlicher Aggressivität, einschließlich einer normalen Lungenzelllinie (Kang, Choi et al. 2019). Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass der stimulierende Effekt der Hypoxie auf die *CXCR4*-Expression unabhängig von der Aggressivität der Tumorzelllinien auftritt, und normale Zelllinien einschließt (Kang, Choi et al. 2019). Eine Verknüpfung von Hypoxie, *CXCR4*-Expression und Tumor-Stammzeleigenschaften konnten Micucci *et al.* ebenfalls zeigen. Sie fanden, dass *spheres*, generiert aus den RCC-Zelllinien Caki-1 und 786-O, das funktionell mit *HIF1A* verwandte *HIF2A* und *VEGF* hoch exprimieren. Durch Inhibition der *HIF2A*-Expression nahm die *CXCR4*- und *VEGF*-mRNA-Expression um mindestens 50% ab und die Bildung von *spheres* wurde reduziert (Micucci, Matakchione et al. 2015). Es scheint also, dass die HIF2 $\alpha$ -abhängige Signalübertragung ebenfalls einen Tumorstammzell-ähnlichen Phänotyp fördert und somit vermutlich an der Tumorentstehung und dem Fortschreiten der Nierenzellkarzinome beteiligt ist (Micucci, Matakchione et al. 2015).

Nach unserer Ansicht sollten in Anbetracht der unzureichenden Datenlage bezüglich des prognostischen Wertes von *CXCR4*-positiven Zellen bei unbehandelten mRCC-Patienten weitere Arbeiten durchgeführt werden. Die *CXCR4*-mRNA-Expression im Primärtumor von unbehandelten mRCC-Patienten (n=26) korrelierte nicht mit dem Patientenüberleben (Gassenmaier, Chen et al. 2013). Hingegen, wie unsere Daten bei 41 Patienten belegen konnten, korreliert ein hoher Anteil an *CXCR4*-positiven Zellen im Primärtumor von neoadjuvant Sunitinib-behandelten mRCC-Patienten mit einem besseren Überleben, was zur Überwachung der Therapieeffizienz herangezogen werden könnte. Unter Berücksichtigung des Anteils an *CXCR4*-positiven Tumorzellen im Primärtumor neoadjuvant behandelter Patienten könnte man sie nach ihrem Risiko stratifizieren und das weitere therapeutische Vorgehen individuell bestimmen. Zeigt der Primärtumor einen kleinen Anteil an *CXCR4*-positiven Tumorzellen nach neoadjuvanter Sunitinibbehandlung, so könnte man aufgrund des höheren Risikos früher an der Erkrankung zu versterben eine intensivere Therapie wählen, um die Chancen der Patienten zu verbessern. Um den Anteil an *CXCR4*-positiven Zellen bei neoadjuvant behandelten Patienten zu bestimmen wäre eine Entfernung des Primärtumors notwendig, was aber heutzutage im metastasierten Stadium nur nach individueller Indikationsstellung erfolgt. Daher sollte eine palliative Tumornephrektomie nach neoadjuvanter Therapie zur Überprüfung des *CXCR4*-Status nur im Rahmen von

Studien erfolgen. Die Möglichkeit der nichtinvasiven Quantifizierung der *CXCR4*-exprimierenden Zellen beim mRCC mit der nuklearmedizinischen Bildgebung Positronenemissionstomographie (PET) mit einem spezifischen Radiotracer für diesen Rezeptor, sollte untersucht werden. Das <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-PET findet bereits bei Patienten mit extensiv vorbehandeltem Multiplen Myelom zur Risikostratifizierung der Patienten für *CXCR4*-gerichtete Therapien Verwendung (Lapa, Schreder et al. 2017). Der Stellenwert dieser *CXCR4*-Bildgebung zur Monitoring vom Therapieansprechen, sowie zur Einschätzung der Prognose von mRCC-Patienten sollte im Fokus von weiteren Forschungsarbeiten stehen.

Um den Effekt von Tumorstammzellen auf das Patientenüberleben zu klären bedarf es ebenfalls weiterer Forschungen. Zukünftige Studien sollten zum Ziel haben, eine sicherere Identifizierung von Tumorstammzellen vor dem Beginn der Therapie im operativ entfernten Primärtumor zu ermöglichen. Des Weiteren ist ein tieferes Verständnis der Signalwege von Nöten, die es Tumorstammzellen ermöglicht, den derzeitigen Therapien zu entgehen. Die Entwicklung von effizienten Therapiestrategien, die auf diese aggressiven Tumorzellen abzielen, ist dringend notwendig. Das therapeutische Potential der Hemmung des *CXCR4*-Signalweges verbunden mit einer möglichen Beeinträchtigung von Tumorstammzellen wird derzeit von zahlreichen Forschungsgruppen untersucht. Insgesamt wurden fünf große Gruppen von *CXCL12/CXCR4*-Inhibitoren entwickelt: (1) kleine modifizierte Peptide, wie BT1240, (2) kleine Moleküle, wie AMD3100, (3) Antikörper gegen *CXCR4*, wie MDX-1338/BMS 93656, (4) modifizierte Agonisten und Antagonisten für *CXCL12*, wie CTCE-9908 und (5) microRNAs, wie miR-302a (Zhou, Guo et al. 2019). Sie haben bereits vielversprechende therapeutische Effekte bei mehreren Tumorentitäten gezeigt (Zhou, Guo et al. 2019). Beim Kolorektalkarzinom, das ebenfalls eine erhöhte Expression von *CXCR4* aufweist, konnte bereits präklinisch in Xenotransplantatmodellen gezeigt werden, dass es durch die zusätzliche Gabe des *CXCR4*-Inhibitors Peptid R neben der Chemotherapie bzw. Radiochemotherapie zu einer Hemmung des Tumorwachstums und einer Umkehrung der therapieinduzierten EMT kommt (D'Alterio, Zannetti et al. 2020). Bei in *vitro*- und in *vivo*-Untersuchungen führte das Antimalariamittel Chloroquin beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zu einer Reduzierung der Genexpression von *CXCR4* und von mehreren Tumorstammzellen-assoziierten Genen, sowie des Tumorwachstums (Yue, Zhang et al. 2020). Eine Hemmung der NF- $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) abhängigen *CXCR4*-Expression beim Mammakarzinom mit Thymoquinon, was aus Schwarzkümmel isoliert wird, zeigte anti-metastatische Wirkung (Shanmugam, Ahn et al. 2018). Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse bei anderen Tumoren sollte die Hemmung des *CXCR4*-Signalweges als ergänzende Therapie beim Nierenzellkarzinom Gegenstand zukünftiger Forschungen sein. Überdies wäre interessant, die hyperbare Sauerstofftherapie als innovative Therapieoption in Patienten mit resistentem RCC zu untersuchen. Bei anderen Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass eine hyperbare Sauerstofftherapie zu einer Verringerung der Anzahl an Tumorstammzellen aufgrund der Wiederherstellung eines differenzierteren Phänotyps führt. Eine Wiederherstellung des gesunden Gefäßsystems unter Verwendung von Substanzen mit antihypoxischen Eigenschaften wie Inositol-Trispyrophosphat (ITPP) wäre ebenfalls eine mögliche Therapieoption um der hypoxiebedingten Tumorstammzell-Selektionierung entgegenzuwirken und die Wirksamkeit der Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren zu verbessern.

