

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Siemer

Prognostische Wertigkeit von c-MET im klarzelligen Nierenzellkarzinom in Korrelation zum PD-L1-Status

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

vorgelegt von: Maxine Marie Piller

geb. am: 20.02.2000 in Minden

Tag der Promotion: 23.09.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Kerstin Junker

Prof. Dr. Danilo Fliser

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	3
2. Verzeichnisse	6
2.1 Abbildungsverzeichnis	6
2.2 Tabellenverzeichnis	9
2.3 Abkürzungsverzeichnis	10
3. Zusammenfassung	13
3.1 Deutsche Zusammenfassung	13
3.2 Englische Zusammenfassung/Abstract	15
4. Einleitung; eigene Fragestellung	17
4.1 Das Nierenzellkarzinom	17
4.1.1 Epidemiologie	17
4.1.2 Ätiologie	17
4.1.3 Klassifikation	19
4.1.4 Das klarzellige Nierenzellkarzinom	20
4.1.5 Symptome und Diagnostik	21
4.1.6 Stadieneinteilung und Grading	23
4.1.7 Prognosefaktoren und Scores	24
4.1.8 Therapie des nicht-metastasierten Nierenzellkarzinoms	25
4.1.9 Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms	26
4.2 Die Rezeptortyrosinkinase c-MET	29
4.2.1 Aufbau und Funktion	29
4.2.2 Der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Cabozantinib	31
4.3 PD-1 und PD-L1	32
4.3.1 Aufbau und Funktion	32
4.3.2 Die Checkpoint-Inhibitoren	34
4.4 Fragestellung	35
5. Material und Methodik	36
5.1 Klinisch-histopathologische Charakteristika des Patientenkollektivs	36
5.2 Materialliste	38
5.3 Immunhistochemische Färbung von c-MET	40
5.3.1 Etablierung	40
5.3.2 Optimiertes immunhistochemisches Protokoll für c-MET	40
5.3.3 Auswertung von c-MET	42
5.4 Immunhistochemische Färbung von phosphoryliertem c-MET (p-MET)	43
5.4.1 Etablierung	43

5.4.2 Etabliertes immunhistochemisches Protokoll für p-MET auf kryokonserviertem Gewebe.....	47
5.5 Auswertung von PD-L1	47
5.6 Statistische Auswertung.....	48
6. Ergebnisse.....	49
6.1 Charakterisierung des Kollektivs anhand klinisch-histopathologischer Parameter.....	49
6.1.1 Gesamt- und Metastasenfreies-Überleben	49
6.1.2 T-Stadium.....	50
6.1.3 Nodalstatus	53
6.1.4 Metastasierung.....	54
6.1.5 Grading	56
6.2 Charakterisierung und Analyse der c-MET-Expression	57
6.2.1 Profil der c-MET-Expression.....	57
6.2.2 Assoziation von c-MET mit klinisch-histopathologischen Parametern	61
6.2.2.1 Assoziation von c-MET-membranös mit klinisch-histopathologischen Parametern.....	62
6.2.2.2 Assoziation von c-MET-zytoplasmatisch mit klinisch-histopathologischen Parametern.....	65
6.3 Überlebensanalyse bezüglich der c-MET-Expression	66
6.3.1 Analyse von c-MET-membranös gruppiert nach Median.....	66
6.3.2 Analyse von c-MET-zytoplasmatisch gruppiert nach Median	68
6.3.3 ROC-Analyse	70
6.3.4 Analyse von c-MET-membranös gruppiert nach ROC-Trennwert	72
6.3.5 Analyse von c-MET-zytoplasmatisch gruppiert nach ROC-Trennwert.....	73
6.4 Korrelationsanalyse von c-MET und PD-L1.....	75
6.5 Überlebensanalyse der Kombination aus c-MET- und PD-L1-Expression	77
6.5.1 Kombinierte Analyse von c-MET-membranös und PD-L1	77
6.5.1.1 c-MET-membranös gruppiert nach Median	77
6.5.1.2 c-MET-membranös gruppiert nach ROC-Trennwert.....	79
6.5.2 Kombinierte Analyse von c-MET-zytoplasmatisch und PD-L1.....	82
6.5.2.1 c-MET-zytoplasmatisch gruppiert nach Median.....	82
6.5.2.2 c-MET-zytoplasmatisch gruppiert nach ROC-Trennwert	84
6.6 Cox-Regression	87
6.6.1 Univariate Cox-Regression.....	87
6.6.2 Multivariable Cox-Regression.....	90
6.7 Analyse der p-MET-Expression.....	92
6.7.1 Etablierung	92

6.7.2 Immunhistochemie der klarzelligen kryokonservierten Gewebe	97
7. Diskussion	98
7.1 Patientencharakteristika	99
7.2 Analyse der c-MET-Expression	100
7.2.1 Etablierung und Auswertung der c-MET-Expression	100
7.2.2 Assoziation von c-MET mit klinisch-histopathologischen Parametern	102
7.2.3 Überlebensanalyse der c-MET-Expression	104
7.3 Korrelations- und Überlebensanalyse der c-MET- und PD-L1-Expression	106
7.4 Analyse der p-MET-Expression	109
7.4.1 Etablierung der p-MET-Expression	109
7.4.2 Probleme der Immunhistochemie	111
7.4.3 Auswertung der p-MET-Expression	113
7.5 Schlussfolgerung und Ausblick	115
8. Literaturverzeichnis	117
9. Publikationen	132
10. Dank	133
11. Lebenslauf	134

2. Verzeichnisse

2.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makroskopische und Mikroskopische Darstellung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (NZK).....	21
Abbildung 2: Sonographischer Befund eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms.....	22
Abbildung 3: Struktur von c-MET und aktivierter Signalwege.....	31
Abbildung 4: PD-1/PD-L1 Signalweg.....	33
Abbildung 5: LSAB-Methode der immunhistochemischen Färbung	42
Abbildung 6: Immunhistochemische Two-step indirekte Methode des Peroxidase/DAB Systems	46
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben aller Patienten.....	50
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben aller Patienten	50
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf das pT-Stadium	52
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf das pT-Stadium	52
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den Nodalstatus.....	53
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf die Metastasierung mit der Unterscheidung früh und spät metachron	55
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf die Metastasierung.....	55
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf das Grading	56
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf das Grading	57
Abbildung 16: Repräsentative immunhistochemische c-MET-Färbung an einem Tumorgewebeschnitt	58
Abbildung 17: Beispiele für die membranöse Expression von c-MET in Tumorgewebeschnitten bei 40-facher Vergrößerung	58
Abbildung 18: Beispiele für die zytoplasmatische Expression von c-MET in Tumorgewebeschnitten bei 40-facher Vergrößerung	59
Abbildung 19: Histogramm des H-Scores für die membranöse c-MET-Expression.....	60
Abbildung 20: Histogramm des H-Scores für die zytoplasmatische c-MET-Expression	60

Abbildung 21: Streudiagramm zur Assoziation von membranöser c-MET-Expression und dem pT-Stadium.....	63
Abbildung 22: Streudiagramme zur Assoziation von membranöser c-MET-Expression und verschiedenen Untergruppen der Metastasierung	64
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den c-MET-m-Status gruppiert nach Median.....	67
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den c-MET-m-Status gruppiert nach Median.....	68
Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den c-MET-z-Status gruppiert nach Median	69
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den c-MET-z-Status gruppiert nach Median.....	70
Abbildung 27: ROC-Analyse des membranösen H-Scores.....	71
Abbildung 28: ROC-Analyse des zytoplasmatischen H-Scores	71
Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den c-MET-m-Status gruppiert nach ROC-Trennwert	72
Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve und Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den c-MET-m-Status gruppiert nach ROC-Trennwert	73
Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den c-MET-z-Status gruppiert nach ROC-Trennwert.....	74
Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den c-MET-z-Status gruppiert nach ROC-Trennwert	75
Abbildung 33: Streudiagramm zur Korrelation der membranösen c-MET- und PD-L1-Expression	76
Abbildung 34: Streudiagramm zur Korrelation der zytoplasmatischen c-MET- und PD-L1-Expression	76
Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den kombinierten c-MET-m (gruppiert nach Median) und PD-L1 Status.....	78
Abbildung 36: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den kombinierten c-MET-m (gruppiert nach Median) und PD-L1 Status.....	79
Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den kombinierten c-MET-m (gruppiert nach ROC) und PD-L1 Status	81
Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den kombinierten c-MET-m (gruppiert nach ROC) und PD-L1 Status	81

Abbildung 39: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den kombinierten c-MET-z (gruppiert nach Median) und PD-L1 Status.....	83
Abbildung 40: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den kombinierten c-MET-z (gruppiert nach Median) und PD-L1 Status.....	84
Abbildung 41: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den kombinierten c-MET-z (gruppiert nach ROC) und PD-L1 Status.....	85
Abbildung 42: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den kombinierten c-MET-z (gruppiert nach ROC) und PD-L1 Status	86
Abbildung 43: p-MET-Immunhistochemie vom klarzelligen NZK (FFPE) in 10-facher Vergrößerung	92
Abbildung 44: p-MET-Immunhistochemie vom papillären NZK (FFPE) in 40-facher Vergrößerung.	94
Abbildung 45: p-MET-Immunhistochemie vom papillären NZK (FFPE) in 5-facher Vergrößerung.	94
Abbildung 46: p-MET-Immunhistochemie von KTCTL26 Zellen in 40-facher Vergrößerung .	95
Abbildung 47: Immunhistochemische Färbung von kryokonserviertem papillären NZK-Gewebe in 60-facher Vergrößerung	96
Abbildung 48: Immunhistochemische Färbung von kryokonserviertem klarzelligen NZK-Gewebe in 40-facher Vergrößerung	97

2.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO Klassifikation der Nierentumore 2022	20
Tabelle 2: 2017 TNM-Klassifikation der Nierentumore.....	24
Tabelle 3: Stadieneinteilung von Nierentumoren	24
Tabelle 4: IMDC-Kriterien	27
Tabelle 5: Prognose nach IMDC.....	28
Tabelle 6: Systemtherapieoptionen gemäß Risikoprofil in der Erstlinientherapie	28
Tabelle 7: Systemtherapieoptionen gemäß Vorthherapie in der Zweitlinientherapie	29
Tabelle 8: Zusammenfassung der klinischen und histopathologischen Charakteristika des Kollektivs	37
Tabelle 9: Mittleres und 5-Jahresüberleben von OS und MFS bezüglich pT-Stadium.....	51
Tabelle 10: Mittelwerte und Mediane der H-Scores von c-MET-m und c-MET-z bezüglich klinisch-histopathologischer Parameter	62
Tabelle 11: Nicht-parametrische Testung von c-MET-m mit klinisch-histopathologischen Parametern	65
Tabelle 12: Nicht-parametrische Testung von c-MET-z mit klinisch-histopathologischen Parametern	66
Tabelle 13: Korrelationsanalyse von c-MET und PD-L1.....	75
Tabelle 14: Univariate Cox-Regression	89
Tabelle 15: Multivariable Cox-Regression	91

2.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.dest.	Aqua destillata
(p-)Akt	(phosphorylierte) Protein-Kinase B
AP	Alkalische Phosphatase
AQUA	Automated quantitative analysis
AUC	Area under curve
Axl	Griech.: anexelektro
BAP1	BRCA1 assoziiertes Protein 1
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
cm	Centimeter
c-MET	Mesenchymal-epithelial transition factor
c-MET-m	membranöse c-MET-Expression
c-MET-z	zytoplasmatische c-MET-Expression
CPI	Checkpoint-Inhibitor
CSS	Cancer-Specific Survival
CST	Cell Signaling Technology
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EPO	Erythropoietin
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
FBS	Fetal bovine serum
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FLT3	fms like tyrosine kinase 3
GAB1	GRB2-associated-binding protein 1
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HGF	Hepatocyte growth factor

HIF1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HO-1	Heme oxygenase-1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IMDC	International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium
IPT	immunoglobulin-like regions in plexins and transcription factors
IRS	Immunoreactive Score
ISUP	International Society of Urological Pathology
ITIM	cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
ITSM	immunoreceptor tyrosine-based switch motif
kDA	Kilodalton
KDM5C	Lysine-specific demethylase 5C
(95%) KI	(95%-iges) Konfidenzintervall
LDH	Lactatdehydrogenase
LSAB	Labeled Straptavidin-Biotin
MAP(K)	Mitogen-Activated Protein (kinase)
MFS	Metastasis-Free Survival
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MRD1	Multidrug-Resistance-Protein 1
MRT	Magnetresonanztomographie
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
n.b.	nicht berechnet
NK	Negativkontrolle
NSCLC	Non-small-cell lung cancer
NZK	Nierenzellkarzinom
OS	Overall Survival
PBRM1	Polybromo 1
PBS	phosphate buffered saline
PD-1	Programmed cell Death protein 1
PD-L1/2	Programmed cell Death-ligand 1/2
PFS	Progression-free Survival

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
p-MET	Phosphoryliertes MET
PSI	plexin-semaphorin-integrin
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RET	Ret proto-oncogene
RKI	Robert-Koch-Institut
ROC	Receiver Operating Characteristic
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SETD2	SET domain containing 2
SIR	Standardized Incidence Ratio
SSIGN	Stage, Size, Grade and Necrosis
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Tab.	Tabelle
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TMA	Tissue microarray
TNM	Tumor-Nodes-Metastasen
Tyr	Tyrosin
UCLA	University of California Los Angeles
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UISS	UCLA Integrated Staging System
VEGF(R)	Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)
VHL	Von-Hippel-Lindau
vs.	versus
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

3. Zusammenfassung

3.1 Deutsche Zusammenfassung

Aufgrund der schlechten Prognose des klarzelligen Nierenzellkarzinoms insbesondere im fortgeschrittenen/metastasierten Stadium ist die Untersuchung molekularer Marker zur Verbesserung des Therapieerfolgs von großem Interesse. Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-MET, welche an Proliferation, Angiogenese sowie Metastasierung beteiligt ist, wird als prognostischer Faktor in verschiedenen Tumorentitäten diskutiert. In dieser Arbeit soll ihre prognostische Wertigkeit sowie die Eignung als Therapietarget im klarzelligen Nierenzellkarzinom untersucht werden. Außerdem stellt die Kombination von Cabozantinib, welches neben anderen Targets c-MET adressiert, und einem Immuncheckpoint-Inhibitor eine aktuelle Erstlinien-Therapieoption im metastasierten Stadium dar. In anderen Tumorentitäten wurde bereits eine c-MET abhängige PD-L1 Regulation beobachtet, sodass eine mögliche Korrelation dieser beiden Marker sowie deren gemeinsame prognostische Relevanz im klarzelligen Nierenzellkarzinom analysiert werden soll. Für weitere Erkenntnisse wird der Fokus abschließend auf die Expression der bisher nur wenig untersuchten Aktivierungsform p(hosphoryliertes)-MET gelegt.

Die c-MET-Expression wurde mittels Immunhistochemie an formalin-fixierten und in paraffin-eingebetteten Proben (FFPE) von 70 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom, welche zwischen 2010 und 2021 partiell oder radikal nephrektomiert wurden, analysiert. Das Expressionslevel wurde durch den semi-quantitativ ermittelten H-Score festgelegt. Anschließend wurde unter Verwendung von Mann-Whitney-U und Kruskal-Wallis Tests eine mögliche Korrelation mit klinisch-histopathologischen Parametern statistisch geprüft. Sowohl der Median als auch der durch die Receiver Operation Characteristics (ROC) Kurvenanalyse ermittelte optimale Trennwert des H-Scores definierten zwei Gruppen für die Überlebensanalyse: c-MET^{stark} oberhalb und c-MET^{schwach} unterhalb des Trennwertes. Anhand des Log-Rank-Tests von Kaplan-Meier-Kurven wurde die prognostische Wertigkeit analysiert. Die univariate und multivariable Cox-Regression prüften den Einfluss der untersuchten Variablen auf das Überleben. Der Zusammenhang zwischen c-MET und den aus einer anderen Doktorarbeit stammenden Daten zur PD-L1-Expression wurde mittels Korrelationsanalyse bestimmt.

C-MET war sowohl membranös (c-MET-m) als auch zytoplasmatisch (c-MET-z) exprimiert, wobei Ersteres höhere Expressionslevel aufwies. Es konnte eine Assoziation von c-MET-m mit klinisch-histopathologischen Parametern beobachtet werden. Das Stadium pT3 wies eine signifikant höhere Expression als pT1 und pT2 auf ($p=0,010$ und $p=0,043$). Das Auftreten von Metastasen war signifikant mit erhöhter c-MET-m-Expression korreliert ($p=0,005$), wobei

Patienten mit synchroner und früh metachroner (≤ 24 Monate) Metastasierung gegenüber denjenigen ohne Metastasierung eine signifikant höhere Expression aufwiesen ($p=0,007$ und $p=0,015$). Nach Trennung durch die ROC-Analyse zeigten Patienten der Gruppe c-MET-m^{stark} ein signifikant kürzeres Gesamt- (OS) und metastasenfreies Überleben (MFS) als die der Gruppe c-MET-m^{schwach} ($p=0,029$ und $p=0,001$). In der multivariablen Analyse bestätigte sich dieser Marker als unabhängiger Risikofaktor für das metastasenfreie Überleben. Im Gegensatz dazu konnte der c-MET-z-Expression weder nach Trennung durch den Median noch durch den ROC-Trennwert eine prognostische Wertigkeit zugeschrieben werden. Wir fanden eine signifikante Korrelation zwischen c-MET-m- und PD-L1-Expression (Spearman-Korrelation $r=0,342$; $p=0,007$). Die Kombination beider Marker ergab ein signifikant längeres Gesamt- und metastasenfreies Überleben bei Patienten mit c-MET-m^{schwach} (gruppiert nach ROC) und PD-L1-Negativität, die Variablen c-MET-m^{stark}/PD-L1+ und c-MET-m^{schwach}/PD-L1+ waren in der multivariablen Analyse für das metastasenfreie Überleben mit einer signifikanten Risikosteigerung verbunden. Auch die kombinierte Betrachtung von c-MET-z (gruppiert nach ROC) und PD-L1 wies einen signifikanten Unterschied beim metastasenfreien Überleben auf, jedoch ohne Risikosteigerung in der Cox-Regression. Nach umfangreichen Etablierungsversuchen der p-MET-Immunhistochemie und Untersuchung möglicher Fehlerquellen ergab sich die Fixierung der FFPE-Präparate am ehesten als einschränkender Faktor. Eine spezifische Färbung gelang jedoch an kryokonservierten Gewebeschnitten. Da ein solches Präparat nicht von jedem Patienten des Kollektivs vorhanden und deren Qualität unzureichend war, konnte keine Analyse erfolgen.

In dieser Arbeit wurde die membranöse c-MET-Expression als signifikanter negativer prognostischer Parameter im klarzelligen Nierenzellkarzinom identifiziert. Auch die Kombination mit PD-L1 ergab eine negative prognostische Wertigkeit. Unsere Daten bestätigen c-MET als ein geeignetes Therapieziel bei fortgeschrittener/metastasierter Erkrankung und unterstützen die kombinierte Adressierung beider Targets. Aufgrund der signifikanten Korrelation der beiden Marker müssen Signalweginteraktionen und daraus resultierend mögliche synergistische Effekte bei Ko-Inhibition von c-MET und PD-L1 weiter untersucht werden. Die verwendeten Antikörper gegen p-MET waren für unsere formalinfixierten Gewebe nicht geeignet. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die bisher im klarzelligen Nierenzellkarzinom weitestgehend unbekannte Relevanz von p-MET zu ergründen. Die Erkenntnisse dieser Arbeit können dabei als Anhaltspunkt für Folgearbeiten dienen.

3.2 Englische Zusammenfassung/Abstract

Prognostic value of c-MET in clear cell Renal Cell Carcinoma in correlation with PD-L1 status

Due to the poor prognosis of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) especially in advanced disease, the examination of molecular markers plays a crucial role to improve the therapy efficacy. The receptor tyrosine kinase c-MET, which is involved in proliferation, angiogenesis and metastasis is widely discussed as a prognostic factor in various tumor types. We aimed to investigate its prognostic value and suitability as a therapy target in clear cell renal cell carcinoma. Moreover, one of the current first-line therapy options in metastatic disease is a combination of the tyrosine kinase-inhibitor Cabozantinib, which among other targets addresses the receptor tyrosine kinase c-MET, and an immune checkpoint-inhibitor. Considering a possible c-MET-dependent PD-L1 regulation as observed in other tumor entities, we examined a possible correlation between those two markers and their prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. Finally, this thesis focused on the expression of the active form p(hosphorylated)-MET, that has been little studied so far.

The expression of c-MET was analyzed by immunohistochemistry of clear cell renal cell carcinoma formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples from 70 patients who underwent partial or radical nephrectomy between 2010 and 2021. The protein expression level was defined by the semi-quantitative H-score and further correlated with clinico-histopathological parameters using Mann-Whitney-U and Kruskal-Wallis tests. For survival analysis, Receiver Operation Characteristics (ROC) curve analysis as well as the calculated median defined an H-score threshold for two patient groups: c-MET^{strong} above and c-MET^{weak} below the cut-off. The prognostic value was investigated by Kaplan-Meier curves with log-rank-tests. The influence of the tested variables on survival was determined by univariate and multivariate Cox-Regression analyses. In a correlation analysis c-MET expression was set in relationship with PD-L1 expression, whose data were provided by another doctoral thesis.

c-MET was found both on membrane (c-MET-m) and in the cytoplasm (c-MET-ct) with higher expression on membrane. Overall, we observed that c-MET-m was associated with clinical-histopathological features. The stage pT3 showed significant higher expression than pT1 and pT2 ($p=0.010$ und $p=0.043$). Moreover, high c-MET-m expression significantly correlated with metastatic clear cell renal cell carcinoma ($p=0.005$) in which patients with synchronous and early metachronous (≤ 24 months) disease had significant higher c-MET-m expression than those without metastasis ($p=0.007$ and $p=0.015$). Patients with c-MET-m^{strong} score grouped after ROC-analysis had significant shorter overall (OS) and metastasis free survival (MFS) than those with c-MET-m^{weak} expression ($p=0.029$ and $p=0.001$). C-MET-m was confirmed as

an independent risk factor for metastasis free survival by multivariate analysis. In contrast, no prognostic value could be attributed to c-MET-ct expression in any test. We found a significant correlation between c-MET-m and PD-L1 expression (Spearman-correlation $\rho=0.342$; $p=0.007$). The combination of both markers resulted in significantly longer overall and metastasis free survival in patients with c-MET-m^{weak} (grouped after ROC) and PD-L1 negativity. The status c-MET-m^{strong}/PD-L1+ and c-MET-m^{weak}/PD-L1+ were associated with a significant increased risk for the metastasis free survival in multivariate analysis. The combined consideration of c-MET-ct and PD-L1 also showed a significant difference in metastasis free survival, but without an increased risk in cox-regression. After extensive attempts to establish p-MET-immunohistochemistry and investigation of possible sources of error, the fixation of the FFPE samples proved to be the most limiting factor. However, a specific staining was successful on cryoconserved sections. The limited access to cryo-sections and their inadequate quality did not allow analysis in this cohort.

In this study, membranous c-MET expression was identified as a significant negative prognostic parameter in clear cell renal cell carcinoma. The combination with PD-L1 also revealed a negative prognostic value. Overall, our data confirmed c-MET as an appropriate therapy target in advanced/metastatic disease and support the combined addressing of both targets. As we found a significant correlation between c-MET and PD-L1, a possible signaling loop and a likely synergistic effect in co-inhibition of c-MET and PD-L1 has to be further investigated. The failed immunohistochemical examination of the p-MET expression indicates that the available antibodies cannot detect the antigens in our formalin-fixed samples. Further exploration is necessary to assess the unknown relevance of p-MET in clear cell renal cell carcinoma. The findings of this thesis can serve as informative basis for further investigations.

4. Einleitung; eigene Fragestellung

4.1 Das Nierenzellkarzinom

4.1.1 Epidemiologie

Bei ca. 95% aller bösartigen Neubildungen der Niere handelt es sich um Nierenzellkarzinome [166]. Hierbei gibt es einen deutlichen Unterschied in der Geschlechterverteilung, wobei Männer fast doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen. Im Jahr 2022 wurden bei der weiblichen Bevölkerung knapp 4800, bei der männlichen knapp 9050 Neuerkrankungen in Deutschland verzeichnet [166]. Damit stellt das Nierenzellkarzinom die häufigste bösartige Neuerkrankung im Urogenitaltrakt beim weiblichen Geschlecht dar [78]. Bei Männern hingegen steht hier das Prostatakarzinom auf Platz 1, gefolgt vom Urothelkarzinom der Harnblase, am dritthäufigsten reiht sich die Niere ein [78]. Insgesamt befand sich das Nierenzellkarzinom im Jahr 2020 beim männlichen Geschlecht unter den 10 häufigsten Krebserkrankungen, beim weiblichen auf Platz 11 [78]. Die Inzidenz des Nierenzellkarzinoms weist einen Anstieg auf, was insbesondere in Regionen mit hohem Einkommen dem Anstieg abdomineller Bildgebung und der damit verbundenen zufälligen Entdeckung von Raumforderungen der Niere geschuldet sein könnte [23] [174]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt mit 68 Jahren bei Männern knapp unter dem von Frauen mit 71 Jahren [166]. Die Prognose ist jedoch vergleichsweise günstig mit einem relativen 5-Jahres-Überleben von 77% (männlich) bzw. 79% (weiblich) [166], wobei hier das Stadium bei Entdeckung der Erkrankung eine entscheidende Rolle spielt. Etwa 50% der Karzinome werden in frühen Stadien erkannt (UICC I/II) [166]. Laut dem Tumorregister München der Jahre 1998-2020 wiesen UICC I Tumore eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 98,5%, Tumore des Stadiums II von 89% und des Stadiums III von 73% auf, deutlich niedriger fiel dies bei fortgeschrittenen Tumoren im Stadium IV mit 18 % aus [144].