## 5.1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen ob es durch die Behandlung mit Rezeptortyrosinkinase-Hemmern am Beispiel von Sunitinib *in vivo* zu einer Anreicherung von Tumorstammzellen beim Nierenzellkarzinom kommt. In Xenotransplantat-Tumoren zeigte sich nach Sunitinib-Behandlung eine globale Mengenzunahme von Tumorstammzell-mRNAs wie NANOG, SOX2 und POU5F1. Eine Ausnahme stellte CXCR4-mRNA dar, wo überraschenderweise nach Sunitinib-Behandlung CXCR4-Transkripte nicht verstärkt exprimiert waren. Diese Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass es durch die Sunitinib-Behandlung zu einem selektiven Überlebensvorteil von Tumorstammzellen kommt. Es bleibt unklar, wieso CXCR4-mRNA nach Sunitinib-Behandlung in Xenotransplantaten nicht ansteigt, obwohl CXCR4 ebenfalls einen putativen Tumorstammzellmarker bei verschiedenen Tumoren einschließlich dem Nierenzellkarzinom darstellt. Immunhistologisch identifizierten wir dennoch in Xenotransplantat-Tumoren proliferierende Tumorstammzell-Marker-CXCR4-positive Zellen an der invasiven Tumorfront. Nur anti-CXCR4-Antikörper (nicht aber CD133-Antikörper) zeigten reproduzierbare und zuverlässige Färbung (kein unspezifischer Hintergrund). Überdies markierte der CXCR4-Antikörper Tumorendothelzellen. Möglicherweise ist immunhistologisch eine relative Anreicherung von CXCR4-positiven Zellen nach Sunitinib-Behandlung bezogen auf die gesamten vitalen Tumorzellen in den Xenotransplantaten zu beobachten (Abb. 12). Die Frage ob CXCR4 *in vivo* auf Proteinebene ein Tumorstammzellmarker ist, konnte in dieser Dissertation nicht abschließend geklärt werden, da eine Doppelfärbung mit einem anderen Tumorstammzellmarker wie SOX2, POU5F1, NANOG und CD133 nicht möglich war.

Des Weiteren war Ziel dieser Dissertation zu untersuchen, ob der Gehalt an CXCR4-positiven Tumorzellen nach Sunitinib-Behandlung mit dem Überleben von Patienten mit Nierenzellkarzinom korreliert. Laut unserer Hypothese sind Tumorstammzellen unempfindlich gegenüber derzeitigen Therapien und sorgen für das Wiederaufflammen des Tumors nach zunächst scheinbar erfolgreicher Therapie. Deshalb vermuteten wir, dass eine hohe Anzahl an Tumorstammzellen nach einer Behandlung mit Sunitinib sich negativ auf die Prognose der Patienten auswirken würde. Widererwarten zeigten neoadjuvant Sunitinib-behandelte RCC-Patienten ein besseres Überleben, wenn ihre Tumore viele, stark CXCR4-exprimierende Zellen aufwiesen. Daraus lässt sich aber nicht schlussfolgern, dass Tumorstammzellen zu einem besseren Überleben führen, da wahrscheinlich nicht alle CXCR4-positiven Zellen Tumorstammzellen sind. Neben Endothelzellen (auch in Xenotransplantattumoren sichtbar) exprimieren wahrscheinlich auch Nicht-Stammzell-Tumorzellen in hypoxischen Bereichen, aufgrund der antiangiogenen Wirkung von Sunitinib, HIF1 $\alpha$ -vermittelt CXCR4. Diese CXCR4-positiven Tumorzellen könnten die CXCR4-positiven Tumorstammzellen an Zahl übertreffen und somit überdecken. Viele CXCR4-positive Zellen würden somit sogar eher eine erfolgreiche Therapie anzeigen, da als Reaktion auf die Hypoxie es zu viel Tumorschädigung gekommen ist.

Langfristig erhoffen wir uns durch weitere Forschungen über die Rolle von CXCR4 in der Risikostratifizierung von neoadjuvant behandelten mRCC-Patienten und über die Identifizierung von Tumorstammzellen vor dem Beginn der Therapie im operativ entfernten Primärtumor die Entwicklung von effizienteren Therapiestrategien und damit eine Verbesserung der Prognose von mRCC-Patienten.

## 6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### A

ACTB	β-Actin
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AML	Akute Myeloische Leukämie

### B

bp	Basenpaare
----	------------

### C

cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cp	<i>crossing point</i>
CSF-1R	<i>colony-stimulating factor (CSF-1R)</i>
CT	Computertomografie
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CXCL12	<i>CXC-Motiv-Chemokin-12</i>
CXCR4	<i>CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4</i>

### D

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
------	-----------------------------

### E

EAU	European Association for Urology
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i> (epithelialer mesenchymaler Übergang)

### F

FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FLT-3	<i>FMS-like tyrosine kinase</i>

### G

Ga	Gallium
----	---------

### H

HIF-α	Hypoxie-induzierter Faktor alpha
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRE	hypoxia response element

### I

IFN-α	Interferon-alpha
IL-2	Interleukin-2

## **M**

MET	<i>mesenchymal-epithelial transition</i> (mesenchymaler epithelialer Übergang)
mRCC	metastasiertes Nierenzellkarzinom
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>

## **N**

NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NOD/SCID	<i>non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency</i>

## **P**

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed cell death 1 ligand 1</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PET	Positronenemissionstomographie

## **R**

RCC-53	Renal Cell Cancer 53
RET	<i>neurotrophic factor receptor</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> (reverse Transkription Polymerasekettenreaktion)

## **S**

SDF1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SK-RC-17	Sloan Kettering Renal Cancer 17