4.1.2 Ätiologie

Es konnten in der Vergangenheit einige Risikofaktoren ermittelt werden, welche die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms begünstigen. Zum einen zählt das Übergewicht zu den erwiesenen Risikofaktoren [3]. In einer großen prospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass das Körpergewicht stark positiv mit dem Risiko für das Nierenzellkarzinom assoziiert ist [3]. Interessanterweise spielte der BMI in dieser Studie in höherem Alter eine entscheidendere Rolle als in jüngerem [3]. Darüber hinaus wurde eine positive Assoziation zwischen Taille-Hüfte-Verhältnis und dem Nierenzellkarzinom bei Frauen beobachtet [3]. Als weiterer Risikofaktor konnte das Rauchen identifiziert werden [60]. Eine Metaanalyse von 24 Studien

beleuchtete diesen Aspekt genauer, wobei sich ein dosisabhängiger Anstieg des Risikos für ein NZK je nach Anzahl der Zigaretten pro Tag sowie eine erhebliche Risikoreduktion bei ehemaligen Rauchern, welche seit langer Zeit abstinent sind, zeigte [60]. Der Blutdruck stellt ebenfalls einen Risikofaktor dar [35]. Bezüglich des diastolischen Blutdrucks bei Männern war in einer schwedischen Studie das Risiko für ein Nierenzellkarzinom bei einem Wert ≥ 90 mmHg mehr als verdoppelt, verglichen mit einem Blutdruck unter 70 mmHg [35]. Beim systolischen Blutdruck erhöhte sich das Risiko um 60-70% bei einem Wert ≥ 150 mmHg, verglichen mit einem Blutdruck unter 120 mmHg [35]. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass eine Blutdruckreduktion das Risiko für die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms senken konnte [35]. Neben den modifizierbaren Risikofaktoren konnte die terminale Niereninsuffizienz als nicht-modifizierbarer Risikofaktor identifiziert werden [21]. In einer retrospektiven Kohortenstudie in den USA wurde die Inzidenz verschiedener Krebserkrankungen bei Hämodialyse-Patienten analysiert, wobei das Risiko für Nieren- (SIR 4.03) und Blasenkrebs (SIR 1.57) am stärksten erhöht war [21]. Als weiterer Risikofaktor gilt die erhöhte Exposition gegenüber Trichlorethylen, meist im beruflichen Kontext [69]. Dies hatte auch zur Folge, dass die berufliche Exposition gegenüber Trichlorethylen in die Liste der Berufskrankheiten aufgenommen wurde [20]. Als Letztes sind noch genetisch bedingte Erkrankungen zu nennen, welche etwa 3% der Nierenzellkarzinome ausmachen [96]. Frühes Erkrankungsalter, bilaterales und multifokales Auftreten, ein typisches histologisches Muster für das jeweilige Syndrom oder andere Manifestationen des entsprechenden Syndroms geben Hinweise auf eine hereditäre Form [102]. Am bekanntesten ist hier das von Hippel-Lindau-Syndrom. Bis zu 70% der Betroffenen entwickeln bis zum Alter von 60 Jahren ein Nierenzellkarzinom, welches bei diesen Patienten auch die führende Todesursache darstellt [145]. Neben klarzelligen Nierenzellkarzinomen sind Hämangioblastome der Retina und des Cerebellums, Phäochromozytome, Inselzelltumoren des Pankreas sowie Tumoren des Saccus endolymphaticus typisch für das Syndrom [102]. Nieren-, Pankreas- und Nebenhodenzysten treten ebenfalls auf [102]. Ursächlich ist die Inaktivierung des VHL-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 3p, wobei die meisten Fälle durch familiär vererbte Keimbahnmutation, nur 20% durch sporadische Neumutation bedingt sind [95] [145]. Nach dem „two-hit“ Modell von Knudson stellt die Keimbahnmutation bzw. somatische Mutation den „first hit“, eine weitere somatische Mutation im zweiten Allel den „second hit“ dar [74] [145]. Weitere Erkrankungen, die das Risiko für ein Nierenzellkarzinom erhöhen, sind das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom [124], das mit hereditärer Leiomyomatose assoziierte Nierenzellkarzinom [28], sowie das hereditäre papilläre Nierenzellkarzinom [6].

4.1.3 Klassifikation

Neben der histopathologischen Einteilung der Nierentumore gewinnt die molekulargenetische Klassifikation immer mehr an Bedeutung, weshalb sie auch in der WHO-Klassifikation von 2022 berücksichtigt wurde [105]. Nierenzellkarzinome machen hierbei den größten Anteil aller Nierentumore aus, wobei das klarzellige Nierenzellkarzinom den häufigsten Vertreter mit 70-90% darstellt, gefolgt vom papillären Nierenzellkarzinom mit 10-15% [153]. Beide Subtypen entwickeln sich aus dem proximalen Tubulus [8]. An dritter Stelle steht das chromophobe Nierenzellkarzinom (3-5%), welches wiederum aus Zellen des distalen Nephrons entstammt [153] [168]. Die weiteren Tumorentitäten, welche aus der Tabelle 1 entnommen werden können, sind selten.

Nierenzelltumore
<i>Klarzellige Nierentumore</i>
Klarzelliges Nierenzellkarzinom Multilokulärer zystischer Nierenzelltumor mit niedrig malignem Potential
<i>Papilläre Nierentumore</i>
Papilläres Adenom Papilläres Nierenzellkarzinom
<i>Onkozytäre und chromophobe Nierentumore</i>
Onkozytom Chromophobes Nierenzellkarzinom Andere onkozytäre Nierentumore
<i>Sammelgang-Tumore</i>
Sammelgang-Karzinom
<i>Andere Nierentumore</i>
Klarzelliger papillärer Nierenzelltumor Muzinöses tubulär und spindelzelliges Nierenzellkarzinom Tubulozystisches Nierenzellkarzinom Nierenzellkarzinom assoziiert mit erworbener zystischer Nierenerkrankung Eosinophiles solides und zystisches Nierenzellkarzinom Nierenzellkarzinom, nicht weiter spezifiziert
<i>Molekular definierte Nierenzellkarzinome</i>
TFE3-rearrangierte Nierenzellkarzinome TFEB-veränderte Nierenzellkarzinome ELOC (ehemals TCEB1) -mutiertes Nierenzellkarzinom Fumarathydratase-defizientes Nierenzellkarzinom

Hereditäre Leiomyomatose-assoziiertes Nierenzellkarzinom
Succinatdehydrogenase-defizientes Nierenzellkarzinom
ALK-rearrangierte Nierenzellkarzinome
Medulläres Karzinom, nicht weiter spezifiziert
SMARCB1-defizientes medullär anmutendes Nierenzellkarzinom
SMARCB1-defizientes undifferenziertes Nierenzellkarzinom, nicht weiter spezifiziert
SMARCB1-defiziente entdifferenzierte Nierenzellkarzinome anderer spezifischer Subtypen

Tabelle 1: WHO Klassifikation der Nierentumore 2022; entnommen aus und modifiziert nach [105], übersetzt ins Deutsche

4.1.4 Das klarzellige Nierenzellkarzinom

Die häufigste Entität des Nierenzellkarzinoms stellt der klarzellige Typ dar, welcher von Zellen des proximalen Tubulus ausgeht [8]. In ca. 90% der sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinome tritt ein Verlust des Chromosoms 3p auf [57]. Dies hat einen gleichzeitigen One-Copy-Verlust von vier Tumorsuppressorgenen zur Folge, welche aber auch einzeln in hoher Frequenz bei dieser Tumorentität mutiert sind (VHL, PBRM1, BAP1, SETD2) [57]. Die zuletzt genannten drei Gene kodieren für chromatin- und histonregulierende Proteine [56]. Eine weitere bekannte Mutation betrifft das ebenfalls an der Chromatinmodifikation beteiligte KDM5C, welches auf Chromosom Xp.11 lokalisiert ist [56]. Bis zu 92% der klarzelligen NZK weisen eine Inaktivierung des VHL-Gens auf [167]. VHL ist ein Tumorsuppressor, welcher wichtig für die Entstehung eines Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist, der wiederum HIF1 α abbaut [167]. Durch die VHL-Inaktivierung wird diese Ubiquitinierung gestört, sodass HIF1 α akkumuliert und in den Zellkern gelangt, wo es dann über die Transkription von HIF-Zielgenen wichtig für das Überleben der Tumorzelle ist und unter anderem die Angiogenese und Erythropoese durch VEGF und EPO fördert [167]. Makroskopisch geben klarzellige NZK ein heterogenes Bild ab, bestehend aus Nekrosen, Blutungen aufgrund starker Vaskularisierung, zystischen und gelborangen Gewebeanteilen [8] [153] (Abb.1). Mikroskopisch charakteristisch für diese Tumorentität sind Ballen aus hellen bis glasklaren Zellen [153]. Dieses klarzellige Aussehen entsteht durch das Herauslösen der Lipide und des Glykogens bei der histopathologischen Aufarbeitung [8] (Abb.1). Typischerweise sind die Zellen von einer gut sichtbaren Zellmembran umgeben und zeigen eine alveoläre, azinäre, zystische und solide Architektur [8].

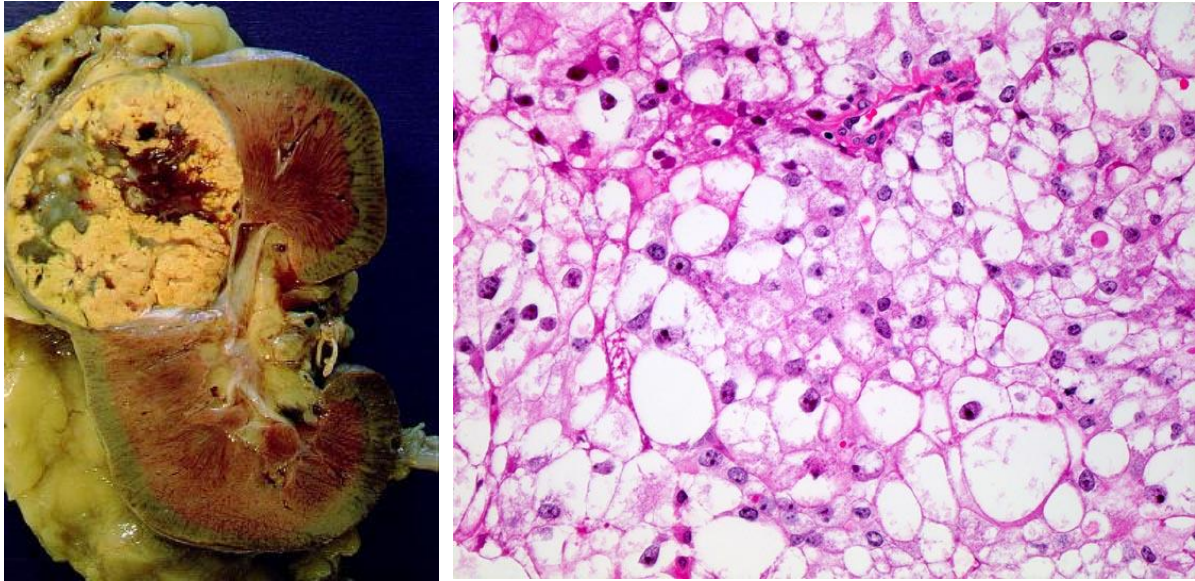


Abbildung 1: Makroskopische und Mikroskopische Darstellung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (NZK). Links: heterogene Makroskopie des klarzelligen NZK mit klarer Abgrenzung zum umliegenden Nierengewebe (entnommen aus [98]). Rechts: typischer klarzelliger Charakter der Tumorzellen im histologischen Präparat (entnommen aus [114]).

4.1.5 Symptome und Diagnostik

Heutzutage wird die Mehrheit der NZK, meist in Folge von abdomineller Bildgebung, die ursprünglich wegen einer anderen Fragestellung durchgeführt wurde, zufällig entdeckt [11]. In einer britischen Kohortenstudie belief sich dieser Anteil auf 60% [146]. Durch den weit verbreiteten Einsatz von CT, MRT und Ultraschall kann die steigende Inzidenz des NZK erklärt werden [113]. Nur bei etwa 30% der Patienten wird das NZK aufgrund der Symptome diagnostiziert [11]. Die klassische Trias aus Hämaturie, Flankenschmerzen und abdominalen Raumforderung tritt nur noch in 4-17% der Fälle auf [11]. Zufällig entdeckte Tumore weisen ein signifikant niedrigeres Stadium und auch Grading im Vergleich zu symptomatischen Tumoren auf [141]. Das Überleben ist bei diesen weniger aggressiven Befunden signifikant höher [141]. In einer Kohortenstudie wurden 87% der Patienten mit T1a Stadium und 36% mit T3 oder T4 Stadium zufällig diagnostiziert [146]. 10-40% der Patienten entwickeln ein paraneoplastisches Syndrom wie beispielsweise die Polycythämie oder das Stauffer-Syndrom [123]. Weitere Symptome wie Knochenschmerzen, persistierender Husten oder auch Fieber, Nachtschweiß und ungewollter Gewichtsverlust weisen auf eine Metastasierung hin [11] [43]. Die körperliche Untersuchung spielt bei der Diagnostik eine untergeordnete Rolle, dennoch ist auf Zeichen wie einen palpablen Tumor, zervikale Lymphknotenschwellung, sekundäre Varikozele oder untere Einflusstauung zu achten, welche allesamt mittels einer Bildgebung abgeklärt werden sollten [43]. Beim Labor sind insbesondere das Blutbild, Leberwerte, Nierenwerte, LDH, Calcium und alkalische Phosphatase relevant, um unter anderem auch

paraneoplastische Syndrome zu erkennen [11]. Darüber hinaus sollte eine Urinanalyse erfolgen [11]. Bei Patienten mit Einzelniere oder erhöhtem Kreatinin bzw. erniedrigter GFR wird eine seitengetrennte Szintigrafie zur Ermittlung der Nierenfunktion empfohlen [43]. In der Ultraschalluntersuchung, welche weit verbreitet zum Einsatz kommt, weist eine konturüberschreitende Raumforderung variabler Echogenität mit häufig echoarmem Randsaum auf einen Nierentumor hin [62] (Abb.2).



Abbildung 2: Sonographischer Befund eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms. Echoreiches Nierenzellkarzinom mit peritumoral echoärmerem Saum und Konturüberschreitung [62]; der Pfeil markiert das Karzinom, entnommen aus und modifiziert nach [62]

Zum Staging und zur Resektionsplanung soll laut den aktuellen S3-Leitlinien präoperativ eine Computertomographie nativ sowie mit früharterieller und venöser Phase von Leberkuppe bis Symphyse bzw. Niere bis Beckeneingang erfolgen [85]. Hierbei werden Ausbreitung des Primärtumors, Morphologie der betroffenen und kontralateralen Niere sowie der Nebenniere, Vergrößerung von Lymphknoten, sowie die venöse Beteiligung beurteilt [85]. Bei Verdacht auf eine Venen- oder Cavabeteiligung ist die Durchführung einer Magnetresonanztomographie empfohlen [85]. In einer prospektiven Studie zeigten sich keine Unterschiede in der Genauigkeit des Stagings zwischen CT und MRT [53]. Bei Tumoren > 3 cm wird laut aktuellen S3-Leitlinien ein Thorax-CT zum Ausschluss von pulmonalen Metastasen empfohlen, außerdem sollte bei klinischem Verdacht auf ossäre Metastasen ein Low Dose Ganzkörper-CT oder -MRT, bei Verdacht auf cerebrale Metastasen ein kontrastmittelgestütztes Schädel-MRT erfolgen [85]. Im Gegensatz zu soliden Raumforderungen werden zystische nach der Bosniak Klassifikation beurteilt. Laut der Version von 2019 ist eine zystische Läsion definiert,

wenn weniger als 25% ihrer Masse ein Enhancement zeigt [128]. Anhand einer CT- oder MRT-Bildgebung erfolgt die Einteilung in fünf Kategorien, welche Aussagen über das Malignitätsrisiko liefern [43]. Kriterien wie z.B. Morphologie und Dicke von Septen, sowie Kalzifikationen werden hierbei berücksichtigt [43]. Die Biopsie einer Raumforderung der Niere sollte vor ablativer Therapie erfolgen, wenn die Therapiewahl von dem Ergebnis abhängt, zur histopathologischen Sicherung vor systemischer Therapie oder auch bei metastasierter Erkrankung vor zytoreduktiver Nephrektomie [85]. Zystische Raumforderungen sollten hingegen nicht biopsiert werden [85].

4.1.6 Stadieneinteilung und Grading

Zur Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms wird die TNM-Klassifikation der UICC herangezogen, bei welcher Größe, Tumorausdehnung, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung berücksichtigt werden [46]. Während die Stadien T1 und T2 anhand der Tumorgöße definiert sind, steht die Infiltration von umgebenden Strukturen bei den beiden höchsten T-Stadien im Vordergrund. Die TNM-Klassifikation stellt den wichtigsten prognostischen Faktor im NZK dar und wird zur Therapieentscheidung herangezogen [153].

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Nachweis eines Primärtumors
T1	Tumor ≤ 7 cm in größter Ausdehnung, auf Niere begrenzt
T1a	Tumor ≤ 4 cm
T1b	Tumor > 4 cm, aber ≤ 7 cm
T2	Tumor > 7 cm in größter Ausdehnung, auf Niere begrenzt
T2a	Tumor > 7 cm, aber ≤ 10 cm
T2b	Tumor > 10 cm, auf Niere begrenzt
T3	Infiltration großer Venen oder des perirenenalen Bindegewebes, ipsilaterale Nebenniere nicht infiltriert, Gerota-Faszie nicht durchbrochen
T3a	Tumor infiltriert Vena renalis oder ihre Segmentäste oder das Nierenbeckenkelchsystem oder perirenales Bindegewebe, Gerota-Faszie nicht durchbrochen
T3b	Infiltration der Vena cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Infiltration der Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder der Vena cava Gefäßwand
T4	Tumor durchbricht Gerota-Faszie oder Befall der ipsilateralen Nebenniere

NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in regionalen Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2: 2017 TNM-Klassifikation der Nierentumore; entnommen aus und modifiziert nach [46], ins Deutsche übersetzt

Stadium			
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IV	T4	jedes N	M0
	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 3: Stadieneinteilung von Nierentumoren; entnommen aus [46], ins Deutsche übersetzt

Da der histologische Differenzierungsgrad einen weiteren Prognoseparameter im NZK darstellt [153], wird sowohl beim klarzelligen als auch papillären Nierenzellkarzinom der Tumorgrad nach WHO ISUP-Grading klassifiziert und zusätzlich der prozentuale Anteil an Tumornekrosen angegeben [85]. Das früher verwendete Fuhrmann-Grading wurde damit verlassen [104]. Beim chromophoben Nierenzellkarzinom sollte kein Grading erfolgen [85]. Das WHO ISUP-Grading beurteilt die Sichtbarkeit und Basophilie/Eosinophilie der Nukleolen, wobei das System von Grad 1 bis Grad 4 reicht [106]. Grad 4 zeichnet sich durch ausgeprägte Zellpolymorphien oder eine rhabdoide und/oder sarkomatoide Differenzierung aus [106].

4.1.7 Prognosefaktoren und Scores

Beim Nierenzellkarzinom werden anatomische, histologische, klinische und molekulare Prognosefaktoren unterschieden [45]. Tumorgröße und -ausbreitung sowie Metastasierung sind in der TNM-Klassifikation eingeschlossen, welche den anatomischen Prognosefaktor darstellt [45]. Zu den histologischen Prognosefaktoren zählen das Tumorgrading, der NZK-Subtyp, Nekrosen, eine lymphovaskuläre oder das Sammelsystem betreffende Invasion sowie die prozentuale sarkomatoide Komponente [4] [45]. Der Performance Status, die Symptomatik und noch einige Laborparameter wie beispielsweise das kleine Blutbild oder Albumin werden den klinischen Faktoren zugeordnet [45]. Zu den molekularen Prognosefaktoren werden die

Carboanhydrase IX, VEGF, Ki67, p53, PD-L1 und noch viele weitere Marker gezählt [45]. Deren routinemäßige klinische Untersuchung ist aber bisher nicht empfohlen [73] [45].

Häufig werden mehrere Prognosefaktoren in einem Modell oder Score kombiniert, um die Aussagekraft und Einschätzung der Prognose zu steigern [148]. Man unterscheidet hierbei präoperative von postoperativen Modellen, wobei Letztere aufgrund der präzisen pathologischen Informationen überlegen sind [85]. Die zwei postoperativ am häufigsten verwendeten Prognosemodelle bei lokalisiertem Stadium sind das UCLA Integrated Staging System (UISS) und der Mayo Clinic's SSIGN Score [148]. Im Gegensatz dazu kommen bei metastasiertem Stadium vor systemischer Therapie Risikoscores des Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre (MSKCC) und des International Metastatic Renal Cancer Database Consortium (IMDC) zum Einsatz [85] (siehe 4.1.9 Therapie des metastasierten NZK).

4.1.8 Therapie des nicht-metastasierten Nierenzellkarzinoms

Bei lokalisierten Tumoren ist der Goldstandard gemäß der aktuellen S3-Leitlinie die kurative chirurgische Resektion [85]. Handelt es sich um lokal begrenzte T1-Tumoren, so ist die Operation der Wahl die Nierenteilresektion [85]. Ob ein offenes, laparoskopisches oder robotisches Verfahren angewandt wird, richtet sich nach der Erfahrung des Operateurs [85]. Robotisch-assistierte Operationen wiesen in einer Metaanalyse signifikant niedrigere perioperative Komplikationen, geringere Blutverluste und kürzere Krankenhausaufenthalte, jedoch auch längere Operationszeiten verglichen mit der offenen Technik auf [158]. Ähnlich bei beiden Verfahren zeigten sich Ischämiezeit, Transfusionen, GFR-Änderung, frühes Krebs-Outcome und Gesamtkosten [158]. Weitere Indikationen für eine Nierenteilresektion sind eine anatomische/funktionelle Einzelniere, bilaterale Tumore, prädisponierende Syndrome wie das von-Hippel-Lindau-Syndrom, sowie chronische Nierenerkrankungen oder Erkrankungen, die die Niere potenziell schädigen (z.B. Diabetes mellitus) [77]. Lokale Tumoren >T1 sollten, wenn technisch machbar, ebenfalls nierenerhaltend operiert werden [85]. Ist dies nicht möglich, so ist eine Nephrektomie durchzuführen, vorzugsweise minimal-invasiv [85]. Zwischen laparoskopischer und offener radikaler Nephrektomie konnte während eines 5-jährigen Follow-Ups kein signifikanter Unterschied im Langzeitüberleben verzeichnet werden [135]. Bei unauffälliger Bildgebung oder intraoperativen Befund sollte keine systematische Lymphadenektomie sowie ipsilaterale Adrenalektomie durchgeführt werden [85]. Die systematische Lymphadenektomie bei Nephrektomie zeigte bisher keinen Vorteil im Gesamt- und progressionsfreien Überleben gegenüber der alleinigen Nephrektomie [15]. Liegen jedoch vergrößerte Lymphknoten vor, dann kann eine Lymphadenektomie im Sinne des Stagings und zur Kontrolle durchgeführt werden [85]. Ablative Verfahren wie die Kryo- oder Radiofrequenzablation können bei Patienten mit kleinen Tumoren und zusätzlich hoher

Komorbidität und auch geringer Lebenserwartung in Erwägung gezogen werden [85]. Dabei wird das Gewebe je nach Methode lokal durch Hitze oder Kälte zerstört [85]. Hiervor sollte eine Biopsie durchgeführt werden [85]. Eine Metaanalyse zeigte ähnliche Effektivität und Komplikationsraten bei beiden ablativen Verfahren [47]. Eine weitere Möglichkeit für diese Patientengruppe stellt die Active Surveillance dar [85], bei welcher erst therapeutisch eingegriffen wird, wenn eine Größenprogredienz des Tumors bei der regelmäßigen Bildgebung auffällt [149]. Hierbei muss daher das Risiko eines möglichen Fortschreitens der Erkrankung berücksichtigt werden [130]. Vor der aktiven Überwachung sollte ebenfalls eine Biopsie durchgeführt werden [85]. Laut aktueller S3-Leitlinie sollte außerhalb von Studien im nicht-metastasierten Stadium keine neoadjuvante Therapie erfolgen [85]. Auch eine adjuvante Therapie in Form einer postoperativen Bestrahlung oder zielgerichteten Therapie mit VEGF-TKIs wird nicht empfohlen [85]. Lediglich bei intermediär und Hochrisikopatienten kann eine adjuvante Therapie mit Pembrolizumab durchgeführt werden [85]. In der entsprechenden KEYNOTE-564 Studie war eine signifikante Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens gegenüber Placebo zu beobachten [33].

4.1.9 Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms

Obwohl Nierentumore immer früher erkannt werden und somit laut RKI im Zeitraum 2019/2020 etwa 60% der Nierenzellkarzinome im UICC I Stadium diagnostiziert wurden, wiesen dennoch 17% der Patienten bei Erstdiagnose ein UICC IV Stadium auf [79]. Bei 15% der Patienten liegen bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Metastasen vor, welche man dann als synchrone Metastasen bezeichnet [41]. Im Gegensatz dazu entwickeln 20% der Patienten ohne Metastasierung bei initialer Nephrektomie während des Follow-ups Metastasen, sogenannte metachrone Metastasen [41]. Die häufigste Lokalisation von Fernmetastasen ist die Lunge mit etwa 45%, gefolgt von Knochen (ca. 30%), Lymphknoten (ca. 22%) und der Leber (ca. 20%) [14]. Nur wenn sowohl der Primarius als auch die Metastasen vollständig reseziert werden können, ist ein kurativer Ansatz bei Solitär- oder Oligometastasen möglich [44]. Ist dies nicht der Fall, kann bei synchroner Metastasierung mit gutem Performance Status (ECOG 0-1) eine palliative zytoreduktive Nephrektomie erwogen werden, eine systemische Therapie ist außerdem von Nöten [85]. Eine randomisierte Studie zeigte ein längeres Überleben bei Patienten mit Nephrektomie und anschließender Interferontherapie, verglichen mit alleiniger Interferontherapie [48]. Im Falle einer metachronen Metastasierung sollte bei solitären Befunden eine lokale Therapie erfolgen [85]. Hierbei sind insbesondere die chirurgische Resektion oder Radiotherapie in Erwägung zu ziehen [85]. Bei symptomatischen Hirnmetastasen kann eine Radiotherapie erfolgen, resektable pulmonale Metastasen sollten operativ entfernt werden [85]. Zusätzlich ist eine systematische Lymphadenektomie zu

empfehlen, da eine mediastinale oder hiläre Metastasierung signifikant mit einem kürzeren Überleben assoziiert ist [85] [155].

Die beim fortgeschrittenen/metastasierten NZK erforderliche Systemtherapie unterscheidet sich von vielen anderen Tumorentitäten. Die klassische Chemotherapie spielt keine Rolle, da gerade das klarzellige NZK hohe Resistenzen gegenüber den gebräuchlichen Chemotherapeutika aufweist [85]. Dies liegt vor allem an der hohen MRD1-Expression in diesen Tumoren [54] [85]. Es handelt sich hierbei um Effluxpumpen, welche die Substanzen aktiv aus den Zellen herausbefördern [150]. Auch die Zytokintherapie mit Interleukin-2 oder IFN verliert aufgrund ihrer zahlreichen Nebenwirkungen [121] und mäßigem Nutzen [97] an Bedeutung und sollte nicht mehr alleine angewandt werden [85]. Laut den aktuellen S3-Leitlinien kommen in der Therapie des metastasierten klarzelligen Nierenzellkarzinoms folgende Substanzen zum Einsatz: Checkpoint- (Nivolumab, Pembrolizumab, Avelumab, Ipilimumab), Tyrosinkinase- (Cabozantinib, Axitinib, Lenvatinib, Pazopanib, Sunitinib, Tivozanib) und mTOR-Inhibitoren (Temozolomid, Everolimus) sowie VEGF-Antikörper (Bevacizumab) [85]. Als Erstlinientherapie gilt eine Kombinationstherapie aus Checkpoint-Inhibitor und Tyrosinkinaseinhibitor [85]. In den S3-Leitlinien sind Nivolumab + Cabozantinib (CheckMate-9ER-Studie [34]), Pembrolizumab + Axitinib (KEYNOTE-426-Studie [122]) und Pembrolizumab + Lenvatinib (CLEAR-Studie [108]) aufgeführt [85]. Generell sollte das IMDC-Risiko in die Auswahl der Erstlinientherapie miteinbezogen werden [85] (Tab.6). Mit diesem Score wird die Prognose beim metastasierten NZK beurteilt und anhand dieser dann die Therapiewahl getroffen. Es werden dabei 6 Faktoren berücksichtigt (Tab.4 und 5).