## **T**

TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur

## **V**

VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
VHL	von Hippel Lindau

## **Z**

ZEB1	<i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
------	---

## 7 ANHANG

### 7.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien der N06SUN-Studie

#### Wichtigste Einschlusskriterien

1. Histologisch bestätigtes metastasiertes klarzelliges Nierenzellkarzinom mit einem asymptomatischen, operablen Primärtumor. Unter einem asymptomatischen Primärtumor versteht man das Fehlen von Symptomen, die ausschließlich dem Primärtumor zugeordnet werden können, wie Flankenschmerzen und/oder Makrohämaturie mit Transfusionspflichtigkeit. Da paraneoplastische Symptome bei metastasierten Erkrankungen nicht allein dem Primärtumor zugeordnet werden können, werden sie nicht in diese Definition einbezogen. Sofern die Diagnose eines klarzelligen Subtyps nicht über histologische Untersuchung einer resezierten Metastase gestellt wurde, muss bei allen Patienten eine transkutane Tru-Cut-Nadelbiopsie des Primärtumors zur Diagnosesicherung durchgeführt werden.
2. Extensive metastasierte Erkrankung, die definiert ist als 3 oder mehr nicht resezierbare Metastasen bei einem Metastasenherd nach den *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors* (RECIST)-Kriterien, oder 2 oder mehr Metastasenherde.
3. Alter: 18 bis 65 Jahre.
4. Lebenserwartung > 3 Monate.
5. Performance-Status nach WHO 0 oder 1.
6. Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten, nachdem er über die Ziele der Studie und die verwendeten Medikamente informiert wurde.
7. Blutwerte: Leukozyten >  $3.0 \times 10^9/l$ , Blutplättchen >  $100 \times 10^9/l$ , Hämoglobin > 6.0 mmol/l.
8. Serumbilirubin, Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Kreatinin bis auf das 1,5-fache der oberen Referenzbereichsgrenze.
9. Keine vorherige systemische Behandlung mit biologischen Reaktionsmodifikatoren, Tyrosinkinaseinhibitoren, monoklonalen Antikörpern oder Chemotherapie. Patienten, die wegen Knochenläsionen eine lokale Strahlentherapie erhalten, können eingeschlossen werden.
10. Intermediärer Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC)-Score (<https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2006-006491-38/NL>).

#### Wichtigste Ausschlusskriterien

1. Symptomatischer Primärtumor mit der Notwendigkeit einer Nephrektomie. Zur Definition siehe Einschlusskriterien.
2. Irresektabler Primärtumor.
3. Patienten, bei denen eine komplette chirurgische Remission durch Entfernen von Metastasen bei der Nephrektomie oder während einer zusätzlichen Intervention erreicht werden kann.
4. Vorherige Nephrektomie.
5. Geringe Metastasenbelastung (2 oder weniger nicht resezierbare Metastasen in einem Metastasenherd).
6. Nur Knochenmetastasen. Knochenmetastasen gelten als nicht wirklich messbar.

7. Derzeitige kardiovaskuläre Erkrankung, hämatopoetische, pulmonale, hepatische oder renale Funktionsstörung oder Performance-Status nach WHO > 1.
8. Vorherige Immuntherapie, Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren, monoklonalen Antikörpern oder Chemotherapie.
9. Autoimmunerkrankungen, HIV und Hepatitis.
10. Corticosteroid- und/oder andere immunsuppressive Therapien.
11. Frühere bösartige Erkrankungen. Im Falle von *No Evidence of Disease* (NED) sollte der Zeitraum > 5 Jahre betragen.
12. Zentralnervensystem-Metastasen.
13. Kein klarzelliger Nierenzellkarzinom-Subtyp.
14. Ungünstiger oder günstiger MSKCC-Score (<https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2006-006491-38/NL>).

## 7.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien der SURTIME Studie

### Wichtigste Einschlusskriterien

1. Histologisch bestätigtes, unbehandeltes, metastasiertes, klarzelliges Nierenzellkarzinom mit einem asymptomatischen, operablen Primärtumor und Notwendigkeit einer Behandlung mit Sunitinib.
2. Messbare Erkrankung nach den RECIST-Kriterien, Version 1.1.
3. Alter: 18 oder älter.
4. Lebenserwartung > 3 Monate.
5. Performance-Status nach WHO 0 oder 1.
6. Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten zur Teilnahme an Studie.
7. Gute Knochenmark-, Leber-, Nieren- und Herzfunktion.
8. Drei oder weniger chirurgische Risikofaktoren, einschließlich Serumalbumin nach den *Common Terminology Criteria for Adverse Events* Version 4.0 Grad 2 oder höher, Serumlaktadehydrogenase höher als das 1,5-fache des oberen Referenzwertes, Lebermetastasen, metastasenbedingte Symptome, retroperitonealer oder supradiaphragmaler Lymphknotenbefall und Tumorstadium cT3 bis T4.
9. Keine klinische Zeichen einer Zentralnervensystem-Beteiligung.
10. Eine vorangegangene Strahlentherapie bei Knochenläsionen war zulässig.
11. Der MSKCC-Score wurde berechnet, war aber kein Einschlusskriterium (Bex, Mulders et al. 2018)

### Wichtigste Ausschlusskriterien

1. Symptomatischer Primärtumor mit der Notwendigkeit einer Nephrektomie.
2. Patienten mit nicht resezierbaren lokoregionalen Lymphknotenmetastasen größer als der Primärtumor.
3. Patienten, bei denen eine komplette chirurgische Remission durch Entfernen von Metastasen bei der Nephrektomie oder während einer zusätzlichen Intervention erreicht werden kann.
4. Vorherige partielle oder komplette Nephrektomie.
5. Patienten mit ausschließlich Knochenmetastasen.

6. Mehr wie drei chirurgische Risikofaktoren, einschließlich Serumalbumin nach den *Common Terminology Criteria for Adverse Events* Version 4.0 Grad 2 oder höher, Serumlaktadehydrogenase höher als das 1,5-fache des oberen Referenzwertes, Lebermetastasen, metastasenbedingte Symptome, retroperitonealer oder supradiaphragmaler Lymphknotenbefall und Tumorstadium cT3 bis T4.
7. Vorgegangene systemische Therapie für metastasiertes Nierenzellkarzinom.
8. Corticosteroid- und/oder andere immunsuppressive Therapien (Bex, Mulders et al. 2018).

## 8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt und motiviert haben.

Mein erster und größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann für die Überlassung des Themas und für das geschenkte Vertrauen. Herzlichen Dank für das Beibringen der Methoden, für die zahlreichen interessanten Diskussionen und Ideen, die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit in dieser Form vorliegt. Darüber hinaus bedanke ich mich für die fachliche und sprachliche Korrektur meiner Doktorarbeit. Seine Begeisterung für die Wissenschaft und sein breites fachliches Wissen waren für mich sehr inspirierend und förderten meine persönliche Weiterentwicklung.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Kooperationspartner Dr. med. Maximilian Gassenmaier für die Generierung und Behandlung der Xenotransplantaten, sowie für die Überlassung der RNAs aus den von ihm kultivierten Zellen.