IMDC-Kriterien
Performance Status < 80%
Intervall von Diagnose bis zur Systemtherapie < 1 Jahr
Hämoglobin unterhalb des Normwertes
Hyperkalziämie
Neutrophile oberhalb des Normwertes
Thrombozyten oberhalb des Normwertes

Tabelle 4: IMDC-Kriterien; entnommen aus [85]

Prognose nach IMDC-Kriterien	Medianes Gesamtüberleben
Gutes Risikoprofil (0 Risikofaktoren)	43,2 Monate
Intermediäres Risikoprofil (1-2 Risikofaktoren)	22,5 Monate
Ungünstiges Risikoprofil (≥3 Risikofaktoren)	7,8 Monate

Tabelle 5: Prognose nach IMDC; entnommen aus [85]

Gemäß des Risikoprofils werden unterschiedliche Therapien empfohlen. Bei fehlendem Ansprechen oder sonstigen Komplikationen kann entsprechend der S3-Leitlinie auf Alternativen ausgewichen werden. In Tabelle 6 und 7 sind die unterschiedlichen Empfehlungen für die einzelnen Gruppen aufgeführt.

Therapielinie	Risikoprofil	Standardempfehlung = starke Empfehlung	Option
Erstlinie	niedrig	Cabozantinib + Nivolumab Pembrolizumab + Axitinib Pembrolizumab + Lenvatinib Avelumab + Axitinib (keine hinreichenden Überlebensdaten)	Pazopanib Sunitinib Tivozanib
Erstlinie	intermediär	Cabozantinib + Nivolumab Ipilimumab + Nivolumab Pembrolizumab + Axitinib Pembrolizumab + Lenvatinib Avelumab + Axitinib (keine hinreichenden Überlebensdaten)	Cabozantinib Sunitinib Pazopanib Tivozanib
Erstlinie	ungünstig	Cabozantinib + Nivolumab Ipilimumab + Nivolumab Pembrolizumab + Axitinib Pembrolizumab + Lenvatinib Avelumab + Axitinib (keine hinreichenden Überlebensdaten)	Cabozantinib Sunitinib

Tabelle 6: Systemtherapieoptionen gemäß Risikoprofil in der Erstlinientherapie; entnommen aus und modifiziert nach [85]

Therapielinie	Vorthherapie	Standardempfehlung = starke Empfehlung	Option
Zweitlinie	VEGF/R-Inhibitor	Cabozantinib Nivolumab	Lenvatinib + Everolimus Alternativ andere TKI
Zweitlinie	CPI		TKI-basierte Therapie
Zweitlinie	Kombination CPI/TKI		TKI-basierte Therapie
Zweitlinie	Temsirolimus		TKI Nivolumab

Tabelle 7: Systemtherapieoptionen gemäß Vorthherapie in der Zweitlinientherapie; entnommen aus und modifiziert nach [85]

4.2 Die Rezeptortyrosinkinase c-MET

4.2.1 Aufbau und Funktion

C-MET (mesenchymal-epithelial transition factor) ist eine Rezeptortyrosinkinase, welche auf der Oberfläche verschiedener Epithelzellen exprimiert wird [169]. Sie wird vom auf dem Chromosom 7q21-q31 befindlichen Proto-Onkogen MET kodiert [169]. C-MET ist ein Heterodimer, bestehend aus einer hoch glykosylierten 45 kDa extrazellulären α -Einheit und einer 145 kDa transmembranen β -Einheit, welche über eine Disulfidbrücke verbunden sind [83]. Als Transmembranprotein weist es eine membrandurchspannende Kette auf, welche wiederum aus mehreren Komponenten besteht: eine SEMA-Domäne (sema homology region) als Bindungsort des Liganden, eine PSI-Domäne (plexin-semaphorin-integrin) zur Stabilisierung dieser Interaktion, vier IPT-Domänen (immunoglobulin-like regions in plexins and transcription factors), eine Transmembran-Domäne, eine juxtamembranöse Domäne mit wichtiger Rolle bei der negativen Regulation von c-MET, eine Tyrosinkinase-(TK)-Domäne, sowie ein C(arboxyl)-Terminus [169]. Der ligandenabhängige Weg stellt den wichtigsten Aktivierungsmechanismus der RTK dar, wobei bereits auch ligandenunabhängige Mechanismen durch Genmutation oder Überexpression mit oder ohne Genamplifikation beschrieben wurden [109]. Der Ligand von c-MET ist HGF (hepatocyte growth factor), ein Heterodimer aus α - und β -Kette, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind [103]. Gebildet wird er von mesenchymalen Zellen, Fibroblasten sowie glatten Muskelzellen und agiert auf dem parakrinen Weg [169]. Bindet HGF an die SEMA-Domäne, so kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und Autophosphorylierung von Tyr-1230, Tyr-1234 und Tyr-

1235 in der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne [83] [169]. Dies hat wiederum eine Autophosphorylierung von Tyr-1349 und Tyr-1356 am C-Terminus zur Folge, was verschiedenste intrazelluläre Effektormoleküle wie GRB2, SRC, PI3K und GAB1 rekrutiert [169], wodurch Downstream-Signalwege wie Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt/mTOR und STAT3/5 aktiviert werden [83] (Abb.3). In diesem Zustand bezeichnet man den Rezeptor dann als p-MET (phosphoryliertes MET), was die aktive Form darstellt. Somit ist die Umwandlung von c-MET zu p-MET durch Phosphorylierung notwendig, um weitere Mechanismen in Gang zu setzen und somit die eigentliche Funktion des Rezeptors zu erwirken. Der HGF/c-MET Signalweg spielt in zellulären Vorgängen wie der Proliferation, Migration, Überleben, Morphogenese und epithelialer-mesenchymaler Transition (EMT) eine wichtige Rolle [151]. Darüber hinaus ist die HGF/c-MET Achse essentiell für die Regeneration der Leber, die Embryogenese der Organe und auch die Wundheilung [17] [147]. Die abnorme Aktivierung von c-MET kann die Entwicklung und Progression vieler Krebsarten begünstigen [147]. Mutationen im MET-Gen, Überexpression, Amplifikation und Rearrangement wurden bisher als mögliche Auslöser für solch eine Aktivierung beschrieben [120]. Beispielsweise wurden in einigen NSCLCs MET-Exon-14 Alterationen und MET-Gen Amplifikationen als führende Mechanismen für die Krebsentstehung identifiziert [42]. Darüber hinaus können diese abnormen Aktivitäten als kritischer Faktor für die Resistenz gegen Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren gesehen werden [169]. Inzwischen ist bekannt, dass c-MET mit anderen Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR in enger Verbindung steht. In Experimenten zum NSCLC wurde bei MET-TKI-Therapie eine Hochregulierung von EGFR beobachtet, wodurch die Resistenz gegenüber der Therapie erklärt wurde [101]. Des Weiteren konnte in unterschiedlichen Tumorentitäten ein Zusammenhang zwischen c-MET und dem an der Immunantwort beteiligten PD-L1 beobachtet werden. So führte die c-MET-Inhibition zu einer hochregulierten PD-L1 Expression im Adenokarzinom der Lunge [134], beim mit Sunitinib als Erstlinientherapie behandelten metastasierten klarzelligen Nierenzellkarzinom war eine Korrelation zwischen c-MET und PD-L1 erkennbar [67]. Darüber hinaus rückt c-MET im Hinblick auf die prognostische und prädiktive Wertigkeit immer mehr in den Vordergrund. In Bezug auf das klarzellige Nierenzellkarzinom sind die bisherigen Ergebnisse nicht einheitlich. So konnte in einer Studie von Jung et al. mit metastasierten und nicht-metastasierten Patienten eine hohe c-MET Expression als unabhängiger negativer prognostischer Faktor im klarzelligen NZK identifiziert werden [66], im Gegensatz dazu beobachteten Kammerer-Jacquet et al. bei ihrer metastasierten Kohorte nach Sunitinib-Behandlung keinen Unterschied beim OS und PFS bezüglich der c-MET Expression [67].

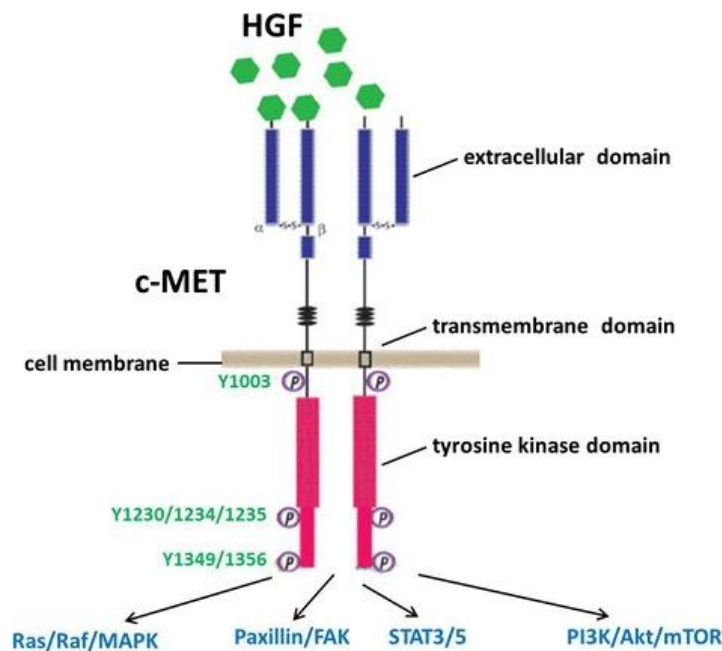


Abbildung 3: Struktur von c-MET und aktivierter Signalwege. Schematische Darstellung des c-MET-Rezeptors sowie seiner aktivierten Signaltransduktionswege (z.B. PI3K/AKT, MAPK/ERK, STAT3); entnommen aus [83]

4.2.2 Der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Cabozantinib

Cabozantinib ist ein oraler [32] Multityrosinkinase-Inhibitor, welcher MET und VEGFR2, aber auch RET, KIT, AXL und FLT3 hemmt [162]. Allen genannten Rezeptoren wird in der Krebsentstehung eine nicht zu vernachlässigende Rolle zugeschrieben [39] [107] [125]. Insbesondere die MET-Inhibition soll hier in Bezug auf das Nierenzellkarzinom in den Vordergrund gestellt werden. Durch Verhinderung der Phosphorylierung hemmt Cabozantinib sowohl das Wildtyp-MET, als auch das mutierte MET, welches jedoch weniger im klarzelligen als im papillären Nierenzellkarzinom nachgewiesen wurde [162]. Es wurde beobachtet, dass eine längerfristige Behandlung mit dem VEGFR-Inhibitor Sunitinib, welcher in der Erstlinien-Therapie des metastasierten NZK eingesetzt wird, eine Resistenz unter anderem durch Aktivierung anderer pro-angiogener Mechanismen hervorrufen kann [65]. Zu diesen Resistenzmechanismen gehört die Aktivierung des AXL- und MET-Signalwegs, wodurch das pro-metastatische Verhalten sowie die Angiogenese vorangetrieben werden [172]. Durch Blockierung dieses Signalwegs unter Einsatz von Cabozantinib kann dem Einhalt geboten werden [172]. Die CABOSUN Studie zeigte erstmals die bessere Wirksamkeit von Cabozantinib gegenüber Sunitinib bei metastasiertem NZK [32]. Sowohl die Ansprechraten auf die Therapie (20% vs. 9%), als auch das PFS (8,6 vs. 5,3 Monate) waren bei der alleinigen Cabozantinib-Behandlung deutlich höher [32].

Darüber hinaus besitzt der RTK-Inhibitor immunmodulatorische Eigenschaften, welche der tumorinduzierten Immunsuppression entgegenwirken [34]. In einem Maus-Melanom-Modell bewirkte die Checkpoint-Blockade eine MET-abhängige Rekrutierung von immunsuppressiven neutrophilen Granulozyten, welche die Antitumor-Aktivität der T-Zellen abschwächten. Durch die MET-Inhibition konnte die Neutrophilen-vermittelte Suppression verhindert und eine erhöhte Tumorantwort der Checkpoint-Inhibition bewirkt werden [50]. In der CheckMate 9ER Studie zeigte die Kombination aus Nivolumab und Cabozantinib ein doppelt so langes PFS gegenüber Sunitinib, sowie ein 49% niedrigeres Risiko für Progression oder Tod beim metastasierten NZK [34]. Außerdem wurden ein erhöhtes OS sowie eine erhöhte Ansprechwahrscheinlichkeit bei der Kombinationstherapie beobachtet [34].

4.3 PD-1 und PD-L1

4.3.1 Aufbau und Funktion

PD-L1 (programmed death ligand 1) ist der erste funktionell charakterisierte Ligand des coinhibitorischen PD-1 Rezeptors (programmed death receptor 1) [81]. Zusammen mit dem verwandten PD-L2 verhindert er die überschießende Aktivität von T-Zellen sowie die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und spielt somit eine wichtige Rolle in der Immuntoleranz [81] [133]. Kodiert wird er durch das PDCDL1-Gen auf Chromosom 9p24.1 und gehört zur B7-Proteinfamilie [81]. Bei PD-L1 handelt es sich um ein Transmembranprotein mit einer extrazellulären IgV- und IgC-ähnlichen Domäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einem 30 Aminosäure langen zytoplasmatischen Schwanz [81]. Der PD-1 Rezeptor, welcher sich vor allem auf Immunzellen wie B-, T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen befindet, kann zum einen natürlicherweise auf bestimmten Zellen exprimiert sein, zum anderen kann die Expression aber auch induziert werden [9] [80]. So ist PD-1 auf ruhenden T-Zellen nicht zu finden, nach deren Aktivierung erfolgt jedoch eine induzierte Expression [68]. Ähnlich verhält es sich mit PD-L1, welches auf Makrophagen, dendritischen Zellen, aktivierten T-Zellen, aber auch auf neoplastischen Zellen verschiedener Krebsentitäten und krebsassoziierten Fibroblasten zu finden ist [80] [164]. Es gibt zwei Mechanismen, intrinsisch und adaptiv, die zu einer PD-L1-Überexpression führen [80]. Durch genetische Aberrationen werden zelluläre Signalwege (beispielsweise AKT und STAT) aktiviert, welche wiederum intrinsisch die PD-L1 Expression erhöhen [80]. Der adaptive Mechanismus bezieht sich auf die Induktion der PD-L1-Expression durch die Tumormikroumgebung [80]. Ein bekannter Mechanismus ist die induzierte Expression als Reaktion auf Interferon γ , was unter anderem von aktivierten T-Zellen ausgeschüttet wird [80]. Der PD-1/PD-L1 Pathway kann von Tumorzellen genutzt werden, um der Überwachung des

Immunsystems zu entkommen [9]. Das überexprimierte PD-L1 auf der Oberfläche von Krebszellen bindet an das PD-1 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten und bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors [133] [164]. Daraufhin phosphorylieren Kinasen der Src-Familie die Tyrosinmotive ITIM (cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) und ITSM (the immunoreceptor tyrosine-based switch motif) [133]. Diese phosphorylierten Motive rekrutieren die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 [133]. Über weitere Proteine im T-Zell-Rezeptor-Signalweg wird letztendlich die T-Zell-Aktivierung abgeschwächt [133], sodass die Tumorzellen nicht angegriffen werden (Abb.4). Für eine Verstärkung der immunsuppressiven Umgebung des Tumors und damit Förderung des Tumorwachstums sorgen des Weiteren die PD-L1 exprimierenden Makrophagen, dendritische Zellen und krebsassoziierte Fibroblasten [164].

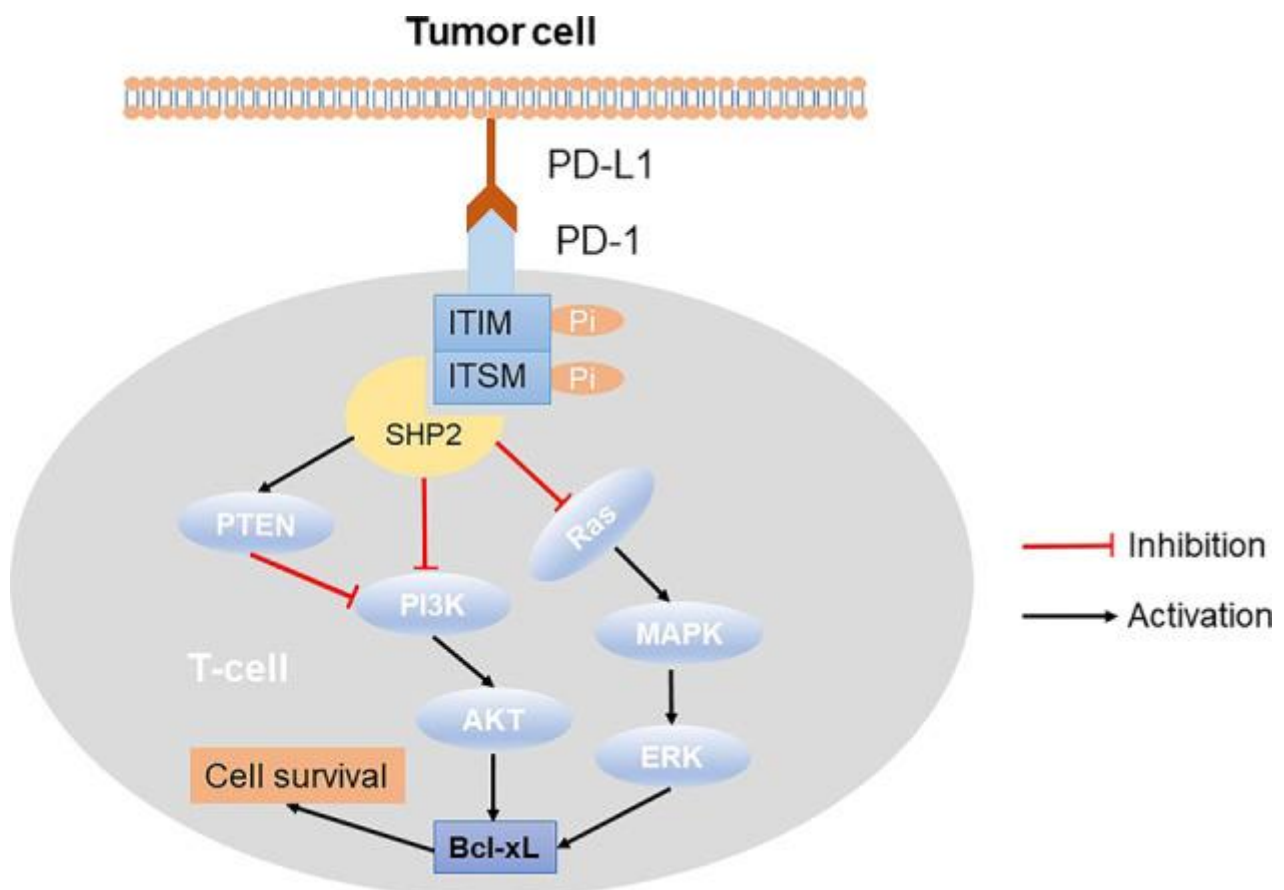


Abbildung 4: PD-1/PD-L1 Signalweg. Bindung von PD-L1 an PD-1 bewirkt Phosphorylierung von ITIMs und ITSMs in der intrazellulären Domäne von PD-1, was SHP-2 aktiviert, welches wiederum die Signalwege PI3K/AKT und Ras/MAPK/ERK hemmt. Diese Mechanismen führen zum Tod der T-Zelle; entnommen aus [157]

4.3.2 Die Checkpoint-Inhibitoren

Die Hemmung des PD-1/PD-L1 vermittelten Immunescapes von Tumorzellen eröffnete eine neue Möglichkeit der gezielten Krebsbehandlung [81]. Sogenannte Checkpointinhibitoren sind monoklonale Antikörper, welche bei vielen Tumorentitäten, häufig in Kombination mit anderen zielgerichteten Medikamenten, bereits Einzug in die Therapie gefunden haben [22] [81]. Bekannte Vertreter sind Pembrolizumab und Nivolumab (PD-1-Inhibitoren), die zur Erstlinie beim metastasiertem NZK zählen [85] oder Atezolizumab (PD-L1-Inhibitor), welches in der Therapie des NSCLC eingesetzt wird [131]. PD-1/PD-L1-Inhibitoren binden an ihr Zielmolekül, um die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 zu verhindern [136]. Es kommt zu keiner Konformationsänderung von PD-1, weshalb die folgenden Schritte nicht ablaufen (s. Kapitel 4.3.1). Die T-Zelle wird in ihrer Aktivität nicht gehemmt, sondern kann die Tumorzelle bekämpfen, wodurch der Immunescape ausbleibt [136]. In der KEYNOTE-426 Studie wurde die Kombination aus Pembrolizumab + Axitinib mit der alleinigen Sunitinib-Therapie beim metastasierten NZK verglichen [122]. Es zeigten sich signifikant höhere Ansprechraten (59,3% vs. 35,7%) und ein längeres PFS (15,1 vs. 11,1 Monate) bei der Kombi-Therapie [122]. Es ergab sich ein 47% niedrigeres Risiko, am Tumor zu versterben [122]. Auch die beiden anderen Kombinationen Pembrolizumab + Lenvatinib [108] und Nivolumab + Cabozantinib [34] wiesen eine höhere therapeutische Wirksamkeit gegenüber Sunitinib auf.

Da Checkpoint-Inhibitoren über eine immunaktivierende Wirkung verfügen, sind Entzündungen verschiedener Organe immer wieder zu beobachten. Mögliche Nebenwirkungen sind daher Colitis, Diarrhö, Pneumonitis, Hypophysitis, Thyreoiditis, Hepatitis, Exanthem, Pruritus oder auch Uveitis [22]. Obwohl der Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren einen Meilenstein der Krebstherapie darstellt, sind Resistenzen keine Seltenheit [136]. Man unterscheidet primäre Resistenzen, beispielsweise verursacht durch mangelnde Immunogenität des Tumors oder EGFR Mutationen von erworbenen Resistenzen durch T-Zell-Verlust, Hochregulation anderer Checkpoints etc. [136]. Daher rückt anstelle einer Monotherapie mit Checkpoint-Inhibitoren eine Kombinationstherapie immer mehr in den Fokus [22].

4.4 Fragestellung

Da das klarzellige Nierenzellkarzinom ein aggressiver Tumor ist und insbesondere im metastasierten Stadium lediglich eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 18% aufweist, besteht weiterhin ein hoher Bedarf, den Therapieerfolg auch bei fortgeschrittenen Erkrankungen zu verbessern. Hierfür ist es unabdingbar, die molekularen Mechanismen des Tumors besser zu verstehen und prognostische Parameter zur Individualisierung der Therapie zu entwickeln. C-MET wird als prognostischer Faktor in verschiedenen Tumorentitäten diskutiert. Um die Relevanz von c-MET im klarzelligen Nierenzellkarzinom zu ermitteln, sollen folgende Fragen in dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Ist c-MET mit klinisch-histopathologischen Parametern assoziiert?
2. Welche prognostische Wertigkeit hat c-MET in der Überlebensanalyse?

Zudem stellt die Kombination des Tyrosinkinase-Inhibitors Cabozantinib, welcher neben anderen Targets die Rezeptor-Tyrosinkinase c-MET adressiert, und eines Immuncheckpoint-Inhibitors eine aktuelle Erstlinien-Therapieoption im klarzelligen NZK dar. Unter Beachtung einer möglichen c-MET abhängigen PD-L1 Regulation, welche bereits in anderen Tumorentitäten beschrieben wurde, sollen deshalb folgende Fragen geklärt werden:

3. Besteht eine Korrelation zwischen der c-MET- und PD-L1-Expression?
4. Welche prognostische Wertigkeit besitzen c-MET und PD-L1 bei kombinierter Betrachtung in der Überlebensanalyse?

Voraussetzung für tumorbiologische Effekte von c-MET ist die Aktivierung (p(hosphoryliertes)-MET). P-MET wurde bisher im klarzelligen Nierenzellkarzinom kaum untersucht. Deshalb ist eine weitere Fragestellung dieser Arbeit:

5. Wie ist p-MET im Patientenkollektiv exprimiert?

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit soll eine Aussage über die prognostische Wertigkeit und Eignung von c-MET als Therapie-Target beim fortgeschrittenen/metastasierten klarzelligen NZK getroffen werden. Darüber hinaus kann die Arbeit Erkenntnisse über die Ko-Expression von c-MET und PD-L1 liefern, die wichtig für die in den Leitlinien empfohlene Ko-Inhibition von c-MET und PD-L1 sind.

5. Material und Methodik

5.1 Klinisch-histopathologische Charakteristika des Patientenkollektivs

Diese Arbeit schließt insgesamt 70 Patienten ein, welche vom Jahr 2010 bis 2021 an der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes nephrektomiert oder nierenteilreseziert wurden. Aus deren klarzelligen Primärtumoren wurden im Institut für allgemeine und spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes formalin-fixierte paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebeschnitte gewonnen. Es erfolgte eine Selektion der Patienten für diese Studie, um eine möglichst repräsentative Kohorte zu schaffen. Ein positives Ethikvotum (Aktenzeichen 141/14 und 25/23) liegt vor.

Das Kollektiv umfasst 46 Männer (65,7%) und 24 Frauen (34,3%), deren Durchschnittsalter zum OP-Zeitpunkt etwa 64 Jahre mit einer Range von 36 bis 84 Jahren betrug. Unterteilt nach Geschlecht ergab sich bei den Frauen im Kollektiv mit 65 Jahren ein etwas höheres mittleres Alter als bei den Männern mit 63,5 Jahren.

Das TNM-Stadium wurde jeweils durch Untersuchung des entnommenen Primärtumors (Zeitraum 2010 bis 2021) nach der zu diesem Zeitpunkt gültigen Klassifikation festgestellt. Im Nachhinein wurde keine erneute Einordnung anhand der aktuellen Klassifikation durchgeführt. Mit 35,7% ist das pT3-Stadium im Patientenkollektiv am häufigsten vertreten, wovon T3a deutlich häufiger (n=21 (30 %)) als T3b (n=4 (5,7 %)) vorkam. Das pT2-Stadium unterteilte sich nochmals in 21,4 % T2a und 4,3 % T2b (weitere 4,3% wurden nicht weiter in a oder b klassifiziert), das pT1-Stadium in 17,1 % T1a und 7,1 % T1b. 10% der Patienten wiesen ein T4-Stadium auf. Sowohl zum N- als auch M-Stadium konnten durch die größtenteils alleinige Entnahme des Primärtumors bei der Mehrheit der Patienten keine genaueren Angaben gemacht werden. Lediglich 20 Patienten wurden im pN-Stadium klassifiziert, davon 11 mit pN0- (15,7%), 6 mit pN1- (8,6%) und 3 mit pN2-Stadium (4,3%). Bei der Metastasierung erfolgte eine Einteilung von 25 Patienten, wovon 24 mit cM1 (34,3%) und ein Patient mit cM0 (1,4%) klassifiziert wurden.

Bezüglich des Gradings zeigten 3 Patienten eine gute Tumordifferenzierung (4,3%), wohingegen 17 eine mäßige (24,3%) und 21 eine schlechte Differenzierung (30%) aufwiesen. Auch hier war bei den verbliebenen Patienten kein Grading angegeben.

Im Verlauf des Beobachtungszeitraums zeigten 17 Patienten eine metachrone Metastasierung, wovon 11 Patienten früh metachrone (≤ 24 Monate) und 6 spät metachrone Metastasen entwickelten (> 24 Monate). Bei weiteren 25 Patienten konnte in dieser Zeit keine Metastasierung nachgewiesen werden. Mit 40 % war die synchrone (innerhalb der ersten drei Monate) Metastasierung der häufigste Vertreter im Kollektiv.

Die genannten Charakteristika des Kollektivs sind in folgender Tabelle nochmals zusammengefasst (Tab.8).