Mein Dank gilt auch unseren Kooperationspartnern im Pathologischen Institut in München PD Dr. med. Steffen Ormanns und Dr. med. Gerald Assmann für die Zusammenarbeit.

Bei Prof. Dr. Axel Bex möchte ich mich für die Bereitstellung der Tumorproben aus der N06SUN Studie und aus der SURTIME Studie bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Alexander Buchner bedanken für das Lösen der Computerprobleme, für die Ratschläge bei statistischen Fragen, sowie für die vielen netten Gespräche. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des LIFE-Zentrums für das freundliche Miteinander im Labor und für die Hilfe bei technischen Problemen bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Elfriede Nößner für die Einführung in das Konfokalmikroskop.

Herzlichen Dank an die Friedrich-Ebert-Stiftung insbesondere an meine Betreuerin Beate Eckstein für das entgegengebrachte Vertrauen und für die finanzielle Unterstützung.

Nicht zuletzt ein besonderer Dank an meiner Familie, die immer für mich da war und nie aufgehört hat an mich zu glauben. Ohne ihre Unterstützung wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

1 (2016) Krebs in Deutschland für 2015-2016 gemeinsame Publikation der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. (GEKID) und des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut

Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison and M. F. Clarke (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-3988.

Amato, R. J. (2000). "Chemotherapy for renal cell carcinoma." Semin Oncol **27**(2): 177-186.

Atkins, M. B. and N. M. Tannir (2018). "Current and emerging therapies for first-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma." Cancer Treat Rev **70**: 127-137.

Battle, E. and H. Clevers (2017). "Cancer stem cells revisited." Nat Med **23**(10): 1124-1134.

Baylin, S. B. and P. A. Jones (2011). "A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications." Nat Rev Cancer **11**(10): 726-734.

Bekema, H. J., S. MacLennan, M. Imamura, T. B. Lam, F. Stewart, N. Scott, G. MacLennan, S. McClinton, T. R. Griffiths, A. Skolarikos, S. J. MacLennan, R. Sylvester, B. Ljungberg and J. N'Dow (2013). "Systematic review of adrenalectomy and lymph node dissection in locally advanced renal cell carcinoma." Eur Urol **64**(5): 799-810.

Bex, A., P. Mulders, M. Jewett, J. Wagstaff, J. V. van Thienen, C. U. Blank, R. van Velthoven, M. Del Pilar Laguna, L. Wood, H. H. E. van Melick, M. J. Aarts, J. B. Lattouf, T. Powles, I. J. de Jong, S. Rottey, B. Tombal, S. Marreaud, S. Collette, L. Collette and J. Haanen (2018). "Comparison of Immediate vs Deferred Cytoreductive Nephrectomy in Patients with Synchronous Metastatic Renal Cell Carcinoma Receiving Sunitinib: The SURTIME Randomized Clinical Trial." JAMA Oncol.

Bianchi, M., M. Sun, C. Jeldres, S. F. Shariat, Q. D. Trinh, A. Briganti, Z. Tian, J. Schmitges, M. Graefen, P. Perrotte, M. Menon, F. Montorsi and P. I. Karakiewicz (2012). "Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis." Ann Oncol **23**(4): 973-980.

Blom, J. H., H. van Poppel, J. M. Marechal, D. Jacqmin, F. H. Schroder, L. de Prijck and R. Sylvester (2009). "Radical nephrectomy with and without lymph-node dissection: final results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) randomized phase 3 trial 30881." Eur Urol **55**(1): 28-34.

Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-737.

Brabletz, T., R. Kalluri, M. A. Nieto and R. A. Weinberg (2018). "EMT in cancer." Nat Rev Cancer **18**(2): 128-134.

Bruno, S., B. Bussolati, C. Grange, F. Collino, M. E. Graziano, U. Ferrando and G. Camussi (2006). "CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis." Am J Pathol **169**(6): 2223-2235.

Bussolati, B., S. Bruno, C. Grange, U. Ferrando and G. Camussi (2008). "Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas." Faseb j **22**(10): 3696-3705.

Bussolati, B., B. Dekel, B. Azzarone and G. Camussi (2013). "Human renal cancer stem cells." Cancer Lett **338**(1): 141-146.

Capitanio, U. and F. Montorsi (2016). "Renal cancer." Lancet **387**(10021): 894-906.

Carlo, M. I., M. H. Voss and R. J. Motzer (2016). "Checkpoint inhibitors and other novel immunotherapies for advanced renal cell carcinoma." Nat Rev Urol **13**(7): 420-431.

Caron, G., S. Le Gallou, T. Lamy, K. Tarte and T. Fest (2009). "CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells." J Immunol **182**(12): 7595-7602.

Chaffer, C. L., B. P. San Juan, E. Lim and R. A. Weinberg (2016). "EMT, cell plasticity and metastasis." Cancer Metastasis Rev **35**(4): 645-654.

Charles, N., T. Ozawa, M. Squatrito, A. M. Bleau, C. W. Brennan, D. Hambardzumyan and E. C. Holland (2010). "Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells." Cell Stem Cell **6**(2): 141-152.

Chen, D., M. Gassenmaier, M. Maruschke, R. Riesenberger, H. Pohla, C. G. Stief, W. Zimmermann and A. Buchner (2014). "Expression and prognostic significance of a comprehensive epithelial-mesenchymal transition gene set in renal cell carcinoma." J Urol **191**(2): 479-486.

Chen, Y. C., P. N. Ingram, S. Fouladdel, S. P. McDermott, E. Azizi, M. S. Wicha and E. Yoon (2016). "High-Throughput Single-Cell Derived Sphere Formation for Cancer Stem-Like Cell Identification and Analysis." Sci Rep **6**: 27301.

Cheng, B., G. Yang, R. Jiang, Y. Cheng, H. Yang, L. Pei and X. Qiu (2016). "Cancer stem cell markers predict a poor prognosis in renal cell carcinoma: a meta-analysis." Oncotarget **7**(40): 65862-65875.

Cheung, D. C. and A. Finelli (2017). "Active Surveillance in Small Renal Masses in the Elderly: A Literature Review." Eur Urol Focus **3**(4-5): 340-351.

Clevers, H. (2011). "The cancer stem cell: premises, promises and challenges." Nat Med **17**(3): 313-319.

Collins, A. T., P. A. Berry, C. Hyde, M. J. Stower and N. J. Maitland (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." Cancer Res **65**(23): 10946-10951.

Corro, C. and H. Moch (2018). "Biomarker discovery for renal cancer stem cells." J Pathol Clin Res **4**(1): 3-18.