Charakteristika		Häufigkeit	In Prozent
Geschlecht	männlich	46	65,7%
	weiblich	24	34,3%
Alter	Mittelwert	64	
	Median	66	
	Range	36-84	
pT-Stadium	T1	17	24,3%
	T2	21	30%
	T3	25	35,7%
	T4	7	10%
pN-Stadium	NX	50	71,4%
	N0	11	15,7%
	N1	6	8,6%
	N2	3	4,3%
cM-Stadium	MX	45	64,3%
	M0	1	1,4%
	M1	24	34,3%
Grading	Ohne Angabe	29	41,4%
	G1	3	4,3%
	G2	17	24,3%
	G3	18	25,7%
	G4	3	4,3%
Metastasierung während des Follow-ups	keine	25	35,7%
	Spät metachron (>24 Monate)	6	8,6 %
	Früh metachron ($\leq$ 24 Monate)	11	15,7%
	synchron	28	40%

Tabelle 8: Zusammenfassung der klinischen und histopathologischen Charakteristika des Kollektivs

5.2 Materialliste

Produkt	Hersteller
Wärmeschrank	Incucell
Xylol 1 l PZN: 09208831	Fischar
Ethanol 99% 5l	SAV Liquid Production GmbH
Aqua dest. Spüllösung 1000 ml Plastipur® LOT: 13SAP214	Ampuwa®
Mikrowelle	Privileg 1026 E
Dako Pen	Dako
Pipette tip 200 µl yellow LOT: 1053421	Sarstedt AG & Co. KG
ultratip	greiner bio-one
Pipette tip 1000 µl blue LOT: 1053321	Sarstedt AG & Co. KG
SafeSeal tube 1,5 ml LOT: 2084721	Sarstedt AG & Co. KG
Dako REAL Detection System Alkaline Phosphatase/RED Rabbit/Mouse K5005 LOT: 41503101	Dako
Dako REAL EnVision Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, HRP K500711-2 LOT: 41527629	Dako
Dako Antibody Diluent 125 ml LOT: 11574478	Dako
DCS Biotinblock 2x20 ml LOT: BL034	LabLine
Bovine Serum Albumin LOT: 0000337997	Sigma-Aldrich®
Hydrogen peroxide solution 30 wt. % in H ₂ O LOT: STBJ1043	Sigma®
Cellstar® Tubes 50 ml LOT: E22113CK	greiner bio-one
Tris 1 kg M _r 121,10 LOT: 200975	SERVA
Messzylinder 250:2 ml	Plasti Brand
Serological pipette 10 ml LOT: 2213	Sarstedt AG & Co. KG
Serological pipette 5 ml LOT: 1165	Sarstedt AG & Co. KG
Serological pipette 25 ml LOT: 2083	Sarstedt AG & Co. KG
PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences
1 M NaOH	
37 % HCl	
Rührgerät MR 2002	Heidolph
Waage	Kern 770
inoLab pH Level 1	wtw
Entellan® new	1.07861.0500 Merck KGaA
Gefrierschrank -20°C	privileg

Lab Thermometer IP65 LT-102	TFA
Mayer's Hematoxylin Solution LOT: SLCL4497	Sigma-Aldrich®
Abzug	Vinitex
Objektträgerschaukeln	Assistent
Küvetten	Kartell
PBS Puffer pH 7,2-7,4 10 l	Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes
Pipetten	Gilson
Deckgläser 24x32 mm Glasdicke 0,13-0,16	R. Langenbrinck GmbH
SuperFrost™ Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH
595 ½ Faltenfilter ø 240 mm LOT: 0138228	Whatman
Rice Cooker Classic 2	Tefal
Safe-Lock Tubes 2.0 ml LOT: K197151K	Eppendorf
KCl 3mol/l InLab® Solutions	Mettler Toledo
Citronensäure C ₆ H ₈ O ₇ ; M 192,13 g/mol Art.-Nr.: X863.1	Carl Roth®
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O; M 294,1 g/mol Art.-Nr.: 3580.1	Carl Roth®
Vortex Genie 2	Scientific Industries™
Kryostat	Leica CM3050 S
Aceton 97%	Universität des Saarlandes-Zentrales Chemikalienlager
Methanol 1.06009.1011	Emsure®
Triton® X-100 LOT: 120097	SERVA
Phospho-Met (Tyr1234/1235) (D26) XP® Rabbit mAb LOT: 9	Cell Signaling Technology®
Anti-Met (c-Met) antibody [SP44]-C-terminal LOT: 1007085-11	abcam
Anti-Met (c-Met) (phospho Y1349) antibody [EP2367Y] LOT: 1030747-3	abcam

Puffer und Lösungen

	Zusammensetzung
PBS Puffer pH 7,2-7,4 10 l	• Natriumchlorid 80,0 g • Di-Na-Hydrogenphosphat 11,5 g • Kaliumchlorid 2,0 g • Kaliumdihydrogenphosphat 2,0 g • Wasser vollentsalzt 10 l
1% BSA in PBS	0,1g BSA in 10 ml PBS lösen
3% BSA in PBS	0,3g BSA in 10 ml PBS lösen
5% BSA in PBS	0,5g BSA in 10 ml PBS lösen
Tris-EDTA Puffer	• 296,4 ml A. dest. • 3,0 ml 1 M Tris-Lösung • 600 µl 0,5 EDTA-Lösung • pH mit HCl auf 9,0 einstellen

1 M Tris-Lösung	12,11g Tris in 100 ml A. dest. lösen
Citratpuffer	• 9 ml Stammlösung A • 41 ml Stammlösung B • 450 ml A. dest. • pH mit HCl auf 6,0 einstellen
Stammlösung A für Citratpuffer	0,1 M Zitronensäure in 1000 ml A. dest.
Stammlösung B für Citratpuffer	0,1 M Natriumcitrat in 1000 ml A. dest.
Peroxidase-Block 3%	10 ml 30% H ₂ O ₂ + 90 ml PBS
PBS 0,2% Triton X	99,8 ml PBS + 200 µl Triton X

5.3 Immunhistochemische Färbung von c-MET

5.3.1 Etablierung

Zur Etablierung der c-MET-Färbung wurden zunächst klarzellige Nierenzellkarzinom-Probeschnitte gefärbt, welche nicht zum eigentlichen Patientenkollektiv gehörten.

Um die immunhistochemische Färbung mit dem c-MET-Antikörper zu optimieren bzw. standardisieren, wurden die folgenden drei wichtigen Faktoren berücksichtigt:

A) Antigendemaskierungszeit (15 oder 20 Minuten)

B) Optimale Antikörper-Konzentration (Testung von 1:50, 1:100 und 1:150)

C) Inkubationszeit mit Primärantikörper (über Nacht bei 4°C oder 1h bei Raumtemperatur)

Durch den Vergleich der Resultate konnten die besten Konditionen für die Färbung von c-MET ermittelt werden.

5.3.2 Optimiertes immunhistochemisches Protokoll für c-MET

Die auf SuperFrost™Plus Objektträger gezogenen 3 µm dicken in Formalin fixierten Paraffinschnitte wurden zunächst für eine Stunde in den Wärmeschrank zum Zwecke der Entparaffinierung gestellt. Anschließend durchliefen sie zur vollständigen Rehydrierung dreimal 100% Xylol für je 10 min, danach folgte die absteigende Alkoholreihe bestehend aus zweimalig 100%-igem Ethanol und zweimalig 70 %-igem Ethanol für je 5 min und als Letztes einmalig kurz destilliertem Wasser. Diese Schritte der Rehydrierung sind nötig, um im wässrigen Milieu fortfahren zu können. Weiter ging es mit der Demaskierung im Reiskocher bei ca. 95 °C für 15 min, um die Quervernetzungen der Proteine, welche bei der Fixierung entstehen, wieder zu lösen und somit die Epitope für den Antikörper zugänglich zu machen. Hierbei wurden die Schnitte in einen Tris-EDTA-Puffer mit pH 9 gegeben, welcher kurz zuvor in der Mikrowelle bei 1000W für ca. 2 min zum Kochen gebracht wurde. Nach abgelaufenen 15 min kühlten die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur auf unter 50 °C ab, was mindestens 25 min in Anspruch nahm. Nach Abkühlung folgte eine dreimalige Spülung in PBS für je 2 min.

Der nächste Schritt bestand in der Umrandung mit dem PapPen, damit sich die hinzugegebenen Substanzen nur auf dem Gewebeschnitt verteilen, sowie anschließender Blockierung mit 3% BSA in PBS. BSA verhindert hierbei unspezifische Proteinbindungen an Oberflächen, indem es diese besetzt. Diese Blockierung erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen in PBS für 2 min schloss sich die Blockierung des endogenen Biotins an, welche insbesondere im Nierenzellkarzinom wichtig ist. Hierbei wird das endogene Biotin des Gewebes blockiert, sodass später keine unspezifischen Signale durch das Biotin-basierende Detektionssystem entstehen, sondern einzig das an den Sekundärantikörper gekoppelte Biotin detektiert wird. Die beiden Blockierungslösungen wurden für je 20 min auf die Schnitte gegeben, zwischen Lösung 1 und 2 erfolgte ein Waschen für 2 min in PBS. Der erste Teil der Färbung endete mit der Hinzugabe des Primärantikörpers Anti-Met (c-Met) antibody [SP44]-C-terminal von Abcam. Dieser wurde in Antibody Diluent von Dako 1:100 verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit den Gewebeschnitten inkubiert. Der zweite Teil am darauffolgenden Tag begann mit viermaligem Waschen in PBS für je 2 min, um die nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Hierbei wurden die Negativkontrollen getrennt von den restlichen Schnitten gewaschen, um eine Verunreinigung der Negativkontrollen mit dem Primärantikörper zu verhindern. Anschließend folgte die Behandlung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 30 min bei Raumtemperatur, welcher an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet. Daraufhin wurden die Schnitte viermal in PBS für je 5 min gewaschen, um den überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen. Im nächsten Schritt schloss sich die Behandlung mit dem Streptavidin-AP-Komplex für ebenfalls 30 min bei Raumtemperatur an. Streptavidin besitzt eine hohe Affinität für Biotin und weist je vier Bindungsstellen für dieses auf, sodass es an den biotinylierten Sekundärantikörper dockt. Des Weiteren ist die alkalische Phosphatase an das Streptavidin gekoppelt, welche in einer enzymatischen Reaktion das Chromogen umsetzt und letztendlich auch die unter dem Mikroskop sichtbare Färbung bewirkt. Bevor das Chromogen hinzugegeben wurde, erfolgte allerdings nochmals ein Waschen mit viermal PBS für je 5 min. Das Chromogen wurde dann für 15 min bei Raumtemperatur mit den Schnitten inkubiert. Insgesamt bezeichnet man dieses Detektionssystem als Labeled Streptavidin-Biotin (LSAB) (Abb.5).

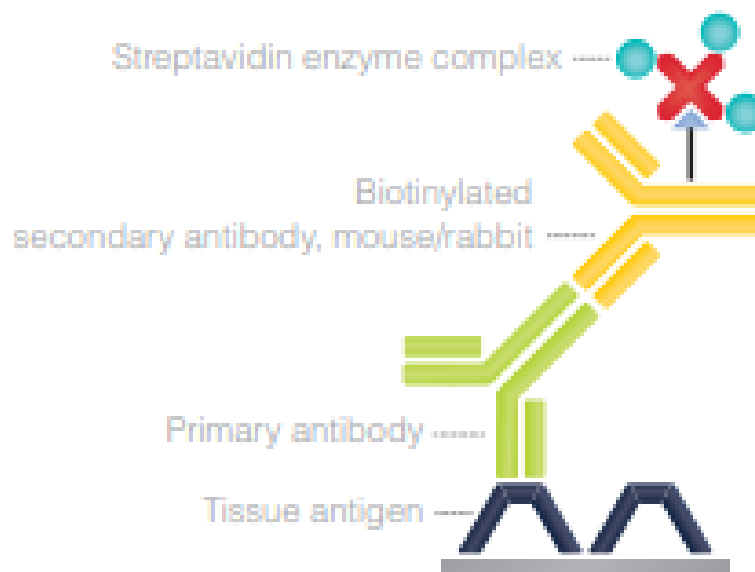


Abbildung 5: LSAB-Methode der immunhistochemischen Färbung. Der Primärantikörper bindet an das entsprechende Antigen auf dem zu untersuchenden Gewebe. Ein biotinylierter Sekundärantikörper wiederum bindet an den Primärantikörper. Streptavidin dockt durch seine hohe Affinität für Biotin an den Sekundärantikörper und die daran gekoppelte alkalische Phosphatase bewirkt bei Zugabe des Chromogens die sichtbare Färbung; entnommen aus [138]

Anschließend wurden die Schnitte zweimal kurz und einmal für 5 min in destilliertes Wasser gegeben. Zur Gegenfärbung diente die Mayer's Hematoxylin Solution für 3 min, um die Struktur des Gewebes besser sichtbar zu machen. Danach wurden die Schnitte in Leitungswasser fließend gebläut, wobei die Ionen im Wasser hierbei für die Blaufärbung essentiell sind. Zum Schluss wurde zur Dehydrierung die aufsteigende Alkoholreihe mit einmal 70% Ethanol, dreimal 100% Ethanol und dreimal 100% Xylol durchlaufen, um das Wasser in den Geweben zu entfernen und diese damit haltbar zu machen. Als Letztes erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit Entellan.

5.3.3 Auswertung von c-MET

Zur Auswertung der c-MET-Färbung wurde der sogenannte H-Score verwendet. Es handelt sich hierbei um ein subjektives Verfahren:

Färbeintensität x Prozent der Zellen

Dabei wird die Färbeintensität in die Kategorien 0 (keine Färbung vorhanden), 1 (schwache Färbung), 2 (mittlere Färbung) und 3 (starke Färbung) unterteilt. Der Wert der Färbeintensität

wird dann jeweils mit der Prozentzahl an Zellen, auf welche dies zutrifft, multipliziert. Dementsprechend ist bei diesem Score ein Höchstwert von 300 zu erreichen. In dieser Arbeit wurde der H-Score jeweils getrennt für membranöse und zytoplasmatische Färbung bestimmt. Um die Schnitte besser beurteilen zu können, wurden diese im pathologischen Institut der Universität Erlangen eingescannt. Anschließend erfolgte die Auswertung am Computer unter Zuhilfenahme des Programms CaseViewer (Native Windows Application, Version 2.4.0.119028), welches durch beliebige Vergrößerungen eine gute Beurteilbarkeit der Schnitte gewährleistet. Um den H-Score zu ermitteln, wurde jedes Präparat von mir als Doktorandin selbstständig händisch durchmustert und ausgewertet. Zur nicht-parametrischen Testung wurde der fortlaufende H-Score genutzt, bei den Überlebensanalysen erfolgte hingegen eine Gruppierung in c-MET-m(membranös)^{stark} und c-MET-m^{schwach} bzw. c-MET-z(zytoplasmatisch)^{stark} und c-MET-z^{schwach}. Als Cut-offs dienten hierbei sowohl der Median als auch der in der ROC-Analyse ermittelte Trennwert.

5.4 Immunhistochemische Färbung von phosphoryliertem c-MET (p-MET)

5.4.1 Etablierung

Zunächst wurde für die aktivierte Form von c-MET (phosphoryliertes MET, p-MET) ein ähnliches Protokoll wie für c-MET verwendet. Im Laufe der Etablierung erfolgten diverse Variationen in den einzelnen Schritten. Diese sind im folgenden Schema jeweils tabellarisch aufgeführt.

Protokoll

In Paraffin eingebettete immunhistochemisch gefärbte Gewebe:

Klarzelliges Nierenzellkarzinom
Leber der Maus
Lunge der Maus
Humane Leber
Humane Lunge
Papilläres Nierenzellkarzinom
KTCTL26 Zellen
786-O Zellen

1) Entparaffinieren

1h bei >60°C im Wärmeschrank

Über Nacht bei 37°C

2) Rehydrierung Absteigende Alkoholreihe

- 3x Xylol je 10 min
- 2x 100% Alkohol je 5 min
- 2x 70% Alkohol je 5 min
- Kurz A.dest.

3) Antigendemaskierung

Tris-EDTA Puffer pH 9

Citratpuffer pH 6

- in Mikrowelle erhitzen (1000 W ca. 2min)
- Schnitte in kochenden Puffer geben
- Inkubation

Inkubation 10 min bei 95°C

Inkubation 15 min bei 95°C

Inkubation 20 min bei 95°C

4) Abkühlen

Küvette aus Wasserbad und bei Raumtemperatur auf <50°C abkühlen lassen, ca. 25 min

Anschließende Permeabilisierung mit 0,2% Triton X in PBS
--

5) Spülen

3x PBS (pH 7,2-7,4) je 2 min

6) Blockierung

- Feuchte Färbekammer mit A.dest. füllen
- Objektträger abklopfen und Rückseite abtrocknen
- Gewebe mit PapPen (*Dako Pen*) umranden
- Benetzen mit Blockierungslösung (ca.200 µl pro Schnitt) 30 min
Raumtemperatur

3% BSA in PBS
3% BSA in PBS + 0,2% Triton X
5% BSA in PBS
Biotinblock
3% Peroxidaseblock in PBS
3% Peroxidaseblock in Methanol

7) Primärantikörper

Phospho-Met (Tyr1234/1235 D26) XP® Rabbit mAb von Cell Signaling Technology
Anti-Met (c-Met) (phospho Y1349) antibody von Abcam

- Verdünnung des Antikörpers

1:20	1:150
1:50	1:250
1:80	1:350
1:100	

- Diluent

Dako Antibody Diluent
3% BSA in PBS
1% BSA in PBS

- Inkubation über Nacht im Kühlschrank bei 4°C

8) Spülen

4x PBS je 2 min, Negativkontrollen in Extraküvette

9) Detektion

Dako REAL Detection System Alkaline Phosphatase/RED Rabbit/Mouse K5005
Dako REAL EnVision Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, HRP K500711-2 (Abb.6)



Abbildung 6: Immunhistochemische Two-step indirekte Methode des Peroxidase/DAB Systems. An den Primärantikörper bindet ein Sekundärantikörper mit gekoppelter Meerrettichperoxidase (HRP). Anschließend setzt dieses Enzym das DAB-Chromogen um, wodurch ein Farbsignal entsteht; entnommen aus und modifiziert nach [16]

10) Spülen

3x PBS je 5 min

11) Immunhistochemische Detektion mit Chromogen

Chromogen je nach eingesetztem Detektionssystem ansetzen

12) Spülen

3x kurz in A.dest.

13) Gegenfärbung

Mayer's Hematoxylin Solution vorher filtern, 1 min

14) Fließend bläuen

In kaltem Leitungswasser 3 min, Strahl nicht direkt auf Schnitte richten

15) Dehydrierung Aufsteigende Alkoholreihe

Je Küvette kurz schwenken

- 1x 70% Alkohol
- 3x 100% Alkohol
- 3x Xylol, Objektträger im letzten Xylol stehen lassen

16) Eindecken

Entellan auf Deckgläschen tropfen

5.4.2 Etabliertes immunhistochemisches Protokoll für p-MET auf kryokonserviertem Gewebe

Gefärbtes Gewebe:

Kryokonserviertes papilläres Nierenzellkarzinom
Kryokonserviertes klarzelliges Nierenzellkarzinom

Das kryokonservierte Gewebe des Nierenzellkarzinoms wurde im Kryostat bei -22°C in 4 µm dicke Slides geschnitten und auf SuperFrost™ Plus Objektträger gezogen. Es erfolgte danach eine Fixierung in Aceton bei -20°C für 10 min. Nach anschließendem zweimaligen Waschen in PBS für je 5 min wurde 3% Wasserstoffperoxid in PBS oder Methanol (beides möglich) für 10 min auf die Schnitte getropft, welches die endogene Peroxidase blockiert, um dadurch bei der Detektion mit HRP ein unspezifisches Signal zu vermeiden. Nach erneutem zweimaligen Waschen in PBS für je 5 min schloss sich die 45-minütige Blockierung mit 5% BSA in PBS an. Darauf folgte die Inkubation mit dem Antikörper (Phospho-Met (Tyr1234/1235) (D26) XP® Rabbit mAb von Cell Signaling Technology oder Anti-Met (c-Met) (phospho Y1349) antibody [EP2367Y] von Abcam) in einer Verdünnung von 1:50 über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Objektträger viermal jeweils für 2 min in PBS gewaschen, um den nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Dabei war es wichtig, dass das Waschen von Positiv- und Negativkontrollen in getrennten Küvetten durchgeführt wird, um mögliche Kontaminationen zu verhindern. Hiernach erfolgte die Inkubation mit HRP für 1h bei Raumtemperatur, danach schloss sich wieder ein dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 5 min an. Zur Detektion wurde als nächstes das DAB-Chromogen auf die Schnitte gegeben. Nach 5 min folgte ein erneutes Waschen in destilliertem Wasser für 5 min. Darauf folgend wurde die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 1 min durchgeführt, danach die aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung durchlaufen und zum Schluss mit Entellan eingedeckt.

5.5 Auswertung von PD-L1

Es ist anzumerken, dass die Daten zum PD-L1-Status von dem Doktoranden Kevin Junk der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes stammen, welcher in seiner Arbeit das identische Patientenkollektiv untersucht hat. Anhand seines ermittelten H-Scores wurde für die Überlebensanalyse folgende Gruppierung vorgenommen:

PD-L1 H-Score = 0 → PD-L1 negativ

PD-L1 H-Score > 0 → PD-L1 positiv

5.6 Statistische Auswertung

Die Daten der Patienten (unter anderem Alter, Geschlecht, TNM-Stadium, Grading, OS und MFS, H-Score von c-MET und PD-L1) wurden in Microsoft® Excel® (LTSC MSO (Version 16.0.14332.20810) 64-Bit Microsoft Corporation, Redmond, Washington in den Vereinigten Staaten) erfasst und anschließend in SPSS Statistics (Statistical Package for Social Science, IBM® Version 28.0.1.0) zur statistischen Auswertung übertragen. Die Testung der Assoziation von c-MET und klinisch-histopathologischen Parametern erfolgte mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-U-Tests. Eine Receiver Operation Characteristics (ROC)-Analyse ermöglichte die Bestimmung des optimalen Trennwertes für die Gruppierung der c-MET-Expression. Zur Überlebensanalyse wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt und anhand des Log-Rank-Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Univariate und multivariable Cox-Regressionsanalysen dienten der Ermittlung des Einflusses einzelner Faktoren auf das Überleben sowie deren Unabhängigkeit. Zur Korrelationsanalyse von c-MET und PD-L1 erfolgte die Berechnung des Spearman-Koeffizienten. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

6. Ergebnisse

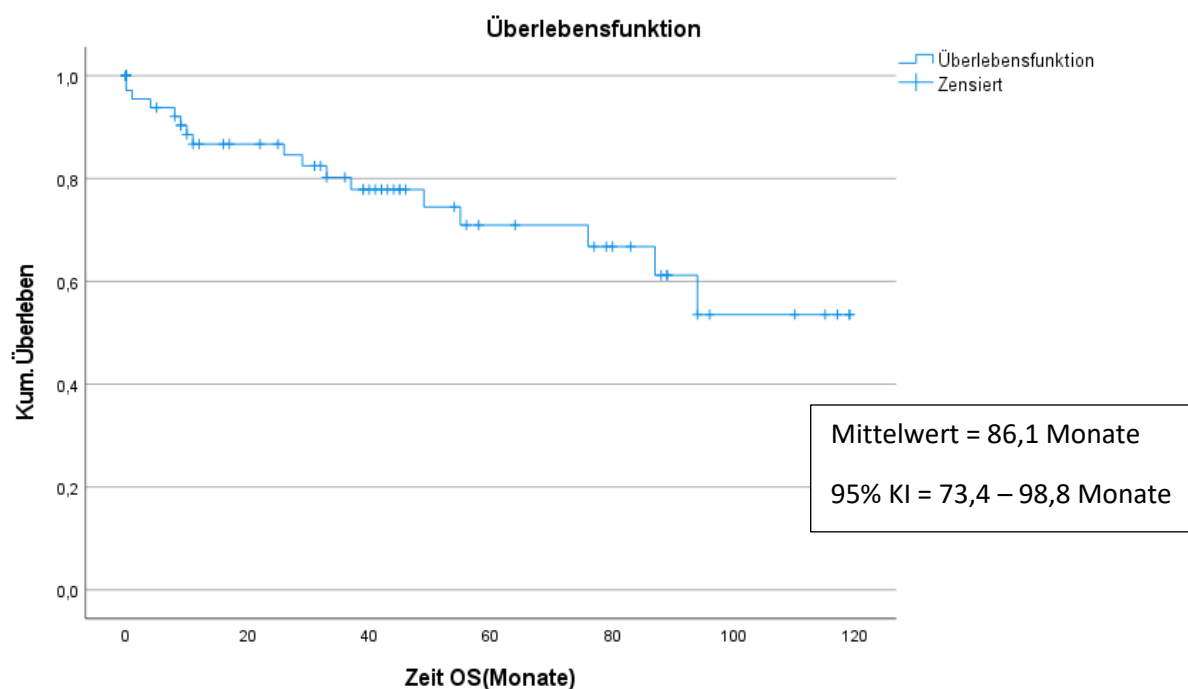
6.1 Charakterisierung des Kollektivs anhand klinisch-histopathologischer Parameter

Bevor die eigentliche Analyse von c-MET erfolgt, soll das Patientenkollektiv auf seine Eigenschaften und Repräsentativität geprüft werden. Hierzu werden Überlebensanalysen bezüglich verschiedener klinisch-histopathologischer Parameter durchgeführt.

6.1.1 Gesamt- und Metastasenfreies-Überleben

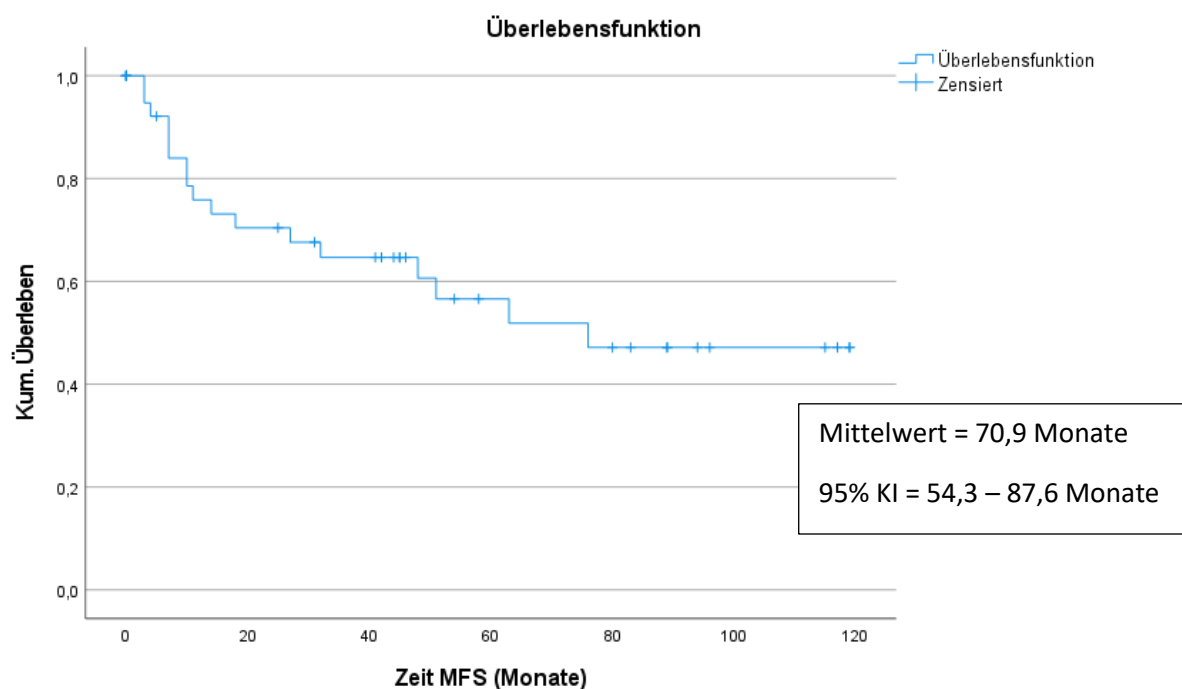
Im Folgenden sind jeweils das Gesamtüberleben (OS, Zeit von Diagnosestellung bis Tod) und das metastasenfreie Überleben (MFS, Zeit von Diagnosestellung bis Auftreten von Metastasen) dargestellt (Abb.7 und 8). Das krebsspezifische Überleben (CSS, Zeit von Diagnosestellung bis zum krebsspezifischen Tod) ist in diesem Patientenkollektiv nicht aussagekräftig, da nur 6 von 70 Patienten laut Todesschein nachweislich an ihrer Krebserkrankung verstorben sind. Die mittlere Nachbeobachtungszeit für das OS betrug 40,2 Monate und für das MFS 43,5 Monate.

Das 5-Jahres-Gesamtüberleben beträgt in der Kohorte 71%, das 5-Jahres-metastasenfreie Überleben 56% (Abb.7 und 8). Die durchschnittliche Überlebenszeit liegt bei 86 Monaten (95 % Konfidenzintervall= 73,4-98,8 Monate). Im Mittel waren nach 71 Monaten (KI= 54,3-87,6 Monate) Metastasen nachweisbar.



Number at risk						
Patientenanzahl	70	43	31	18	14	5
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben aller Patienten



Number at risk						
Patientenanzahl	42	26	22	12	10	4
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben aller Patienten

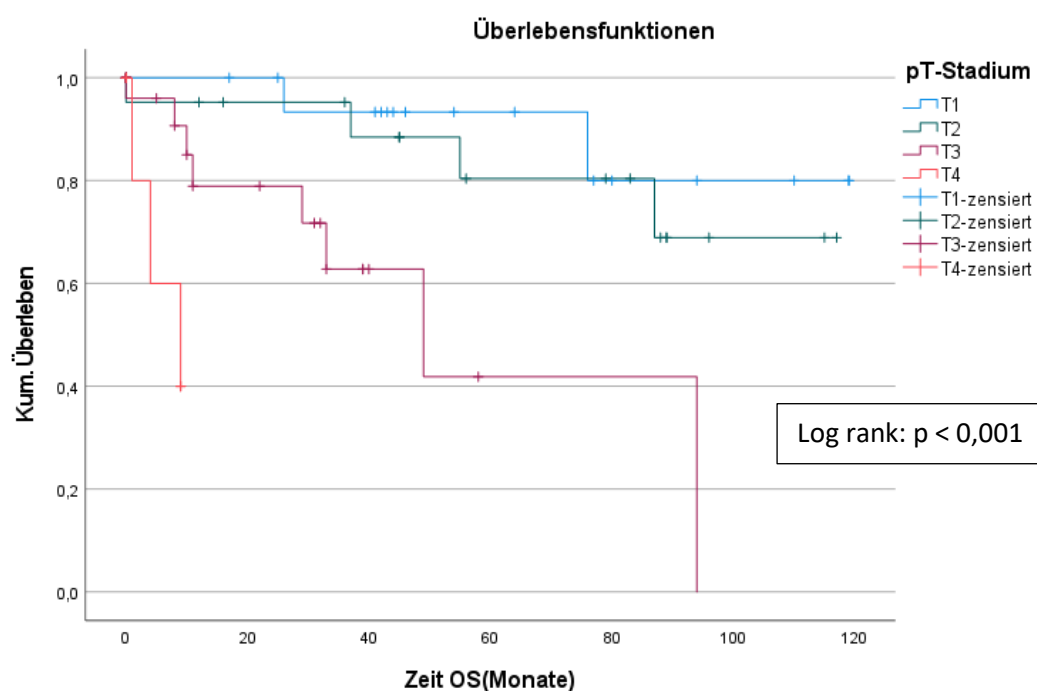
6.1.2 T-Stadium

Unter den 70 Patienten der Kohorte wurden 54,3% als pT1-pT2 (Tumore niedrigen Stadiums) und 45,7% als pT3-pT4 (Tumore fortgeschrittenen Stadiums) nach TNM klassifiziert. Sowohl das OS ($p < 0,001$; Abb.9) als auch das MFS ($p < 0,001$; Abb.10) weisen einen signifikanten Unterschied bezüglich des pT-Stadiums auf. Je höher das pT-Stadium, desto kürzer ist das mittlere Gesamtüberleben (Tab.9). Im pT1-Stadium beträgt es 107 Monate, wohingegen es im pT4-Stadium auf 6 Monate absinkt. Das 5-Jahres-Überleben liegt für die ersten beiden pT-Gruppen noch über 90% bzw. 80%, ein deutlicher Abfall ist in der pT3-Gruppe zu verzeichnen

mit 42%, die pT4-Gruppe erreicht das 5-Jahres-Überleben nicht. Auch im MFS sieht man diesen Trend mit einem Mittelwert im pT1-Stadium von 93 Monaten bis hin zu lediglich 5 Monaten im pT4-Stadium. Nach 5 Jahren Beobachtungszeitraum war kein Patient der pT4- und pT3-Gruppe metastasenfrei (Tab.9).

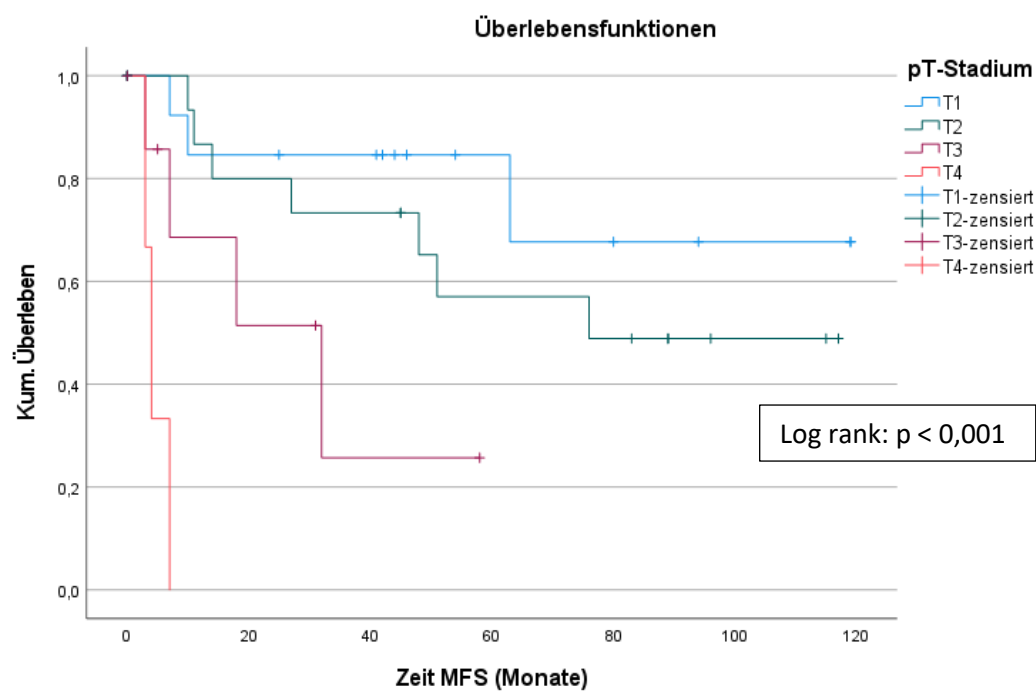
	OS		MFS	
	Mittleres Überleben	5-Jahres-Überleben	Mittleres Überleben	5-Jahres-Überleben
	Monate	In Prozent	Monate	In Prozent
pT1	107	94%	93	85%
pT2	98	80%	76	57%
pT3	56	42%	28	0%
pT4	6	0%	5	0%

Tabelle 9: Mittleres und 5-Jahresüberleben von OS und MFS bezüglich pT-Stadium



Number at risk						
pT1	17	16	14	8	5	3
pT2	21	15	13	9	8	2
pT3	25	12	4	1	1	0
pT4	7	0	0	0	0	0
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf das pT-Stadium

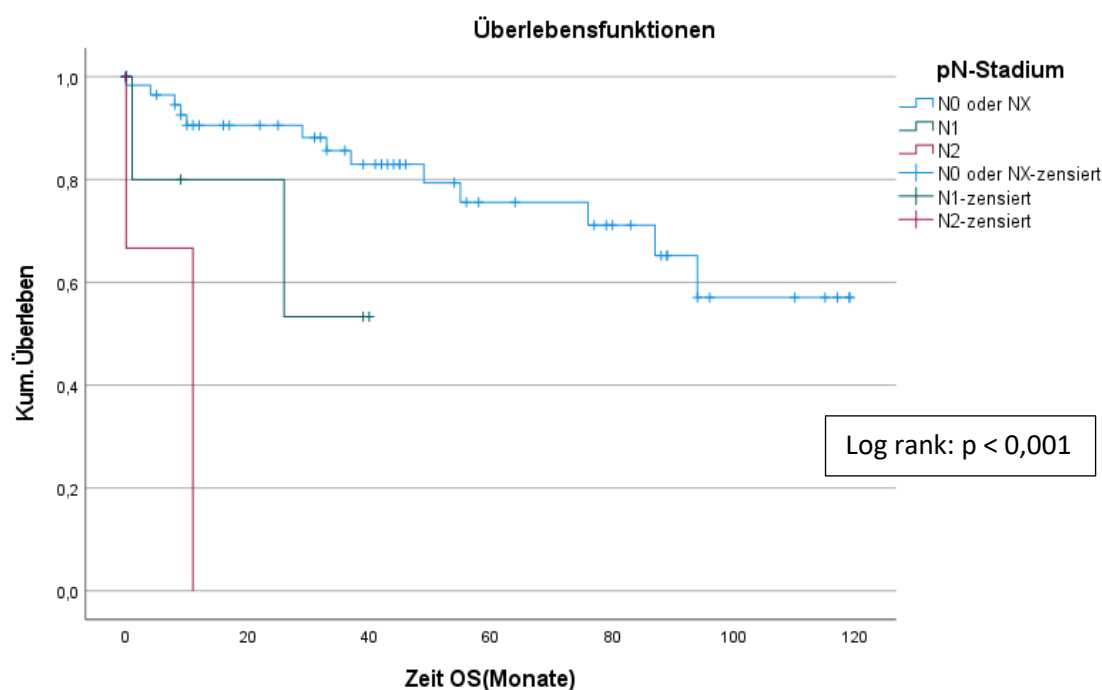


Number at risk						
pT1	13	11	10	5	4	2
pT2	18	12	11	7	6	2
pT3	8	3	1	0	0	0
pT4	3	0	0	0	0	0
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf das pT-Stadium

6.1.3 Nodalstatus

15,7% der Patienten wiesen keine Lymphknotenmetastasierung auf, während bei 8,6% ein pN1- bzw. bei 4,3% ein pN2-Stadium diagnostiziert wurde. Da bei unauffälliger Bildgebung und intraoperativem Befund keine Lymphadenektomie beim Nierenzellkarzinom erfolgen sollte, konnte bei 50 Patienten (71,4%) des Kollektivs keine Aussage über den Nodalstatus getroffen werden. Zur Überlebensanalyse wurde die pNX-Gruppe aus diesem Grund mit der pN0-Gruppe als N0-Gruppe zusammengefasst. Es zeigt sich, dass ein Lymphknotenbefall das Überleben signifikant verkürzt ($p < 0,001$; Abb.11). Patienten der Gruppe pN0/pNX weisen ein mittleres Überleben von 91 Monaten (KI: 79-104) auf, welches beim pN1-Stadium auf 29 (KI: 15-42) und pN2-Stadium auf 7 Monate (KI: 0-16) sinkt. Zu beachten sind allerdings die geringen Patientenzahlen in den Gruppen pN1 bzw. pN2.

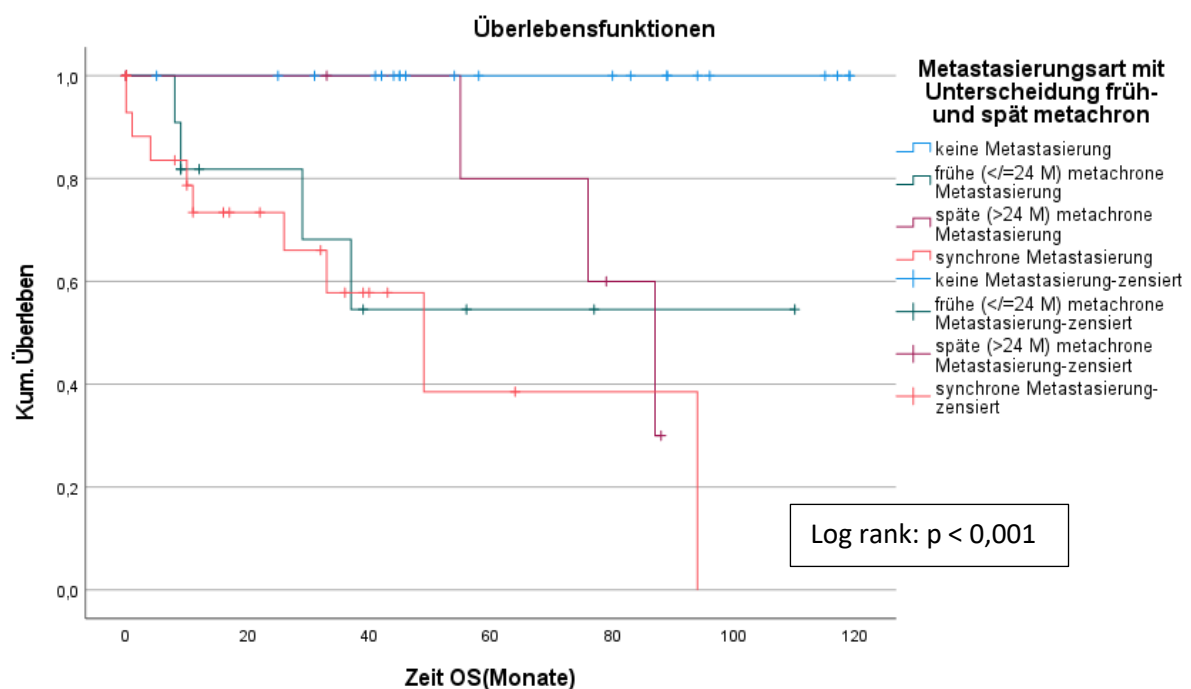


Number at risk						
N0 oder NX	61	40	30	18	14	5
N1	6	3	1	0	0	0
N2	3	0	0	0	0	0
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den Nodalstatus

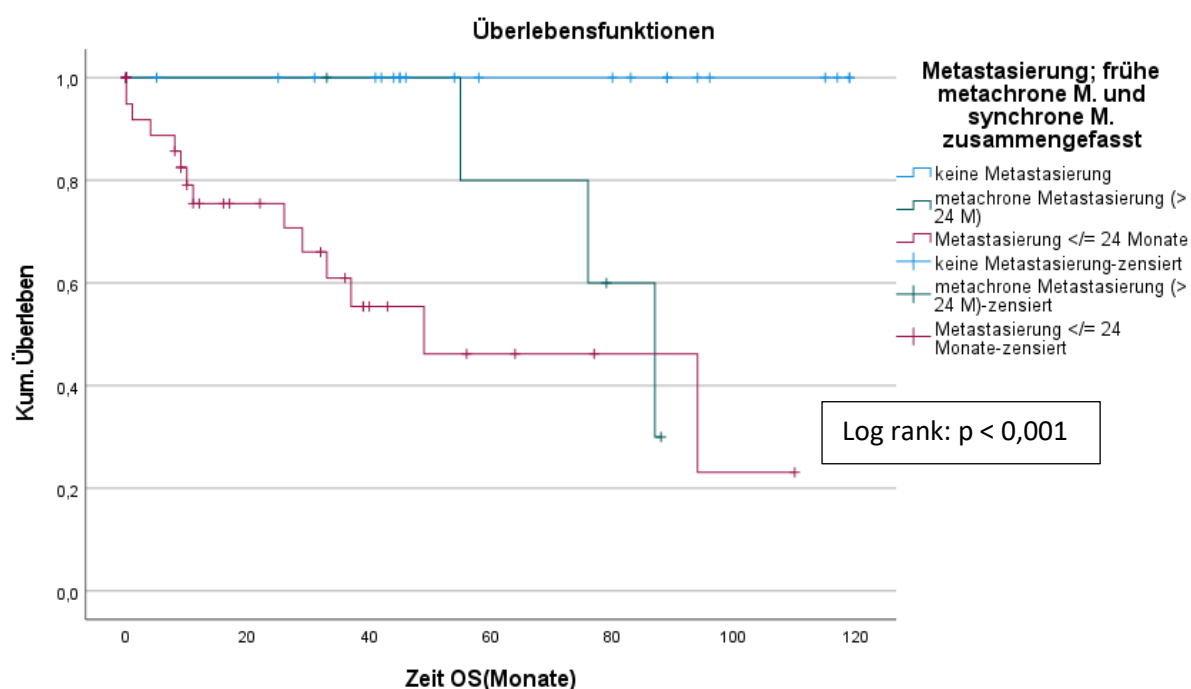
6.1.4 Metastasierung

40% der Patienten metastasierten synchron, 15,7% früh metachron (≤ 24 Monaten) und 8,6% spät metachron (>24 Monaten), wohingegen 35,7% keine Metastasierung aufwiesen. Das Gesamtüberleben zeigt einen signifikanten Unterschied bezüglich der Metastasierung ($p < 0,001$; Abb.12). Patienten ohne Metastasierung weisen ein 5-Jahres-Überleben von 100% auf, wohingegen ein Auftreten von Metastasen das Gesamtüberleben signifikant verkürzt. Die spät metachrone Gruppe hat ein längeres 5-Jahresüberleben mit 80% als die früh metachrone und synchrone Gruppe (54% bzw. 38%), allerdings ergeben sich beim paarweisen Vergleich dieser drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des OS. Fasst man die synchron und früh metachron metastasierten Patienten als Ausdruck einer aggressiveren Erkrankung in einer Gruppe mit Metastasierung ≤ 24 Monaten zusammen, so ergibt sich beim paarweisen Vergleich mit der Gruppe >24 Monaten kein signifikanter Unterschied bezüglich des OS. Wie zuvor kann bei Patienten ohne Metastasierung ein signifikant längeres Gesamtüberleben sowohl gegenüber Patienten mit einer Metastasierung ≤ 24 Monaten als auch >24 Monaten beobachtet werden ($p < 0,001$; Abb.13).



Number at risk						
Keine M.	25	20	18	10	10	4
Früh meta	11	6	3	2	1	1
Spät meta	6	6	5	4	2	0
synchron	28	11	5	2	1	0
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf die Metastasierung mit der Unterscheidung früh und spät metachron

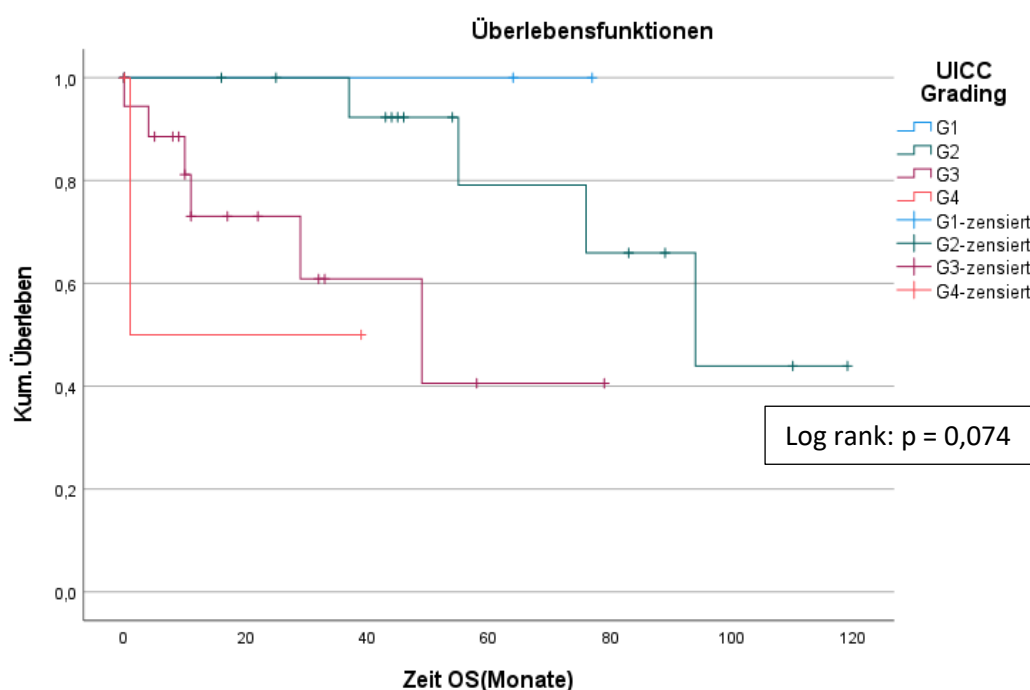


Number at risk						
Keine M.	25	20	18	10	10	4
Metachron (>24 M)	6	6	5	4	2	0
Metast. ≤ 24 M	39	17	8	4	2	1
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf die Metastasierung; früh metachron und synchron sind in der Gruppe ≤ 24 Monaten zusammengefasst

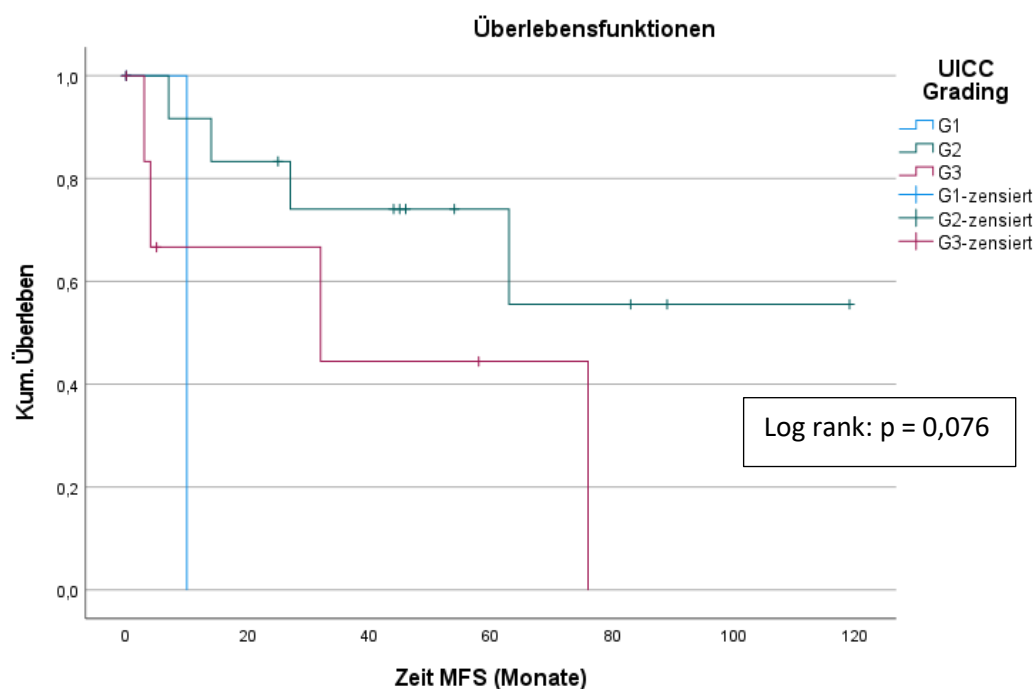
6.1.5 Grading

Bei 41,4% der Patienten war kein Grading bekannt, 4,3% wiesen G1, 24,3% G2, 25,7% G3 und 4,3% den Malignitätsgrad G4 auf. Das Grading ist im Log-rank Test kein signifikanter Parameter für das OS und MFS ($p=0,074$ und $p=0,076$; Abb.14 und 15). Dennoch zeichnet sich der Trend ab, dass das Gesamtüberleben umso kürzer wird, je höher der Malignitätsgrad ist. Das 5-Jahresüberleben der G1-Gruppe beträgt 100% verglichen mit 40% bei G3 bzw. 0% bei G4. Man muss jedoch anmerken, dass nur jeweils 3 Patienten der Gruppe G1 und G4 zugeordnet werden konnten, weshalb hier die Aussagekraft gering ist. Beim MFS sind keine Patienten der Gruppe G4 aufgeführt, da diese alle eine synchrone Metastasierung aufweisen und aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Es zeigt sich für G2 mit 82 Monaten (KI: 54-111) ein längeres mittleres metastasenfreies Überleben als bei G3 (42 Monate; KI: 11-73), jedoch ohne statistische Signifikanz.



Number at risk						
G1	3	2	2	2	0	0
G2	17	14	12	6	5	2
G3	18	7	3	1	0	0
G4	3	1	0	0	0	0
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf das Grading



Number at risk						
G1	2	0	0	0	0	0
G2	13	10	8	4	3	1
G3	7	3	2	1	0	0
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfrenen Überleben bezogen auf das Grading

6.2 Charakterisierung und Analyse der c-MET-Expression

Um die Relevanz im klarzelligen NZK zu beurteilen, wurden die c-MET-Expressionslevel in Primärtumoren der Kohorte charakterisiert, quantifiziert und schließlich mit histopathologischen und klinischen Parametern assoziiert.

6.2.1 Profil der c-MET-Expression

Die IHC-Analyse der c-MET-Expression ergab eine große Spannbreite bezüglich der Färbeintensität. Diese variierte von negativ (Score 0) bis hin zu stark positiv (Score 3), wobei auch innerhalb der einzelnen Schnitte Intensitätsunterschiede auftraten (Abb. 16). Eine Heterogenität konnte ebenfalls bei der Prozentzahl an Zellen mit gleicher Intensität beobachtet werden.

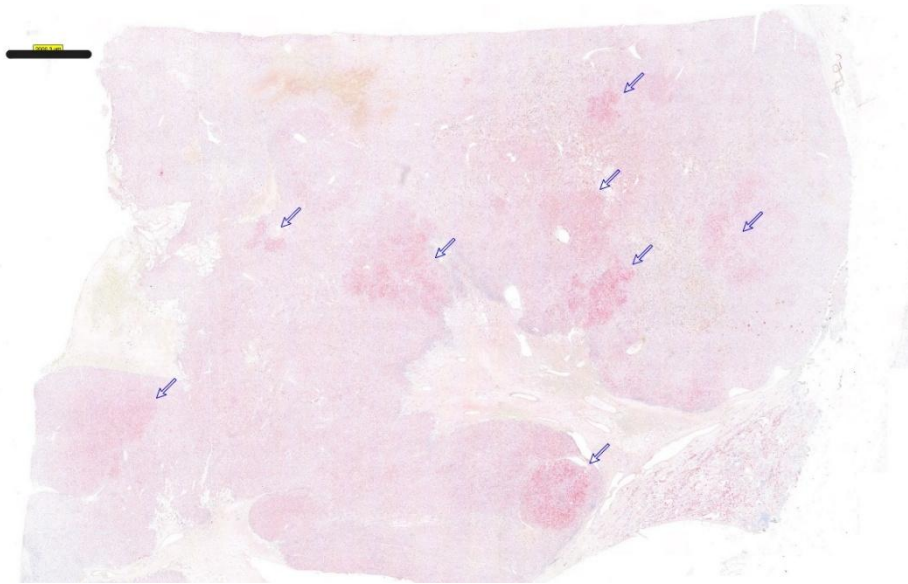


Abbildung 16: Repräsentative immunhistochemische c-MET-Färbung an einem Tumorgewebeschnitt. Übersichtsaufnahme, Maßstabsbalken: 2000 µm. Die blauen Pfeile weisen auf Bereiche mit stärkerer Färbung hin, wodurch die Heterogenität erkennbar wird.