D'Alterio, C., L. Cindolo, L. Portella, M. Polimeno, C. Consales, A. Riccio, M. Cioffi, R. Franco, P. Chiodini, G. Carteni, V. Mirone, N. Longo, L. Marra, S. Perdona, L. Claudio, M. Mascolo, S. Staibano, M. Falsaperla, M. Puglisi, G. Martignoni, V. Ficarra, G. Castello and S. Scala (2010). "Differential role of CD133 and CXCR4 in renal cell carcinoma." Cell Cycle **9**(22): 4492-4500.

D'Alterio, C., A. Zannetti, A. M. Trotta, C. Ierano, M. Napolitano, G. Rea, A. Greco, P. Maiolino, S. Albanese, G. Scognamiglio, F. Tatangelo, S. Tafuto, L. Portella, S. Santagata, G. Nasti, A. Ottaiano, R.

Pacelli, P. Delrio, G. Botti and S. Scala (2020). "New CXCR4 Antagonist Peptide R (Pep R) Improves Standard Therapy in Colorectal Cancer." Cancers (Basel) **12**(7).

Djafarzadeh, R., E. Noessner, H. Engelmann, D. J. Schendel, M. Notohamiprodjo, I. von Lüttichau and P. J. Nelson (2006). "GPI-anchored TIMP-1 treatment renders renal cell carcinoma sensitive to FAS-mediated killing." Oncogene **25**(10): 1496-1508.

Eramo, A., F. Lotti, G. Sette, E. Pilozzi, M. Biffoni, A. Di Virgilio, C. Conticello, L. Ruco, C. Peschle and R. De Maria (2008). "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." Cell Death Differ **15**(3): 504-514.

Fabregat, I., A. Malfettone and J. Soukupova (2016). "New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer." J Clin Med **5**(3).

Gassenmaier, M., D. Chen, A. Buchner, L. Henkel, M. Schiemann, B. Mack, D. J. Schendel, W. Zimmermann and H. Pohla (2013). "CXC chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis." Stem Cells **31**(8): 1467-1476.

Gerlinger, M., A. J. Rowan, S. Horswell, M. Math, J. Larkin, D. Endesfelder, E. Gronroos, P. Martinez, N. Matthews, A. Stewart, P. Tarpey, I. Varela, B. Phillimore, S. Begum, N. Q. McDonald, A. Butler, D. Jones, K. Raine, C. Latimer, C. R. Santos, M. Nohadani, A. C. Eklund, B. Spencer-Dene, G. Clark, L. Pickering, G. Stamp, M. Gore, Z. Szallasi, J. Downward, P. A. Futreal and C. Swanton (2012). "Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing." N Engl J Med **366**(10): 883-892.

Gill, I. S., L. R. Kavoussi, B. R. Lane, M. L. Blute, D. Babineau, J. R. Colombo, Jr., I. Frank, S. Permpongkosol, C. J. Weight, J. H. Kaouk, M. W. Kattan and A. C. Novick (2007). "Comparison of 1,800 laparoscopic and open partial nephrectomies for single renal tumors." J Urol **178**(1): 41-46.

Gossage, L., T. Eisen and E. R. Maher (2015). "VHL, the story of a tumour suppressor gene." Nat Rev Cancer **15**(1): 55-64.

Goyal, R., E. Gersbach, X. J. Yang and S. M. Rohan (2013). "Differential diagnosis of renal tumors with clear cytoplasm: clinical relevance of renal tumor subclassification in the era of targeted therapies and personalized medicine." Arch Pathol Lab Med **137**(4): 467-480.

Greef, B. and T. Eisen (2016). "Medical treatment of renal cancer: new horizons." Br J Cancer **115**(5): 505-516.

Haferkamp, A. (2018). "[Diagnosis and treatment of small renal masses]." Urologe A **57**(3): 272-273.

Heldin, C. H., M. Vanlandewijck and A. Moustakas (2012). "Regulation of EMT by TGFbeta in cancer." FEBS Lett **586**(14): 1959-1970.

Hermann, P. C., S. L. Huber, T. Herrler, A. Aicher, J. W. Ellwart, M. Guba, C. J. Bruns and C. Heeschen (2007). "Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer." Cell Stem Cell **1**(3): 313-323.

Herreros-Villanueva, M., L. Bujanda, D. D. Billadeau and J. S. Zhang (2014). "Embryonic stem cell factors and pancreatic cancer." World J Gastroenterol **20**(9): 2247-2254.

- Hiyama, E. and K. Hiyama (2007). "Telomere and telomerase in stem cells." Br J Cancer **96**(7): 1020-1024.
- Huang, D., Y. Ding, Y. Li, W. M. Luo, Z. F. Zhang, J. Snider, K. Vandenbeldt, C. N. Qian and B. T. Teh (2010). "Sunitinib acts primarily on tumor endothelium rather than tumor cells to inhibit the growth of renal cell carcinoma." Cancer Res **70**(3): 1053-1062.
- Janzen, N. K., H. L. Kim, R. A. Figlin and A. S. Belldegrun (2003). "Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease." Urologic Clinics of North America **30**(4): 843-852.
- Kaiser, J. (2015). "The cancer stem cell gamble." Science **347**(6219): 226-229.
- Kang, N., S. Y. Choi, B. N. Kim, C. D. Yeo, C. K. Park, Y. K. Kim, T. J. Kim, S. B. Lee, S. H. Lee, J. Y. Park, M. S. Park, H. W. Yim and S. J. Kim (2019). "Hypoxia-induced cancer stemness acquisition is associated with CXCR4 activation by its aberrant promoter demethylation." BMC Cancer **19**(1): 148.
- Khan, M. I., A. M. Czarnecka, R. Duchnowska, W. Kukwa and C. Szczylik (2014). "Metastasis-Initiating Cells in Renal Cancer." Curr Signal Transduct Ther **8**(3): 240-246.
- Khan, M. I., A. M. Czarnecka, I. Helbrecht, E. Bartnik, F. Lian and C. Szczylik (2015). "Current approaches in identification and isolation of human renal cell carcinoma cancer stem cells." Stem Cell Res Ther **6**: 178.
- Krebs, A. M., J. Mitschke, M. Lasierra Losada, O. Schmalhofer, M. Boerries, H. Busch, M. Boettcher, D. Mougiakakos, W. Reichardt, P. Bronsert, V. G. Brunton, C. Pilarsky, T. H. Winkler, S. Brabletz, M. P. Stemmler and T. Brabletz (2017). "The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer." Nat Cell Biol **19**(5): 518-529.
- Landolt, L., O. Eikrem, P. Strauss, A. Scherer, D. H. Lovett, C. Beisland, K. Finne, T. Osman, M. M. Ibrahim, G. Gausdal, L. Ahmed, J. B. Lorens, J. P. Thiery, T. Z. Tan, M. Sekulic and H. P. Marti (2017). "Clear Cell Renal Cell Carcinoma is linked to Epithelial-to-Mesenchymal Transition and to Fibrosis." Physiol Rep **5**(11).
- Lane, B. R. and I. S. Gill (2010). "7-year oncological outcomes after laparoscopic and open partial nephrectomy." J Urol **183**(2): 473-479.
- Lapa, C., M. Schreder, A. Schirbel, S. Samnick, K. M. Kortum, K. Herrmann, S. Kropf, H. Einsele, A. K. Buck, H. J. Wester, S. Knop and K. Luckerath (2017). "[<sup>68</sup>Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in multiple myeloma - Comparison to [<sup>18</sup>F]FDG and laboratory values." Theranostics **7**(1): 205-212.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri and J. E. Dick (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-648.
- Li, C., D. G. Heidt, P. Dalerba, C. F. Burant, L. Zhang, V. Adsay, M. Wicha, M. F. Clarke and D. M. Simeone (2007). "Identification of pancreatic cancer stem cells." Cancer Res **67**(3): 1030-1037.

Liu, C. Y., H. H. Lin, M. J. Tang and Y. K. Wang (2015). "Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation." Oncotarget **6**(18): 15966-15983.

Liu, S., Y. Cong, D. Wang, Y. Sun, L. Deng, Y. Liu, R. Martin-Trevino, L. Shang, S. P. McDermott, M. D. Landis, S. Hong, A. Adams, R. D'Angelo, C. Ginestier, E. Charafe-Jauffret, S. G. Clouthier, D. Birnbaum, S. T. Wong, M. Zhan, J. C. Chang and M. S. Wicha (2014). "Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts." Stem Cell Reports **2**(1): 78-91.

Ljungberg, B., K. Bensalah, S. Canfield, S. Dabestani, F. Hofmann, M. Hora, M. A. Kuczyk, T. Lam, L. Marconi, A. S. Merseburger, P. Mulders, T. Powles, M. Staehler, A. Volpe and A. Bex (2015). "EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update." Eur Urol **67**(5): 913-924.

MacLennan, S., M. Imamura, M. C. Lapitan, M. I. Omar, T. B. Lam, A. M. Hilvano-Cabungcal, P. Royle, F. Stewart, G. MacLennan, S. J. MacLennan, P. Dahm, S. E. Canfield, S. McClinton, T. R. Griffiths, B. Ljungberg and J. N'Dow (2012). "Systematic review of perioperative and quality-of-life outcomes following surgical management of localised renal cancer." Eur Urol **62**(6): 1097-1117.

Magee, J. A., E. Piskounova and S. J. Morrison (2012). "Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty." Cancer Cell **21**(3): 283-296.

Marconi, L., S. Dabestani, T. B. Lam, F. Hofmann, F. Stewart, J. Norrie, A. Bex, K. Bensalah, S. E. Canfield, M. Hora, M. A. Kuczyk, A. S. Merseburger, P. F. Mulders, T. Powles, M. Staehler, B. Ljungberg and A. Volpe (2016). "Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Accuracy of Percutaneous Renal Tumour Biopsy." Eur Urol **69**(4): 660-673.

Micucci, C., G. Matakchione, D. Valli, S. Orciari and A. Catalano (2015). "HIF2alpha is involved in the expansion of CXCR4-positive cancer stem-like cells in renal cell carcinoma." Br J Cancer **113**(8): 1178-1185.

Moore, L. E., M. L. Nickerson, P. Brennan, J. R. Toro, E. Jaeger, J. Rinsky, S. S. Han, D. Zaridze, V. Matveev, V. Janout, H. Kollarova, V. Bencko, M. Navratilova, N. Szeszenia-Dabrowska, D. Mates, L. S. Schmidt, P. Lenz, S. Karami, W. M. Linehan, M. Merino, S. Chanock, P. Boffetta, W. H. Chow, F. M. Waldman and N. Rothman (2011). "Von Hippel-Lindau (VHL) inactivation in sporadic clear cell renal cancer: associations with germline VHL polymorphisms and etiologic risk factors." PLoS Genet **7**(10): e1002312.

Motzer, R. J., J. Bacik, B. A. Murphy, P. Russo and M. Mazumdar (2002). "Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma." J Clin Oncol **20**(1): 289-296.

Motzer, R. J., T. E. Hutson, D. Cella, J. Reeves, R. Hawkins, J. Guo, P. Nathan, M. Staehler, P. de Souza, J. R. Merchan, E. Boleti, K. Fife, J. Jin, R. Jones, H. Uemura, U. De Giorgi, U. Harmenberg, J. Wang, C. N. Sternberg, K. Deen, L. McCann, M. D. Hackshaw, R. Crescenzo, L. N. Pandite and T. K. Choueiri (2013). "Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma." N Engl J Med **369**(8): 722-731.

Motzer, R. J., T. E. Hutson, P. Tomczak, M. D. Michaelson, R. M. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S. T. Kim, I. Chen, P. W. Bycott, C. M. Baum and R. A. Figlin (2007). "Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma." N Engl J Med **356**(2): 115-124.

Motzer, R. J., E. Jonasch, N. Agarwal, S. Bhayani, W. P. Bro, S. S. Chang, T. K. Choueiri, B. A. Costello, I. H. Derweesh, M. Fishman, T. H. Gallagher, J. L. Gore, S. L. Hancock, M. R. Harrison, W. Kim, C. Kyriakopoulos, C. LaGrange, E. T. Lam, C. Lau, M. D. Michaelson, T. Olencki, P. M. Pierorazio, E. R. Plimack, B. G. Redman, B. Shuch, B. Somer, G. Sonpavde, J. Sosman, M. Dwyer and R. Kumar (2017). "Kidney Cancer, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology." J Natl Compr Canc Netw **15**(6): 804-834.

Motzer, R. J., N. M. Tannir, D. F. McDermott, O. Aren Frontera, B. Melichar, T. K. Choueiri, E. R. Plimack, P. Barthelemy, C. Porta, S. George, T. Powles, F. Donskov, V. Neiman, C. K. Kollmannsberger, P. Salman, H. Gurney, R. Hawkins, A. Ravaud, M. O. Grimm, S. Bracarda, C. H. Barrios, Y. Tomita, D. Castellano, B. I. Rini, A. C. Chen, S. Mekan, M. B. McHenry, M. Wind-Rotolo, J. Doan, P. Sharma, H. J. Hammers and B. Escudier (2018). "Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma." N Engl J Med **378**(14): 1277-1290.