Darüber hinaus konnte die c-MET-Expression sowohl auf der Plasmamembran als auch im Zytoplasma lokalisiert werden, wobei sich die Intensität zwischen den Präparaten und auch innerhalb dieser unterschieden. Um einen Eindruck von den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen zu bekommen, ist im Folgenden für jede membranöse und zytoplasmatische Färbintensitätsstufe (0-3), welche in den H-Score einfließt, ein beispielhafter Präparatausschnitt dargestellt (Abb.17 und 18).

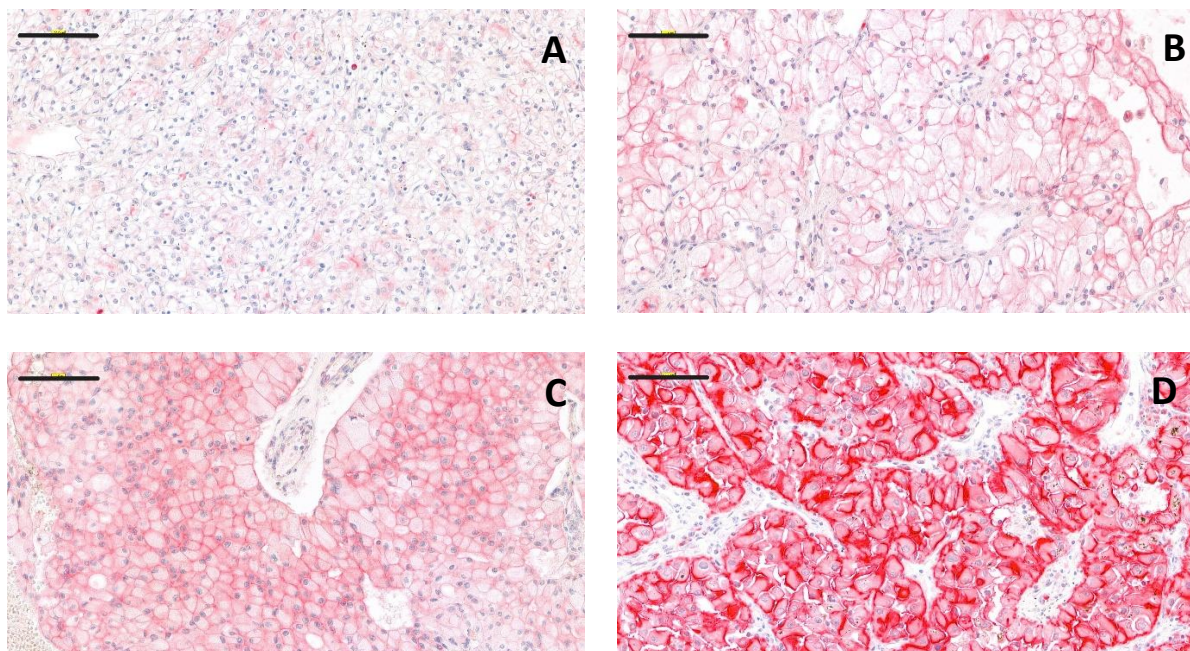


Abbildung 17: Beispiele für die membranöse Expression von c-MET in Tumorgewebeschnitten bei 40-facher Vergrößerung. Maßstabsbalken: 100µm. Die Färbung erfolgte mittels LSAB-Methode mit Hämatoxylin-Gegenfärbung (A) keine nachweisbare membranöse c-MET-Expression (B) schwache, (C) moderate und (D) starke membranöse c-MET-Expression. Die Bilder veranschaulichen die graduelle Heterogenität der c-MET-Expression in Tumorzellen innerhalb der Patientenkohorte.

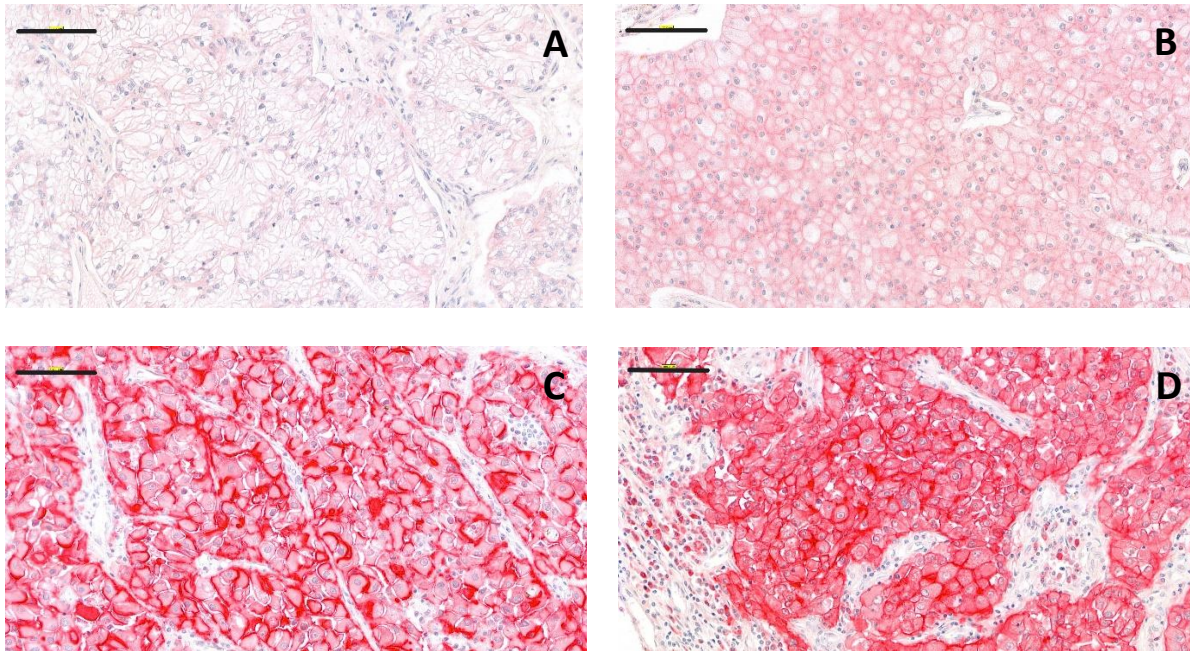


Abbildung 18: Beispiele für die zytoplasmatische Expression von c-MET in Tumorgewebeschnitten bei 40-facher Vergrößerung. Maßstabsbalken: 100µm. Die Färbung erfolgte mittels LSAB-Methode mit Hämatoxylin-Gegenfärbung (A) keine nachweisbare zytoplasmatische c-MET-Expression (B) schwache, (C) moderate und (D) starke zytoplasmatische c-MET-Expression. Die Bilder veranschaulichen die graduelle Heterogenität der c-MET-Expression in Tumorzellen innerhalb der Patientenkohorte.

Durch die Heterogenität von membranöser und zytoplasmatischer Expression in den Tumorschnitten erfolgte jeweils die getrennte Bestimmung des H-Scores. Hierbei ergab sich folgende Verteilung (Abb.19 und 20): Wie den Histogrammen zu entnehmen, ist die membranöse Expression mit einem Mittelwert von 101,8 bzw. einem Median von 82,5 des H-Scores stärker als die zytoplasmatische Expression mit einem Mittelwert von 79,4 bzw. einem Median von 60. Die H-Scores sind in beiden Kategorien weit gestreut, wobei sich keine Normalverteilung zeigt. Die Maximal- und Minimalwerte für c-MET-m(membranös) betragen 270 bzw. 10, für c-MET-z(zytoplasmatisch) 220 bzw. 0.

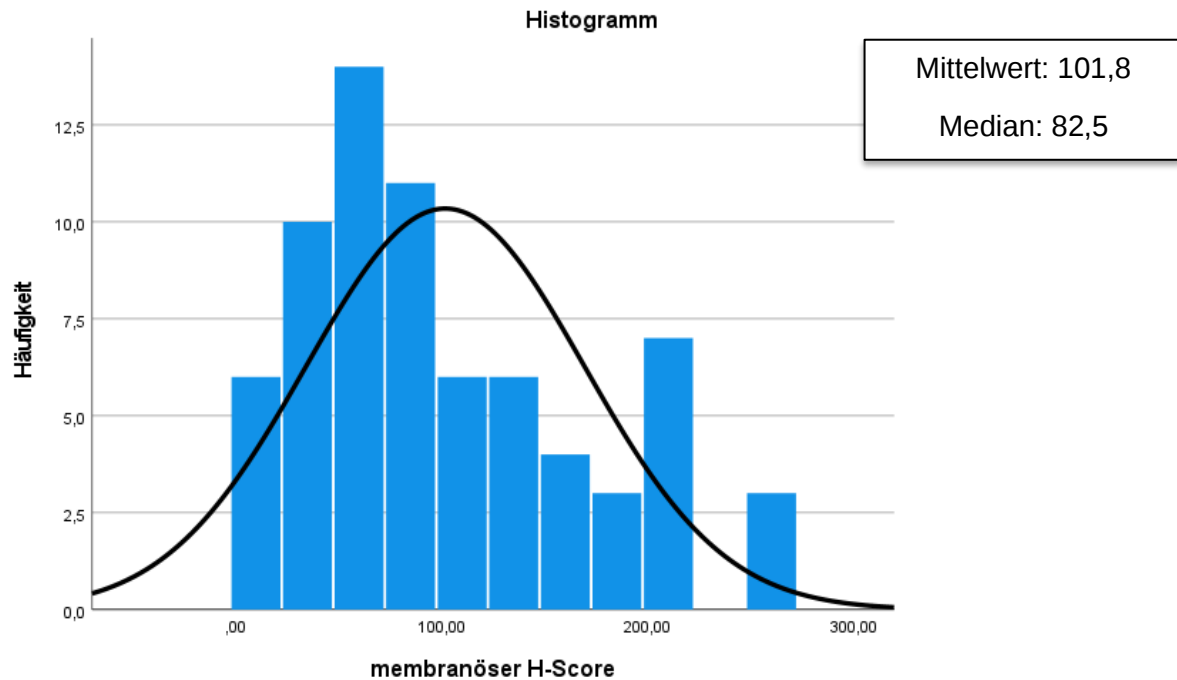


Abbildung 19: Histogramm des H-Scores für die membranöse c-MET-Expression. Balken: Häufigkeitsverteilung der Patienten-H-Scores, basierend auf der immunhistochemischen Bewertung der membranösen c-MET-Färbung in Tumorgewebeschnitten; schwarze Kurve: angenäherte Normalverteilung

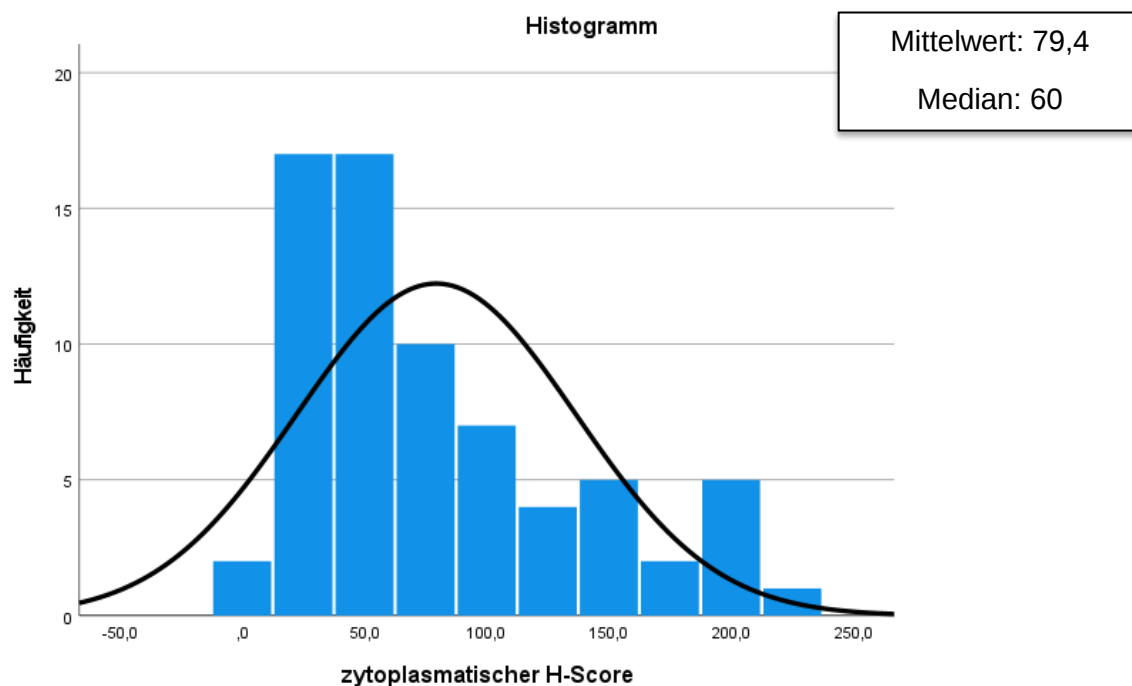


Abbildung 20: Histogramm des H-Scores für die zytoplasmatische c-MET-Expression. Balken: Häufigkeitsverteilung der Patienten-H-Scores, basierend auf der immunhistochemischen Bewertung der zytoplasmatischen c-MET-Färbung in Tumorgewebeschnitten; schwarze Kurve: angenäherte Normalverteilung

6.2.2 Assoziation von c-MET mit klinisch-histopathologischen Parametern

Um die Assoziation der c-MET-Expressionsmuster (membranös und zytoplasmatisch) mit den histopathologischen und klinischen Parametern pT-Stadium, Nodalstatus, Grading und Metastasierung auszuwerten, wurde eine nicht-parametrische Testung mit dem fortlaufenden H-Score durchgeführt. Da sich die Expressionsmuster und -intensitäten von c-MET-m und c-MET-z je nach Patientenprobe deutlich unterschieden, wurden diese getrennt betrachtet. Im Folgenden sind zunächst zur Übersicht für jeden Parameter Mittelwert und Median des c-MET-m- und c-MET-z-H-Scores angegeben (Tab.10). Hier ist bei höherem pT-Stadium (pT1 und pT2 vs. pT3 und pT4) ein tendenziell höherer H-Score sowohl membranös als auch zytoplasmatisch zu beobachten, gleiches gilt für den Nodalstatus (pN0 vs. pN1 und pN2) mit Ausnahme des c-MET-z-Medians, welcher für das Stadium pN1 niedriger ist als für pN0 (65 bzw. 80). Beim Grading (G1 und G2 vs. G3 und G4) und der Metastasierung (keine und spät metachron vs. synchron und früh metachron) ist dieser Trend des höheren H-Scores ebenfalls für c-MET-m zu verzeichnen. Im Fall von c-MET-z steigen nur die Mittelwerte, nicht die Mediane, mit sinkender Differenzierung, bei der Metastasierung zeigt die spät metachrone Gruppe die höchsten H-Scores.

Klinisch-histopathologische Parameter		Anzahl (In Prozent)	H-Score c-MET-m		H-Score c-MET-z	
			Mittelwert	Median	Mittelwert	Median
pT-Stadium	pT1	17 (24,3%)	71,8	55	66,5	45
	pT2	21 (30%)	85,7	70	66,2	50
	pT3	25 (35,7%)	132	110	93,4	80
	pT4	7 (10%)	115	125	100	80
Nodalstatus	pN0	11 (15,7%)	109,1	90	77,7	80
	pN1	6 (8,6%)	157,5	180	89,2	65
	pN2	3 (4,3%)	126,7	160	146,7	125
Grading	G1	3 (4,3%)	51,7	50	45	45
	G2	17 (24,3%)	70,3	65	56,8	50
	G3	18 (25,7%)	117	110	77,2	72,5
	G4	3 (4,3%)	146,7	200	83,3	30
Metastasierung	keine	25 (35,7%)	71,6	60	66,2	50
	spät metachron	6 (8,6%)	78,3	60	100,8	82,5

	(>24 Monate)					
	früh metachron (≤24 Monate)	11 (15,7%)	128,2	120	90	50
	synchron	28 (40%)	123,4	117,5	82,3	72,5

Tabelle 10: Mittelwerte und Mediane der H-Scores von c-MET-m und c-MET-z bezüglich klinisch-histopathologischer Parameter

Um die statistischen Signifikanzen der Assoziation von c-MET und den Parametern zu berechnen, erfolgte als Nächstes die genaue Analyse des fortlaufenden H-Scores mittels nicht-parametrischer Tests.

6.2.2.1 Assoziation von c-MET-membranös mit klinisch-histopathologischen Parametern

Die membranöse c-MET-Expression ist signifikant mit dem pT-Stadium assoziiert ($p=0,034$; Abb.21 und Tab.11). Bei genauerer Analyse weisen Patienten mit pT1-Stadium signifikant niedrigere membranöse c-MET-H-Scores auf als Patienten des Stadiums pT3 ($p=0,010$; Abb.21 und Tab.11). Gleiches gilt auch für das pT2- gegenüber dem pT3-Stadium ($p=0,043$; Abb.21 und Tab.11). Bei den übrigen pT-Kombinationen lässt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der membranösen c-MET-Expression beobachten (Abb.21 und Tab.11). Zu beachten ist jedoch die große Spannbreite von Minimum- zu Maximumwerten, welche besonders stark im pT3-Stadium ausgeprägt ist (Abb.21). Bezüglich der Lymphknotenmetastasierung lässt sich ein signifikanter Unterschied der c-MET-m-Expression zwischen pN0/pNX und pN1-Stadium nachweisen ($p=0,042$; Tab.11), allerdings ist die Aussagekraft gering, da nur 6 Patienten dem pN1- und 11 Patienten dem pN0-Stadium zugeordnet werden konnten. Im Kruskal-Wallis-Test zeigt die Variable in ihrer Gesamtheit hingegen keine Signifikanz ($p=0,116$; Tab.11). Ähnlich ist es beim Grading mit einer fehlenden Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test ($p=0,075$; Tab.11) bei vorhandenem signifikanten Unterschied von G2 und G3 im Mann-Whitney-U-Test bezüglich der membranösen c-MET-Expression ($p=0,027$; Tab.11). Auch hier ist zu berücksichtigen, dass fast 50% der Patienten bezüglich des Gratings nicht klassifiziert wurden und die Aussagekraft dieser Analyse somit eingeschränkt ist.

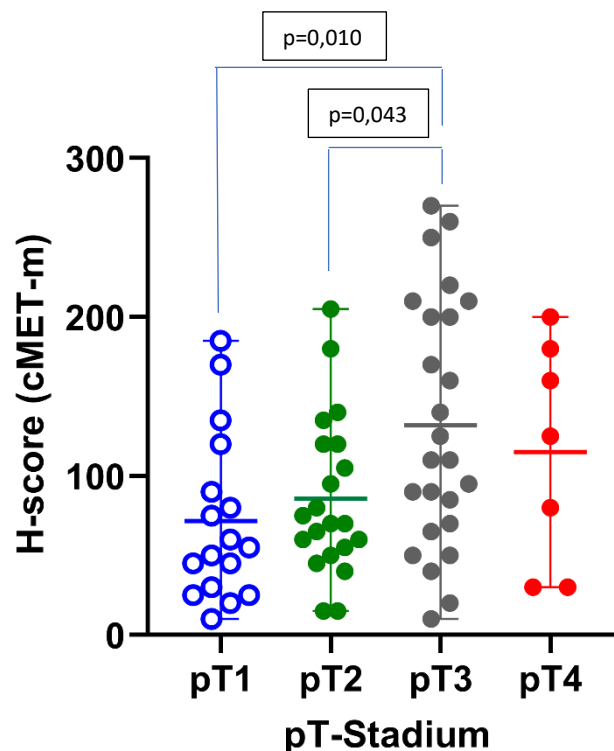


Abbildung 21: Streudiagramm zur Assoziation von membranöser c-MET-Expression und dem pT-Stadium. Die Punkte kennzeichnen die individuellen H-Scores. Der Median jeder Gruppe ist durch eine horizontale Linie markiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt und durch eckige Klammern gekennzeichnet.

Das Auftreten von Metastasen ist signifikant mit erhöhter c-MET-m-Expression korreliert ($p=0,005$), wobei Patienten mit synchroner und früh metachroner (≤ 24 Monate) Metastasierung gegenüber denjenigen ohne Metastasierung eine signifikant höhere c-MET-m-Expression aufweisen ($p=0,007$ und $p=0,015$; Abb.22). Ein Vergleich zwischen keiner und spät metachroner Metastasierung ergibt hingegen keinen signifikanten Unterschied ($p=0,643$), ebenso wie Testungen von spät metachroner, früh metachroner und synchroner Metastasierung untereinander (Abb.22).

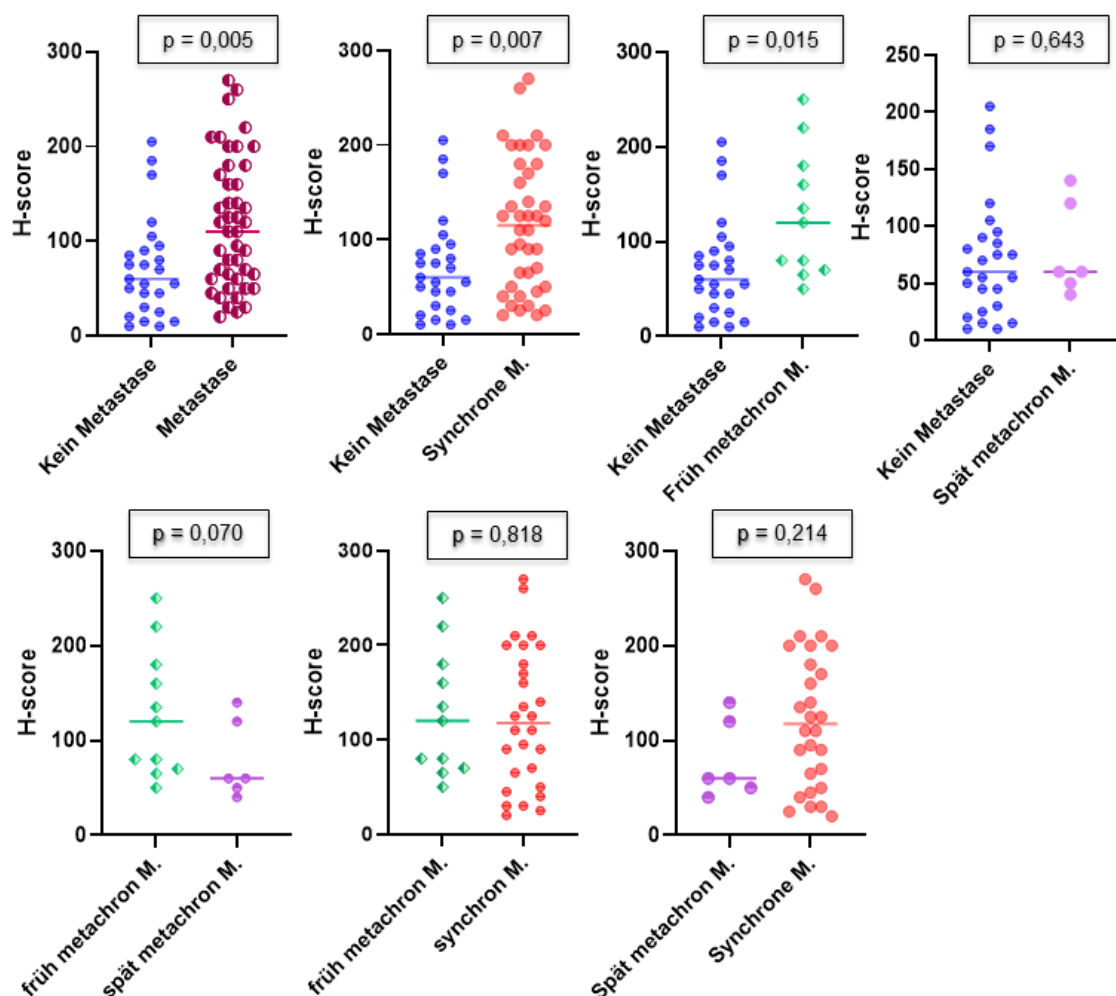


Abbildung 22: Streudiagramme zur Assoziation von membranöser c-MET-Expression und verschiedenen Untergruppen der Metastasierung. Die Punkte kennzeichnen die individuellen H-Scores. Der Median jeder Gruppe ist durch eine horizontale Linie markiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Assoziation von c-MET-m mit...		Test	p-Wert
pT-Stadium	Zusammengefasst über alle Stadien	Kruskal-Wallis	0,034
	T1 vs. T2	Mann-Whitney-U	0,281
	T1 vs. T3	Mann-Whitney-U	0,010
	T1 vs. T4	Mann-Whitney-U	0,147
	T2 vs. T3	Mann-Whitney-U	0,043
	T2 vs. T4	Mann-Whitney-U	0,348
	T3 vs. T4	Mann-Whitney-U	0,592
pN-Stadium	Zusammengefasst über alle Stadien	Kruskal-Wallis	0,116
	N0 und NX vs. N1	Mann-Whitney-U	0,042

	N0 und NX vs. N2	Mann-Whitney-U	0,587
	N1 vs. N2	Mann-Whitney-U	0,548
Grading	Zusammengefasst über alle Stadien	Kruskal-Wallis	0,075
	G1 vs. G2	Mann-Whitney-U	0,546
	G1 vs. G3	Mann-Whitney-U	0,125
	G1 vs. G4	Mann-Whitney-U	0,400
	G2 vs. G3	Mann-Whitney-U	0,027
	G2 vs. G4	Mann-Whitney-U	0,216
	G3 vs. G4	Mann-Whitney-U	0,534
Metastasierung	keine M. vs. M.	Mann-Whitney-U	0,005
	keine M. vs. syn	Mann-Whitney-U	0,007
	keine M. vs. früh meta	Mann-Whitney-U	0,015
	keine M. vs. spät meta	Mann-Whitney-U	0,643
	früh meta vs. spät meta	Mann-Whitney-U	0,078
	früh meta vs. syn	Mann-Whitney-U	0,818
	spät meta vs. syn	Mann-Whitney-U	0,220

Tabelle 11: Nicht-parametrische Testung von c-MET-m mit klinisch-histopathologischen Parametern

6.2.2.2 Assoziation von c-MET-zytoplasmatisch mit klinisch-histopathologischen Parametern

Die nicht-parametrische Testung von c-MET-z ergibt beim pT-Stadium, Grading und der Metastasierung keinerlei statistisch signifikante Assoziation (Tab.12). Lediglich beim Vergleich von pN0 und pNX mit pN2 zeigt sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der c-MET-z-Expression ($p=0,028$; Tab.12), welcher jedoch insbesondere aufgrund der geringen Patientenzahl des pN2-Stadiums (3 Personen) vernachlässigt werden kann.

Assoziation von c-MET-z mit...		Test	p-Wert
pT-Stadium	Zusammengefasst über alle Stadien	Kruskal-Wallis	0,340
	T1 vs. T2	Mann-Whitney-U	0,728
	T1 vs. T3	Mann-Whitney-U	0,174
	T1 vs. T4	Mann-Whitney-U	0,234
	T2 vs. T3	Mann-Whitney-U	0,185
	T2 vs. T4	Mann-Whitney-U	0,296
	T3 vs. T4	Mann-Whitney-U	0,755
pN-Stadium	Zusammengefasst über alle Stadien	Kruskal-Wallis	0,108

	N0 und NX vs. N1	Mann-Whitney-U	0,806
	N0 und NX vs. N2	Mann-Whitney-U	0,028
	N1 vs. N2	Mann-Whitney-U	0,262
Grading	Zusammengefasst über alle Stadien	Kruskal-Wallis	0,408
	G1 vs. G2	Mann-Whitney-U	0,842
	G1 vs. G3	Mann-Whitney-U	0,262
	G1 vs. G4	Mann-Whitney-U	0,700
	G2 vs. G3	Mann-Whitney-U	0,118
	G2 vs. G4	Mann-Whitney-U	0,842
	G3 vs. G4	Mann-Whitney-U	0,740
Metastasierung	keine M. vs. M.	Mann-Whitney-U	0,136
	keine M. vs. syn	Mann-Whitney-U	0,232
	keine M. vs. früh meta	Mann-Whitney-U	0,396
	keine M. vs. spät meta	Mann-Whitney-U	0,158
	früh meta vs. spät meta	Mann-Whitney-U	0,462
	früh meta vs. syn	Mann-Whitney-U	0,988
	spät meta vs. syn	Mann-Whitney-U	0,466

Tabelle 12: Nicht-parametrische Testung von c-MET-z mit klinisch-histopathologischen Parametern

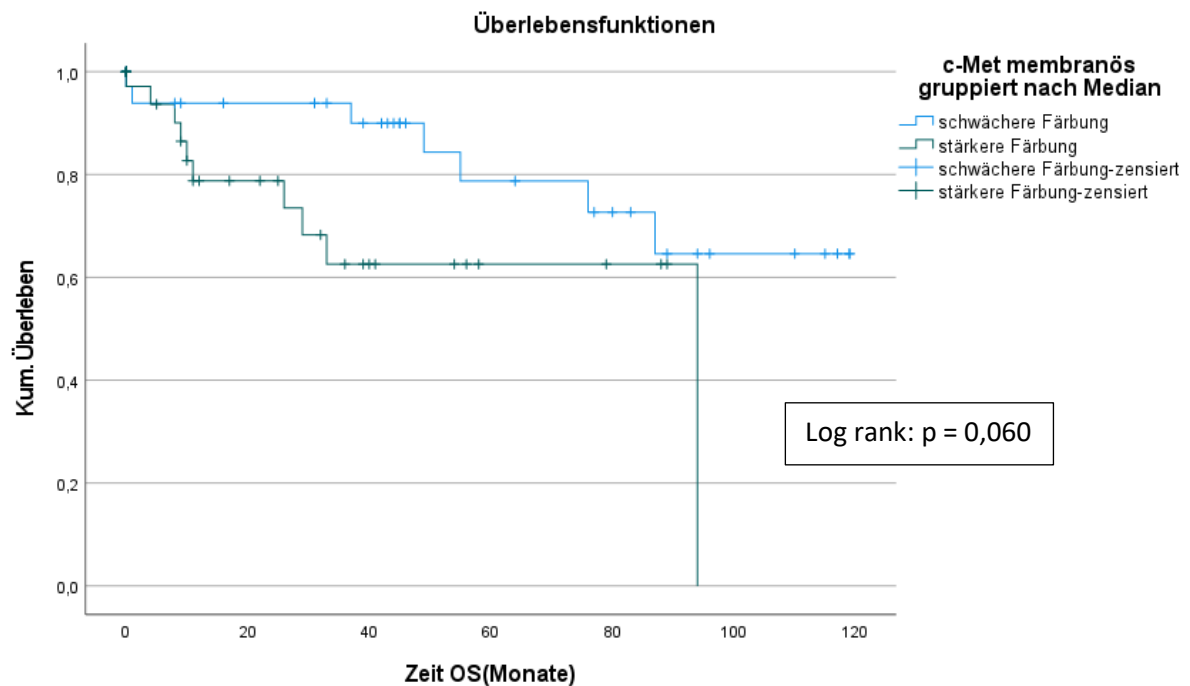
6.3 Überlebensanalyse bezüglich der c-MET-Expression

Mithilfe der Kaplan-Meier-Kurven wurde die prognostische Wertigkeit von c-MET untersucht. Zunächst erfolgte die Gruppierung von c-MET anhand des H-Score-Medians, welcher für die membranöse Expression 82,5 und für die zytoplasmatische Expression 60 beträgt. Daraus ergeben sich folgende Gruppen: c-MET-m^{schwach} von einem H-Score 0 bis 82,5 und c-MET-m^{stark} von > 82,5 bis 270 bzw. c-MET-z^{schwach} von 0 bis 60 und c-MET-z^{stark} von > 60 bis 220. Diese Gruppierungsmethode ist bereits in der Literatur etabliert und ermöglicht den Vergleich von schwacher mit starker Expression.

6.3.1 Analyse von c-MET-membranös gruppiert nach Median

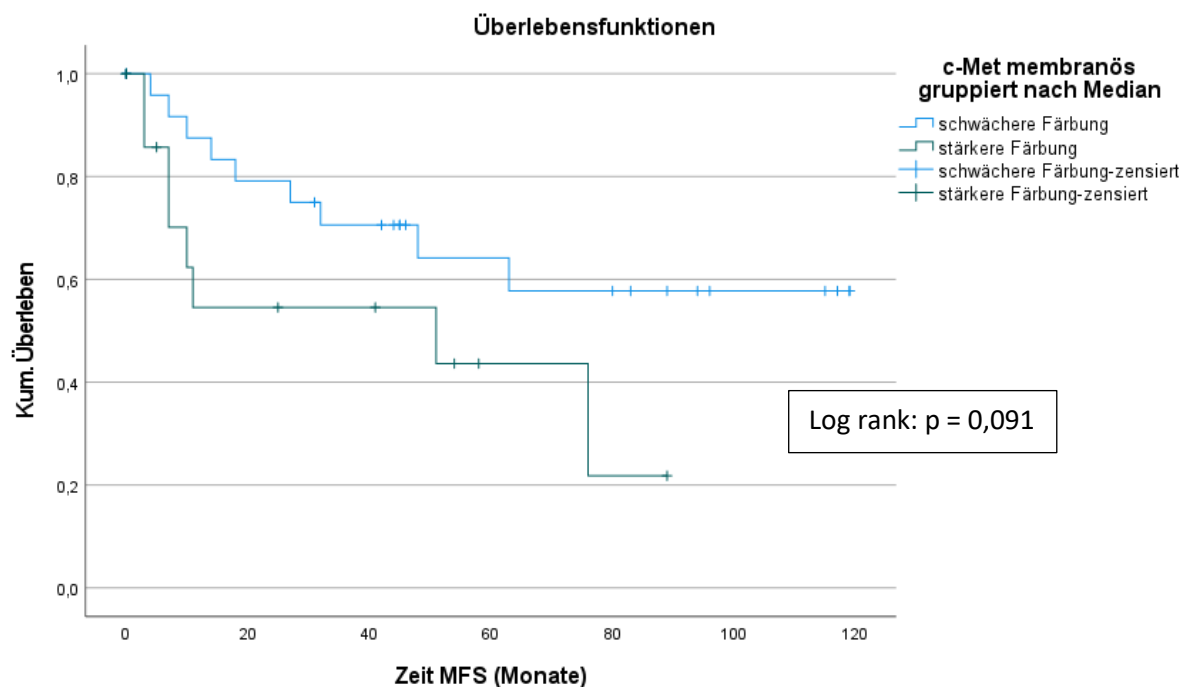
Das OS (p=0,060; Abb.23) und MFS (p=0,091; Abb.24) weisen einen Trend bezüglich der membranösen c-MET-Expression auf. Tendenziell zeigen Patienten der Gruppe c-MET-m^{schwach} ein längeres Gesamtüberleben und bilden später Metastasen als Patienten der Gruppe c-MET-m^{stark}. Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant. Das 5-Jahres-Überleben liegt für c-MET-m^{schwach} bei 79%, für c-MET-m^{stark} bei 63% und das mittlere Gesamtüberleben beträgt 96 Monate (KI: 81-111) bzw. 65 Monate (KI: 49-81). Patienten mit

schwacher Expression bilden im Mittel nach 81 Monaten (KI: 61-100), Patienten mit starker Expression nach 45 Monaten (KI: 25-65) Metastasen.



Number at risk						
c-MET-m ^{schwach}	35	26	22	14	11	5
c-MET-m ^{stark}	35	17	9	4	3	0
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den c-MET-m-Status gruppiert nach Median

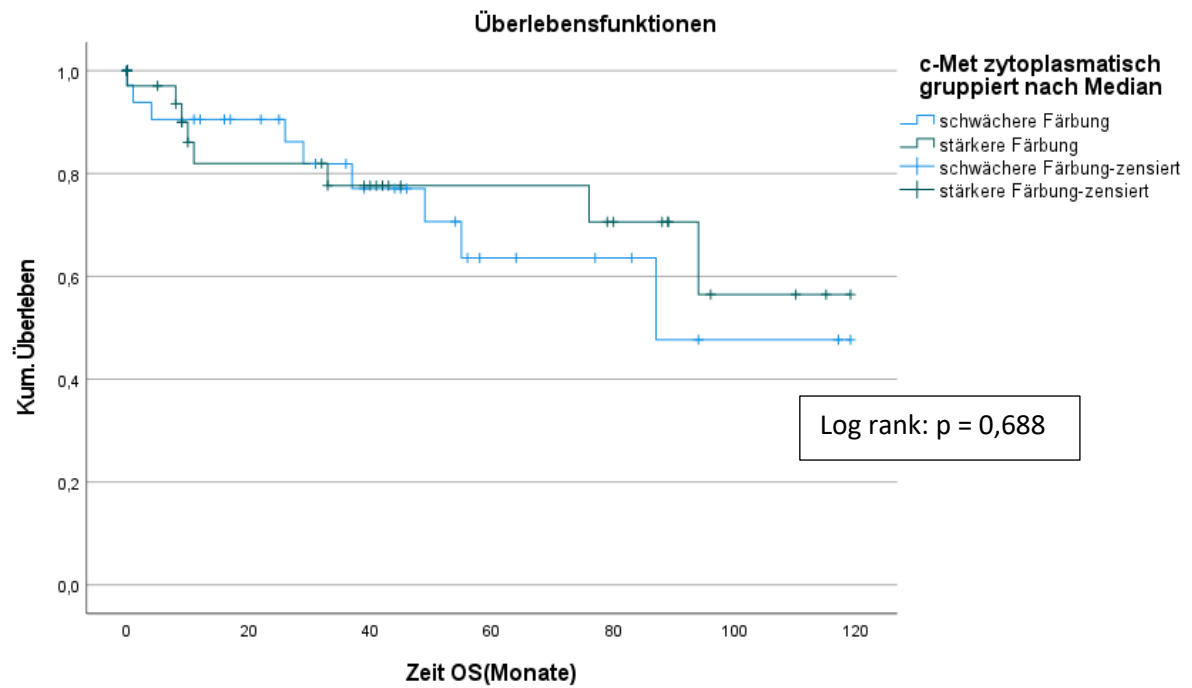


Number at risk						
c-MET-m ^{schwach}	26	19	16	10	9	4
c-MET-m ^{stark}	16	7	6	2	1	0
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den c-MET-m-Status gruppiert nach Median

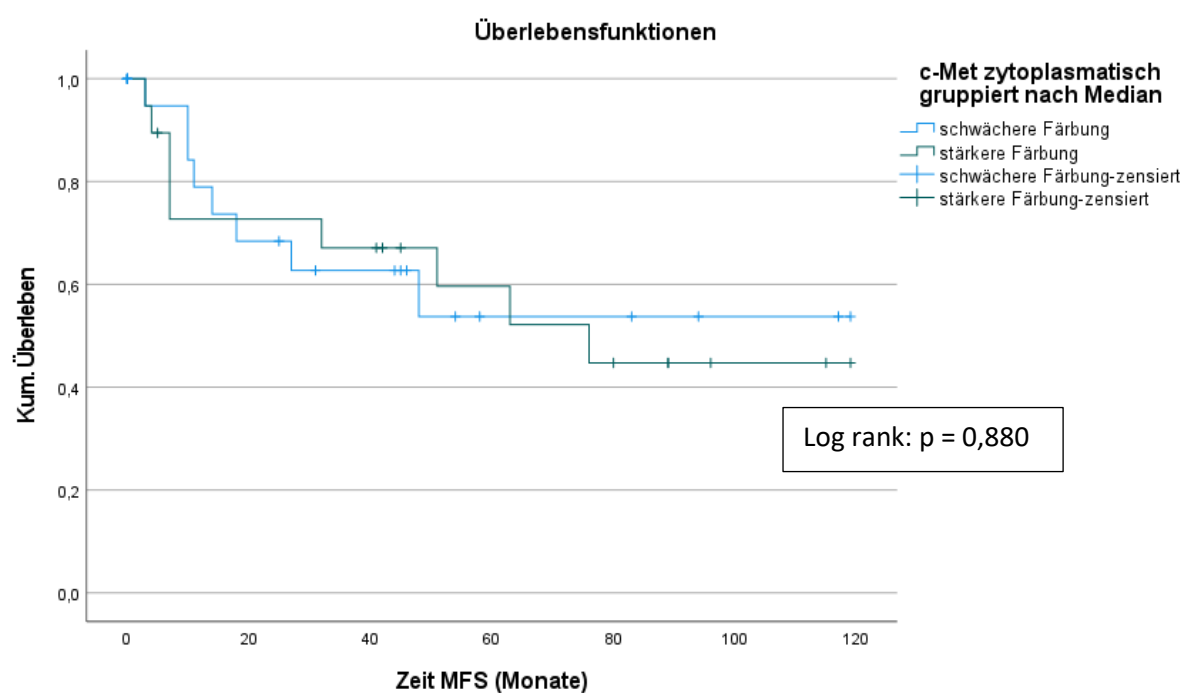
6.3.2 Analyse von c-MET-zytoplasmatisch gruppiert nach Median

Die Intensität der zytoplasmatischen c-MET-Expression weist keinen Unterschied beim OS ($p=0,688$; Abb.25) und MFS ($p=0,880$; Abb.26) auf. Im Gegensatz zu c-MET-m ist hier auch kein Trend zu sehen. Somit haben Patienten beider Gruppen (c-MET-z^{schwach} und c-MET-z^{stark}) ein vergleichbares Gesamtüberleben mit einem Mittelwert von 82 (KI: 63-101) bzw. 89 Monaten (KI: 71-106), sowie einem mittleren metastasenfreien Überleben von 73 (KI: 49-97) bzw. 71 Monaten (KI: 48-94).



Number at risk						
c-MET-z schwach	36	23	15	7	5	2
c-MET-z stark	34	20	16	11	9	3
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den c-MET-z-Status gruppiert nach Median



Number at risk						
c-MET-z^{schwach}	23	13	10	4	4	2
c-MET-z^{stark}	19	13	12	8	6	2
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den c-MET-z-Status gruppiert nach Median

6.3.3 ROC-Analyse

Da die membranöse c-MET-Expression (gruppiert nach Median) zwar einen Trend im OS und MFS bei den zwei verschiedenen Patientengruppen zeigt, jedoch keine statistische Signifikanz beobachtet werden konnte, wurde eine Receiver Operation Characteristics (ROC)-Analyse durchgeführt, um einen geeigneten Trennwert zu erhalten. Hier ergibt sich ein optimaler Trennwert von 107,5 für den membranösen und 52,5 für den zytoplasmatischen H-Score (Abb.27 und 28). Beim membranösen H-Score zeigt sich eine bessere Trennschärfe mit AUC (Area under curve) = 0,704 im Gegensatz zum zytoplasmatischen H-Score mit 0,608. Wie zuvor mit dem Median werden auch hier zwei Gruppen gebildet: c-MET-m^{schwach} von einem H-Score 0 bis 107,5 und c-MET-m^{stark} von >107,5 bis 270 bzw. c-MET-z^{schwach} von 0 bis 52,5 und c-MET-z^{stark} von >52,5 bis 220. In den folgenden Analysen kommt diese Gruppierung zum Einsatz.

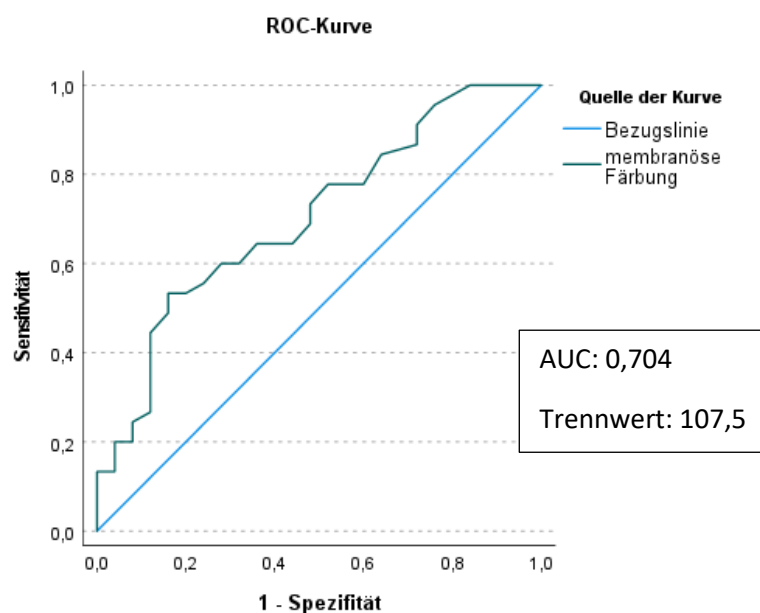


Abbildung 27: ROC-Analyse des membranösen H-Scores. Die Receiver Operating Characteristics (ROC)-Kurve zeigt die Leistungsfähigkeit des membranösen H-Scores zur Unterscheidung von Tumoren mit hoher und niedriger c-MET-Expression. Die AUC ist definiert als Fläche zwischen Bezugslinie und Graph zur membranösen Färbung und kennzeichnet die Trennschärfe.

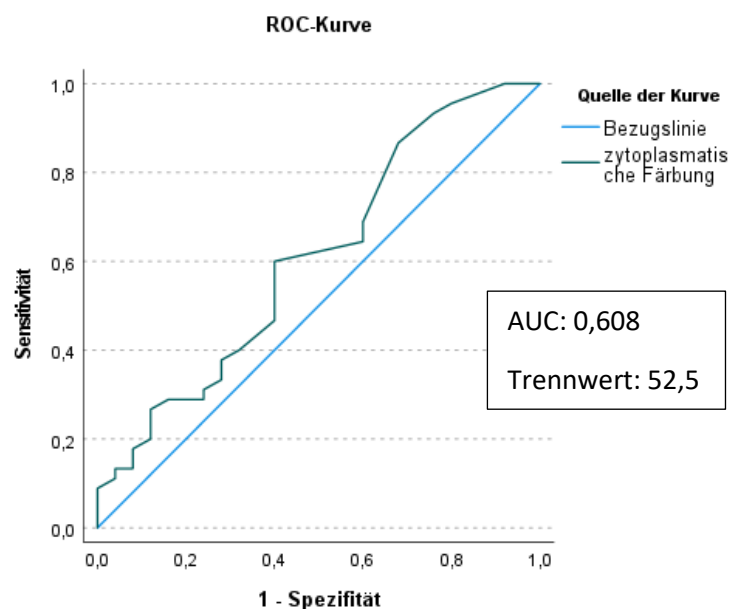
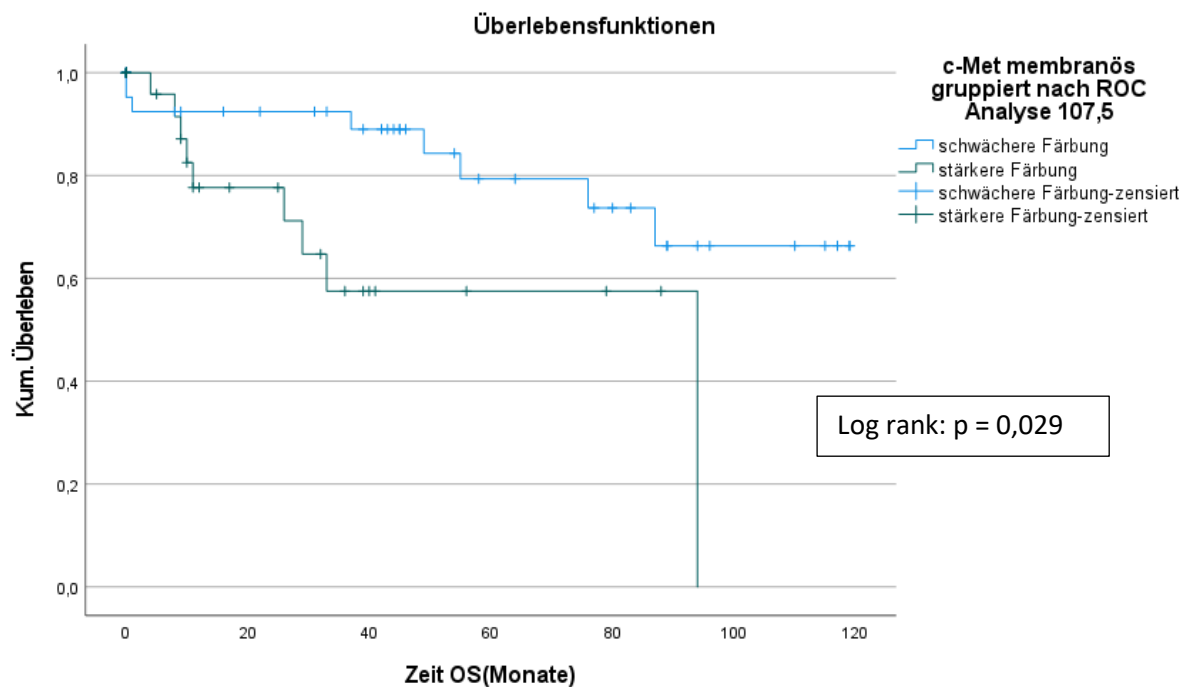


Abbildung 28: ROC-Analyse des zytoplasmatischen H-Scores. Die Receiver Operating Characteristics (ROC)-Kurve zeigt die Leistungsfähigkeit des zytoplasmatischen H-Scores zur Unterscheidung von Tumoren mit hoher und niedriger c-MET-Expression. Die AUC ist definiert als Fläche zwischen Bezugslinie und Graph zur zytoplasmatischen Färbung und kennzeichnet die Trennschärfe.

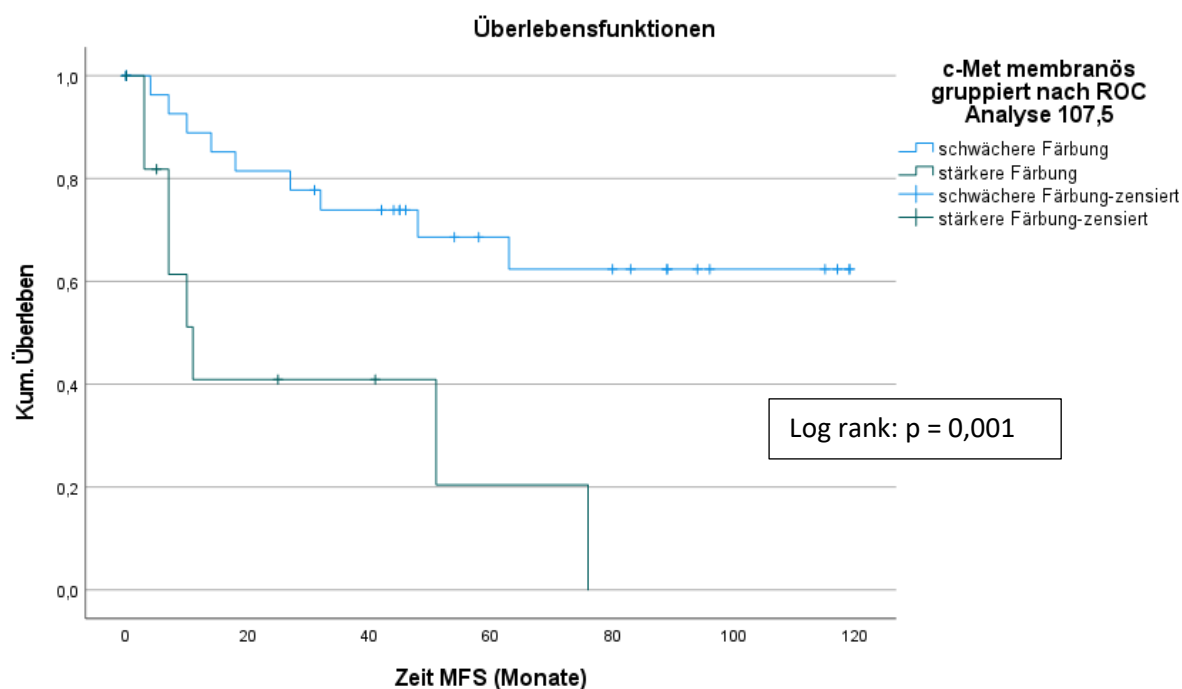
6.3.4 Analyse von c-MET-membranös gruppiert nach ROC-Trennwert

Sowohl das OS ($p=0,029$; Abb.29) als auch das MFS ($p=0,001$; Abb.30) weisen einen signifikanten Unterschied bezüglich der membranösen c-MET-Expression auf. Patienten, bei denen c-MET schwächer exprimiert wird, überleben signifikant länger und bilden auch später Metastasen aus als Patienten mit starker c-MET-Expression. Das mittlere Gesamtüberleben beträgt bei schwacher Expression 96 Monate (KI: 82-110), bei starker Expression 62 Monate (KI: 43-80). Im Mittel bilden Patienten mit schwacher Expression nach 85 Monaten (KI: 67-103) signifikant später Metastasen als die der starken Expressions-Gruppe nach 30 Monaten (KI: 10-50). Das 5-Jahres-Überleben beträgt bei der Gruppe c-MET-m^{schwach} 79% im Vergleich zur Gruppe c-MET-m^{stark} mit 58%. Darüber hinaus sind nach 5 Jahren noch 69% der Patienten mit schwacher Expression metastasenfrei, wohingegen nur noch bei 20% der Patienten der Gruppe mit starker Expression eine Metastasenfreiheit beobachtet werden kann.



Number at risk						
c-MET-m ^{schwach}	42	30	25	15	12	5
c-MET-m ^{stark}	28	13	6	3	2	0
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den c-MET-m-Status gruppiert nach ROC-Trennwert

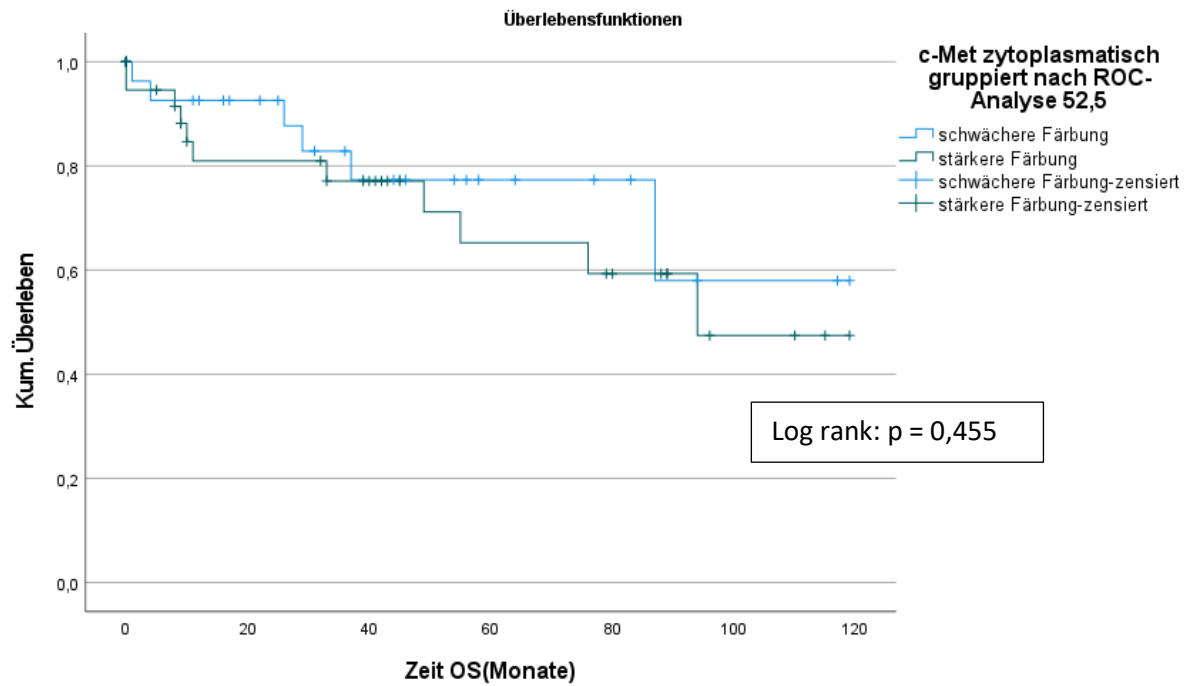


Number at risk						
c-MET-m ^{schwach}	30	22	19	11	10	4
c-MET-m ^{stark}	12	4	3	1	0	0
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve und Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfren Überleben bezogen auf den c-MET-m-Status gruppiert nach ROC-Trennwert

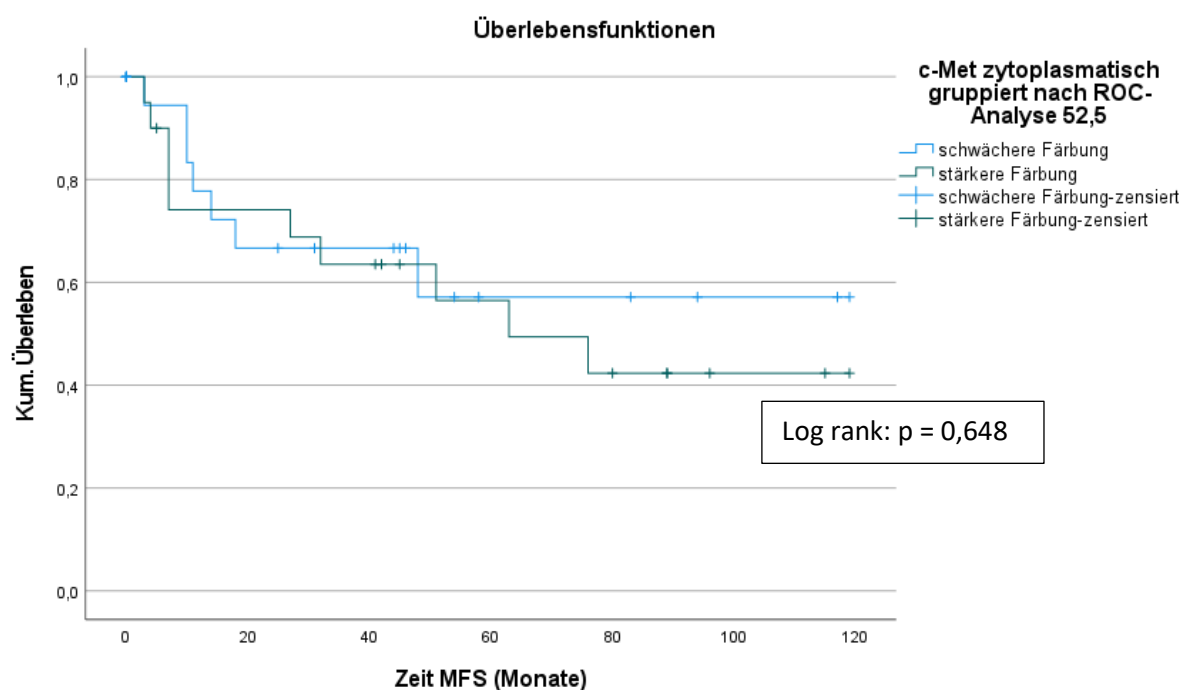
6.3.5 Analyse von c-MET-zytoplasmatisch gruppiert nach ROC-Trennwert

Die Intensität der zytoplasmatischen c-MET-Expression weist auch nach Gruppierung durch die ROC-Analyse keinen Unterschied beim OS ($p=0,455$; Abb.31) und MFS ($p=0,648$; Abb.32) auf. Somit können bei den Patientengruppen c-MET-z^{schwach} und c-MET-z^{stark} ähnliche Überlebenszeiten verzeichnet werden. Das 5-Jahresüberleben beträgt 78% für schwache und 65% für starke zytoplasmatische Expression, das mittlere Gesamtüberleben 90 Monate (KI: 72-110) bzw. 81 Monate (KI: 63-98). Nach 5 Jahren sind in beiden Gruppen etwa 57% der Patienten metastasenfren. Im Mittel bilden Patienten mit c-MET-z^{schwach}-Status nach 76 (KI: 52-101), Patienten mit c-MET-z^{stark} nach 68 Monaten (KI: 46-91) Metastasen.



Number at risk						
c-MET-z schwach	33	21	13	7	5	2
c-MET-z stark	37	22	18	11	9	3
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den c-MET-z-Status gruppiert nach ROC-Trennwert



Number at risk						
c-MET-z schwach	22	12	10	4	4	2
c-MET-z stark	20	14	12	8	6	2
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den c-MET-z-Status gruppiert nach ROC-Trennwert

6.4 Korrelationsanalyse von c-MET und PD-L1

Um potentielle Co-Expressionsmuster von c-MET und PD-L1 zu untersuchen, erfolgte eine Korrelationsanalyse unter Verwendung der immunhistochemischen H-Scores. Ziel dieser Analyse war es, festzustellen, ob die Expressionslevel dieser beiden Proteine miteinander assoziiert sind und damit eine funktionale Beziehung nahelegt. Die Korrelationsanalyse erfolgte getrennt für die membranöse und zytoplasmatische c-MET-Expression. Da die untersuchten Variablen nicht normal verteilt sind (Abb.19 und 20), wurde eine Spearman-Korrelation durchgeführt (Tab.13). Auffällig in der Analyse ist die geringe PD-L1-Expression der untersuchten Gewebeschnitte im Vergleich zur c-MET-Expression mit einem Maximalwert von 100 und Negativität bei 43,3% der Patienten. Weitere 26,7% des Kollektivs weisen einen PD-L1-H-Score von 1 auf. Es ergibt sich eine signifikante mäßig starke Korrelation zwischen membranöser c-MET- und PD-L1-Expression auf den Tumorzellen (Spearman-Korrelationskoeffizient=0,342 p=0,007; Tab.13 und Abb.33). Das Streudiagramm zeigt einen klaren Trend, wobei sich viele Werte entlang einer vertikalen Linie gruppieren (Abb.33). Eine Untergruppe von Proben mit einem c-MET-m H-Score von über 100 weisen auch eine entsprechend höhere PD-L1-Expression von 1-100 auf. Im Gegensatz dazu kann keine signifikante Korrelation zwischen zytoplasmatischer c-MET- und PD-L1-Expression festgestellt werden (Spearman-Korrelationskoeffizient= -0,032 p=0,810; Tab.13 und Abb.34). Ähnlich wie bei c-MET-m liegt auch im Streudiagramm von c-MET-z die Gruppierung vieler Werte entlang einer Vertikalen vor. Allerdings zeigt ein c-MET-z H-Score von über 100 keine auffällig häufig korrespondierende PD-L1-Expression von 1-100.

Korrelation	Spearman-Koeffizient	Signifikanz
c-MET-m und PD-L1	0,342	0,007
c-MET-z und PD-L1	-0,032	0,810

Tabelle 13: Korrelationsanalyse von c-MET und PD-L1. Angegeben sind jeweils die Korrelationskoeffizienten nach Spearman und deren Signifikanz mit getrennter Analyse von c-MET-m und c-MET-z.

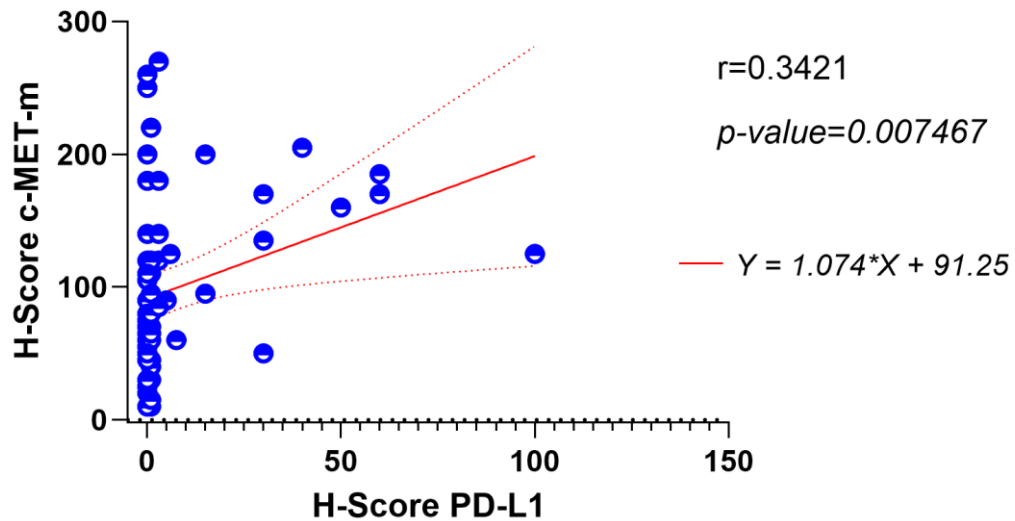


Abbildung 33: Streudiagramm zur Korrelation der membranösen c-MET- und PD-L1-Expression. Blaue Punkte: individuelle Wertepaare aus c-MET-m- und PD-L1-Expression; roter Graph: Graph der Korrelationsgleichung Y; gestrichelte rote Graphen: 95% Konfidenzintervall; r: Spearman-Korrelationskoeffizient

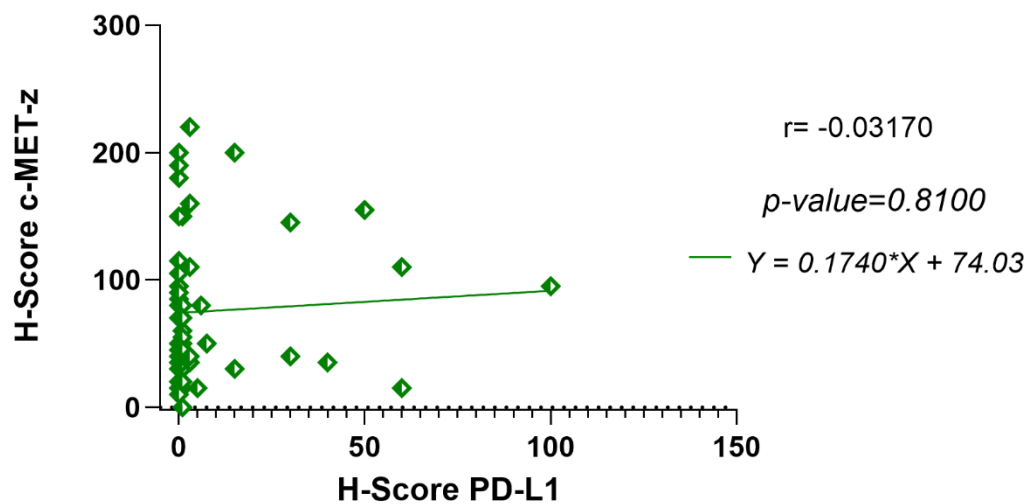


Abbildung 34: Streudiagramm zur Korrelation der zytoplasmatischen c-MET- und PD-L1-Expression. Grüne Vierecke: individuelle Wertepaare aus c-MET-z- und PD-L1-Expression; grüner Graph: Graph der Korrelationsgleichung Y; r: Spearman-Korrelationskoeffizient

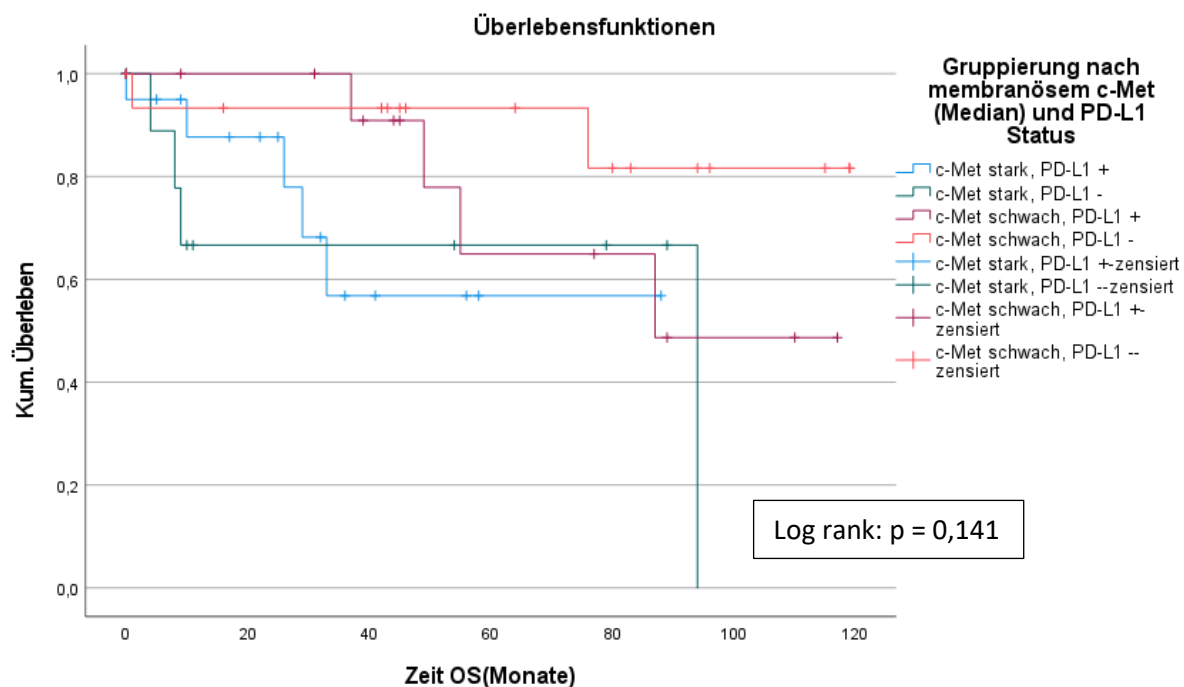
6.5 Überlebensanalyse der Kombination aus c-MET- und PD-L1-Expression

Wir klassifizierten die Patientenfälle nach c-MET-Expression (membranös oder zytoplasmatisch) und PD-L1-Expression der Tumorzellen und führten daraufhin Überlebensanalysen unter Berücksichtigung beider Marker durch. Aufgrund der größtenteils schwachen oder fehlenden PD-L1-Expression (43,3% negativ) erfolgte eine Gruppierung in PD-L1 negativ bzw. positiv.

6.5.1 Kombinierte Analyse von c-MET-membranös und PD-L1

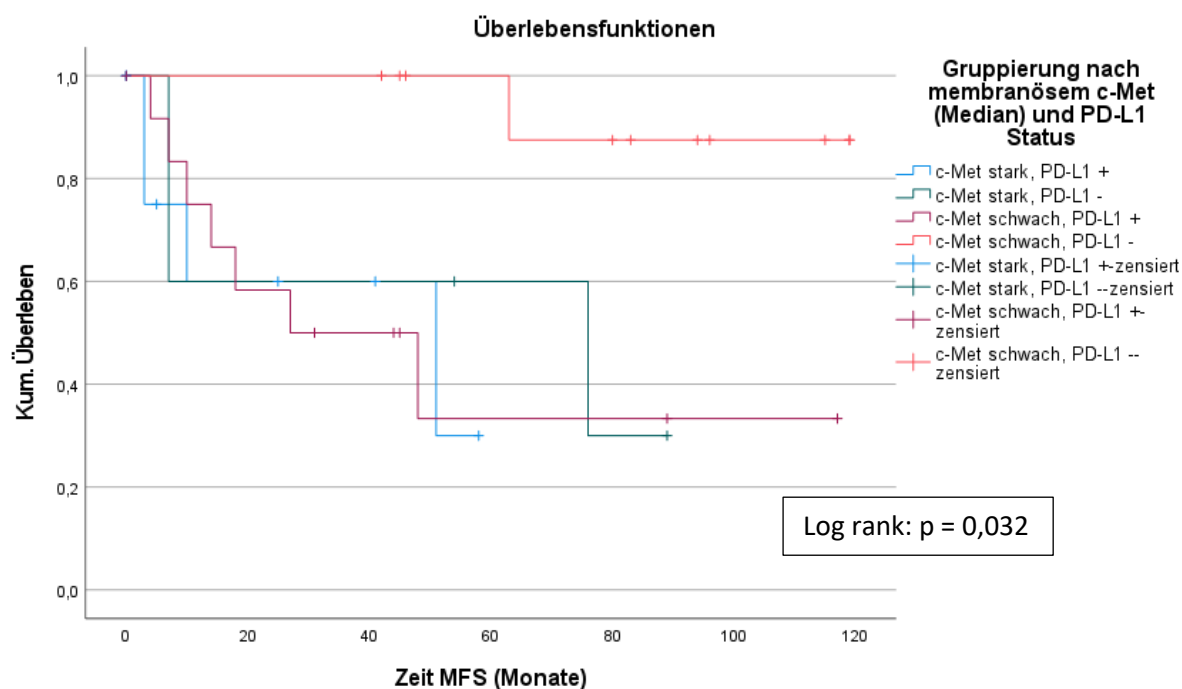
6.5.1.1 c-MET-membranös gruppiert nach Median

In dieser Analyse wurde PD-L1-Positivität als H-Score >0 definiert, während c-MET-m anhand des Medians von 82,5 in eine schwache und starke Gruppe unterteilt wurde. Gruppiert man c-MET-m nach dem Median ergibt sich kein signifikanter Unterschied der einzelnen Kombinationen im Gesamtüberleben ($p=0,141$; Abb.35). Tendenziell haben Patienten mit geringer bzw. keiner Expression der beiden Marker (orange Kurve; Abb.35) die beste Prognose mit einem 5-Jahresüberleben von 93% und einem mittleren Überleben von 106 Monaten (KI: 89-123), allerdings lässt sich insgesamt keine statistische Signifikanz verzeichnen. Anders verhält es sich beim metastasenfreien Überleben ($p=0,032$; Abb.36), welches für die Gruppe c-MET-m^{schwach}/PD-L1- gegenüber allen übrigen Gruppen signifikant länger ist. Patienten des Status c-MET-m^{schwach}/PD-L1 – bilden am spätesten, im Mittel nach 112 Monaten (KI: 99-125), Metastasen. Nach 5 Jahren sind immer noch 100% der Patienten metastasenfrei. In der Gruppe c-MET-m^{stark}/PD-L1 + entwickeln alle Patienten innerhalb von 5 Jahren Metastasen (Mittelwert 35 Monate (KI: 17-53)). Die Gruppe c-MET-m^{stark}/PD-L1 – weist ein 5-Jahres-metastasenfreies-Überleben von 60% bei einem Mittelwert von 52 Monaten (KI: 19-85), die Gruppe c-MET-m^{schwach}/PD-L1 + von 33% bei einem mittleren Wert von 54 Monaten (KI: 24-83) auf. Beim paarweisen Vergleich dieser drei Gruppen untereinander ergibt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des MFS.



Number at risk						
c-MET-m^{stark} & PD-L1+	20	11	4	1	1	0
c-MET-m^{stark} & PD-L1 -	10	4	4	3	2	0
c-MET-m^{schwach} & PD-L1 +	14	12	9	5	4	2
c-MET-m^{schwach} & PD-L1 -	16	13	13	9	7	3
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den kombinierten c-MET-m (gruppiert nach Median) und PD-L1 Status



Number at risk						
c-MET-m ^{stark} & PD-L1 +	10	4	3	0	0	0
c-MET-m ^{stark} & PD-L1 -	5	3	3	2	1	0
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 +	13	7	5	2	2	1
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 -	11	11	11	8	7	3
Monate	0	20	40	60	80	100

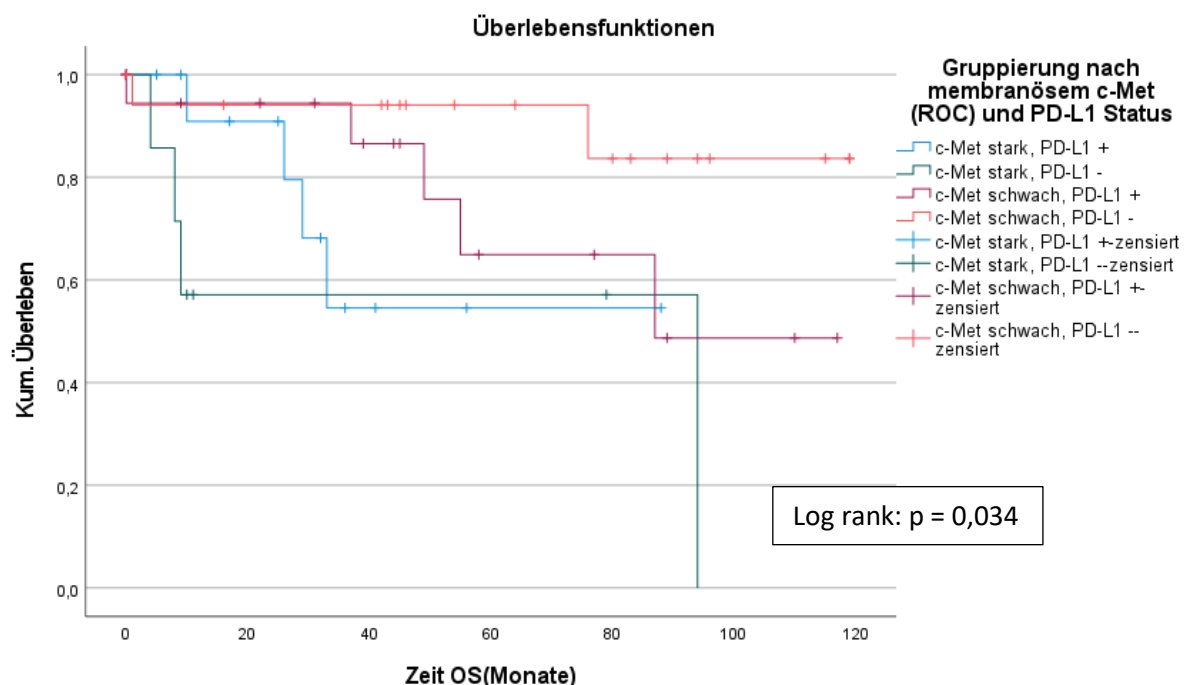
Abbildung 36: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den kombinierten c-MET-m (gruppiert nach Median) und PD-L1 Status

6.5.1.2 c-MET-membranös gruppiert nach ROC-Trennwert

Diese Untersuchung berücksichtigte die Gruppierung des membranösen c-MET H-Scores basierend auf der ROC-Analyse. Die Analyse des Gesamtüberlebens zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen ($p=0,034$; Abb.37). Patienten mit dem Status c-MET-m^{schwach}/PD-L1 - überleben am längsten, hier beträgt das 5-Jahres-Überleben 94% bei einem Mittelwert von 108 Monaten (KI: 92-123). Im Gegensatz dazu weisen insbesondere die Gruppen c-MET-m^{stark}/PD-L1 + und c-MET-m^{stark}/PD-L1 - ein kürzeres Gesamtüberleben (Mittelwert 60 Monate (KI: 39-81) bzw. 57 Monate (KI: 20-94)) auf und besitzen jeweils ein ähnliches 5-Jahres-Überleben zwischen 55% und 60%. Patienten mit dem Status c-MET-m^{schwach}/PD-L1 + haben zwar ein längeres Überleben als die zuletzt genannten

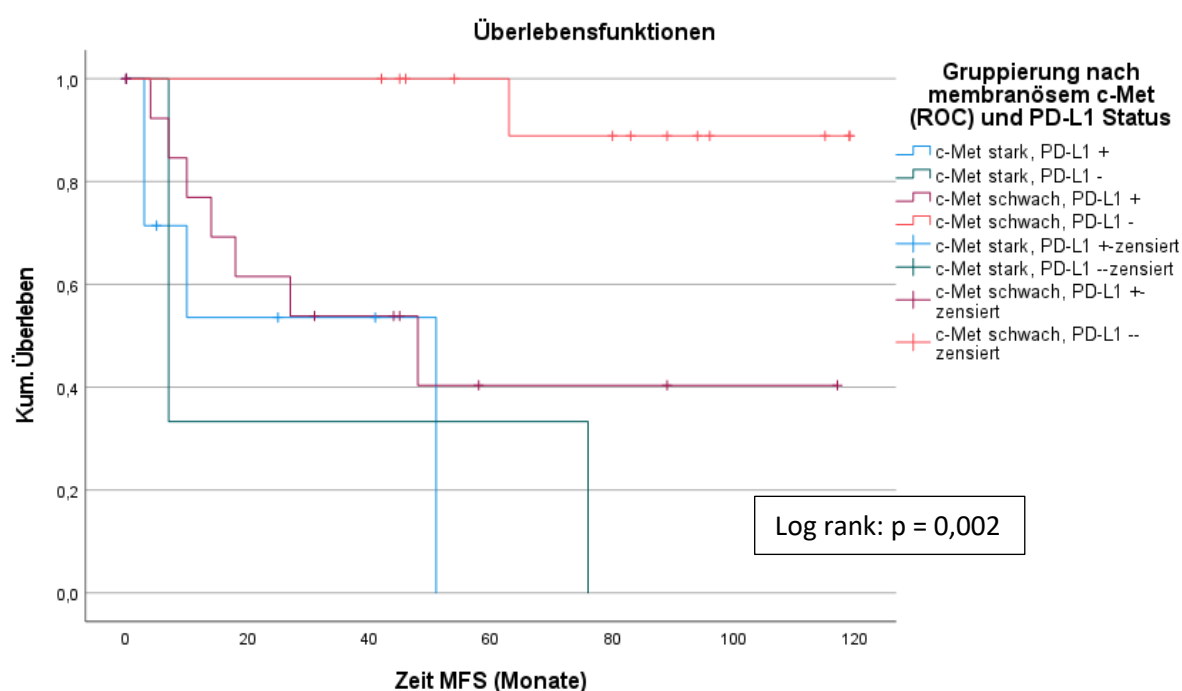
Gruppen (5-Jahres-Überleben 65%, mittleres Überleben 85 Monate (KI: 64-107)), dennoch ist klar zu erkennen, dass eine geringe bzw. keine Expression beider Parameter die signifikant beste Prognose hat (orange Kurve; Abb.37). Ändert man also die Gruppierung von c-MET im Gegensatz zur vorherigen Analyse (Kapitel 6.5.1.1), so spielt dessen Status ebenfalls eine Rolle für das Gesamtüberleben.

Bei der Analyse des MFS zeigt sich ebenso ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe c-MET-m^{schwach}/PD-L1- und den übrigen Gruppen ($p=0,002$; Abb.38). Wie schon bei der Gruppierung nach Median haben Patienten des Status c-MET-m^{schwach}/PD-L1 – die beste Prognose bezüglich der Metastasierung. Auch hier sind nach 5 Jahren immer noch 100% der Patienten metastasenfrei, im Mittel kommt es nach 113 Monaten (KI: 101-124) zur Metastasierung. In der Gruppe