Mukherjee, S., A. Manna, P. Bhattacharjee, M. Mazumdar, S. Saha, S. Chakraborty, D. Guha, A. Adhikary, D. Jana, M. Gorain, S. A. Mukherjee, G. C. Kundu, D. K. Sarkar and T. Das (2016). "Non-migratory tumorigenic intrinsic cancer stem cells ensure breast cancer metastasis by generation of CXCR4(+) migrating cancer stem cells." Oncogene **35**(37): 4937-4948.

Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui and A. Zlotnik (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): 50-56.

Myszczyszyn, A., A. M. Czarnecka, D. Matak, L. Szymanski, F. Lian, A. Kornakiewicz, E. Bartnik, W. Kukwa, C. Kieda and C. Szczylik (2015). "The Role of Hypoxia and Cancer Stem Cells in Renal Cell Carcinoma Pathogenesis." Stem Cell Rev **11**(6): 919-943.

Navai, N. and C. G. Wood (2012). "Environmental and modifiable risk factors in renal cell carcinoma." Urol Oncol **30**(2): 220-224.

Ng, H. H. and M. A. Surani (2011). "The transcriptional and signalling networks of pluripotency." Nat Cell Biol **13**(5): 490-496.

Nieto, M. A. (2013). "Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells." Science **342**(6159): 1234850.

Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science **194**(4260): 23-28.

O'Brien, C. A., A. Pollett, S. Gallinger and J. E. Dick (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature **445**(7123): 106-110.

Oren, O. and B. D. Smith (2017). "Eliminating Cancer Stem Cells by Targeting Embryonic Signaling Pathways." Stem Cell Rev **13**(1): 17-23.

Padala, S. A., A. Barsouk, K. C. Thandra, K. Saginala, A. Mohammed, A. Vakiti, P. Rawla and A. Barsouk (2020). "Epidemiology of Renal Cell Carcinoma." World J Oncol **11**(3): 79-87.

Pal, M., S. Bhattacharya, G. Kalyan and S. Hazra (2018). "Cadherin profiling for therapeutic interventions in Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) and tumorigenesis." Exp Cell Res **368**(2): 137-146.

Patard, J. J., E. Leray, A. Rodriguez, N. Rioux-Leclercq, F. Guille and B. Lobel (2003). "Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma." Eur Urol **44**(2): 226-232.

Patel, N. H., K. M. Attwood, M. Hanzly, T. T. Creighton, D. C. Mehedint, T. Schwaab and E. C. Kauffman (2015). "Comparative Analysis of Smoking as a Risk Factor among Renal Cell Carcinoma Histological Subtypes." J Urol **194**(3): 640-646.

Powles, T., L. Albiges, M. Staehler, K. Bensalah, S. Dabestani, R. H. Giles, F. Hofmann, M. Hora, M. A. Kuczyk, T. B. Lam, L. Marconi, A. S. Merseburger, S. Fernandez-Pello, R. Tahbaz, A. Volpe, B. Ljungberg and A. Bex (2017). "Updated European Association of Urology Guidelines Recommendations for the Treatment of First-line Metastatic Clear Cell Renal Cancer." Eur Urol.

Powles, T., I. Kayani, C. Blank, S. Chowdhury, S. Horenblas, J. Peters, J. Shamash, N. Sarwar, K. Boletti, A. Sadev, T. O'Brien, D. Berney, L. Beltran, J. Haanen and A. Bex (2011). "The safety and efficacy of sunitinib before planned nephrectomy in metastatic clear cell renal cancer." Ann Oncol **22**(5): 1041-1047.

Powles, T., M. Staehler, B. Ljungberg, K. Bensalah, S. E. Canfield, S. Dabestani, R. Giles, F. Hofmann, M. Hora, M. A. Kuczyk, T. Lam, L. Marconi, A. S. Merseburger, A. Volpe and A. Bex (2016). "Updated EAU Guidelines for Clear Cell Renal Cancer Patients Who Fail VEGF Targeted Therapy." Eur Urol **69**(1): 4-6.

Prager, B. C., Q. Xie, S. Bao and J. N. Rich (2019). "Cancer Stem Cells: The Architects of the Tumor Ecosystem." Cell Stem Cell **24**(1): 41-53.

Prasad, S. R., V. R. Surabhi, C. O. Menias, A. A. Raut and K. N. Chintapalli (2008). "Benign renal neoplasms in adults: cross-sectional imaging findings." AJR Am J Roentgenol **190**(1): 158-164

Rasti, A., M. Abolhasani, L. S. Zanjani, M. Asgari, M. Mehrazma and Z. Madjd (2017). "Reduced expression of CXCR4, a novel renal cancer stem cell marker, is associated with high-grade renal cell carcinoma." J Cancer Res Clin Oncol **143**(1): 95-104.

Rini, B. I., S. C. Campbell and B. Escudier (2009). "Renal cell carcinoma." Lancet **373**(9669): 1119-1132.

Romain, B., M. Hachet-Haas, S. Rohr, C. Brigand, J. L. Galzi, M. P. Gaub, E. Pencreach and D. Guenot (2014). "Hypoxia differentially regulated CXCR4 and CXCR7 signaling in colon cancer." Mol Cancer **13**: 58.

Saeednejad Zanjani, L., Z. Madjd, M. Abolhasani, Y. Andersson, A. Rasti, A. Sharifabrizi and M. Asgari (2017). "Cytoplasmic expression of CD133 stemness marker is associated with tumor aggressiveness in clear cell renal cell carcinoma." Exp Mol Pathol **103**(2): 218-228.

Saeednejad Zanjani, L., Z. Madjd, M. Abolhasani, A. Sharifabrizi, A. Rasti and M. Asgari (2018). "Expression of CD105 cancer stem cell marker in three subtypes of renal cell carcinoma." Cancer Biomark **21**(4): 821-837.

Salazar, N. and B. A. Zabel (2019). "Support of Tumor Endothelial Cells by Chemokine Receptors." Front Immunol **10**: 147.

Sanchez-Gastaldo, A., E. Kempf, A. Gonzalez Del Alba and I. Duran (2017). "Systemic treatment of renal cell cancer: A comprehensive review." Cancer Treat Rev **60**: 77-89.

Santagata, S., M. Napolitano, C. D'Alterio, S. Desicato, S. D. Maro, L. Marinelli, A. Fragale, M. Buoncervello, F. Persico, L. Gabriele, E. Novellino, N. Longo, S. Pignata, S. Perdona and S. Scala (2017). "Targeting CXCR4 reverts the suppressive activity of T-regulatory cells in renal cancer." Oncotarget **8**(44): 77110-77120.

Schodel, J., S. Grampp, E. R. Maher, H. Moch, P. J. Ratcliffe, P. Russo and D. R. Mole (2016). "Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer." Eur Urol **69**(4): 646-657.

Scosyrev, E., E. M. Messing, R. Sylvester, S. Campbell and H. Van Poppel (2014). "Renal function after nephron-sparing surgery versus radical nephrectomy: results from EORTC randomized trial 30904." Eur Urol **65**(2): 372-377.

Shanmugam, M. K., K. S. Ahn, A. Hsu, C. C. Woo, Y. Yuan, K. H. B. Tan, A. Chinnathambi, T. A. Alahmadi, S. A. Alharbi, A. P. F. Koh, F. Arfuso, R. Y. Huang, L. H. K. Lim, G. Sethi and A. P. Kumar (2018). "Thymoquinone Inhibits Bone Metastasis of Breast Cancer Cells Through Abrogation of the CXCR4 Signaling Axis." Front Pharmacol **9**: 1294.

Sharpe, K., G. D. Stewart, A. Mackay, C. Van Neste, C. Rofe, D. Berney, I. Kayani, A. Bex, E. Wan, F. C. O'Mahony, M. O'Donnell, S. Chowdhury, R. Doshi, C. Ho-Yen, M. Gerlinger, D. Baker, N. Smith, B. Davies, A. Sahdev, E. Boleti, T. De Meyer, W. Van Criekinge, L. Beltran, Y. J. Lu, D. J. Harrison, A. R. Reynolds and T. Powles (2013). "The effect of VEGF-targeted therapy on biomarker expression in sequential tissue from patients with metastatic clear cell renal cancer." Clin Cancer Res **19**(24): 6924-6934.

Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano and P. B. Dirks (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.

Smaldone, M. C., A. Kutikov, B. L. Egleston, D. J. Canter, R. Viterbo, D. Y. Chen, M. A. Jewett, R. E. Greenberg and R. G. Uzzo (2012). "Small renal masses progressing to metastases under active surveillance: a systematic review and pooled analysis." Cancer **118**(4): 997-1006.

Staller, P., J. Sulitkova, J. Lisztwan, H. Moch, E. J. Oakeley and W. Krek (2003). "Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL." Nature **425**(6955): 307-311.

Suer, I., O. F. Karatas, B. Yuceturk, M. Yilmaz, G. Guven, O. Buge, H. Cansiz and M. Ozen (2014). "Characterization of stem-like cells directly isolated from freshly resected laryngeal squamous cell carcinoma specimens." Curr Stem Cell Res Ther **9**(4): 347-353.

Sun, Y., T. Yoshida, M. Okabe, K. Zhou, F. Wang, C. Soko, S. Saito and T. Nikaido (2017). "Isolation of Stem-Like Cancer Cells in Primary Endometrial Cancer Using Cell Surface Markers CD133 and CXCR4." Transl Oncol **10**(6): 976-987.

Surani, M. A., K. Hayashi and P. Hajkova (2007). "Genetic and epigenetic regulators of pluripotency." Cell **128**(4): 747-762.

Tang, S. W., W. H. Chang, Y. C. Su, Y. C. Chen, Y. H. Lai, P. T. Wu, C. I. Hsu, W. C. Lin, M. K. Lai and J. Y. Lin (2009). "MYC pathway is activated in clear cell renal cell carcinoma and essential for proliferation of clear cell renal cell carcinoma cells." Cancer Lett **273**(1): 35-43.

Van Poppel, H., L. Da Pozzo, W. Albrecht, V. Matveev, A. Bono, A. Borkowski, M. Colombel, L. Klotz, E. Skinner, T. Keane, S. Marreaud, S. Collette and R. Sylvester (2011). "A prospective, randomised EORTC intergroup phase 3 study comparing the oncologic outcome of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma." Eur Urol **59**(4): 543-552.

Varna, M., G. Gapihan, J. P. Feugeas, P. Ratajczak, S. Tan, I. Ferreira, C. Leboeuf, N. Setterblad, A. Duval, J. Verine, S. Germain, P. Mongiat-Artus, A. Janin and G. Bousquet (2015). "Stem cells increase in numbers in perinecrotic areas in human renal cancer." Clin Cancer Res **21**(4): 916-924.

Wehler, T. C., C. Graf, S. Biesterfeld, W. Brenner, J. Schadt, I. Gockel, M. R. Berger, J. W. Thuroff, P. R. Galle, M. Moehler and C. C. Schimanski (2008). "Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by renal cell carcinoma correlates with advanced disease." J Oncol **2008**: 626340.

Wu, W., J. Cao, Z. Ji, J. Wang, T. Jiang and H. Ding (2016). "Co-expression of Lgr5 and CXCR4 characterizes cancer stem-like cells of colorectal cancer." Oncotarget **7**(49): 81144-81155.

Xiao, W., Z. Gao, Y. Duan, W. Yuan and Y. Ke (2017). "Notch signaling plays a crucial role in cancer stem-like cells maintaining stemness and mediating chemotaxis in renal cell carcinoma." J Exp Clin Cancer Res **36**(1): 41.

Xu, J., J. Liang, Y. M. Meng, J. Yan, X. J. Yu, C. Q. Liu, L. Xu, S. M. Zhuang and L. Zheng (2017). "Vascular CXCR4 Expression Promotes Vessel Sprouting and Sensitivity to Sorafenib Treatment in Hepatocellular Carcinoma." Clin Cancer Res **23**(15): 4482-4492.

Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen and T. L. Madden (2012). "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction." BMC Bioinformatics **13**: 134.

Yue, D., D. Zhang, X. Shi, S. Liu, A. Li, D. Wang, G. Qin, Y. Ping, Y. Qiao, X. Chen, F. Wang, R. Chen, S. Zhao, L. Wang and Y. Zhang (2020). "Chloroquine Inhibits Stemness of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells Through Targeting CXCR4-STAT3 Pathway." Front Oncol **10**: 311.

Zanjani, L. S., Z. Madjd, M. Abolhasani, A. Rasti, O. Fodstad, Y. Andersson and M. Asgari (2018). "Increased expression of CD44 is associated with more aggressive behavior in clear cell renal cell carcinoma." Biomark Med **12**(1): 45-61.

Zhang, S., C. Balch, M. W. Chan, H. C. Lai, D. Matei, J. M. Schilder, P. S. Yan, T. H. Huang and K. P. Nephew (2008). "Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors." Cancer Res **68**(11): 4311-4320.

Zhou, W., S. Guo, M. Liu, M. E. Burow and G. Wang (2019). "Targeting CXCL12/CXCR4 Axis in Tumor Immunotherapy." Curr Med Chem **26**(17): 3026-3041.



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



## Eidesstattliche Versicherung

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**Tedina Çela**

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand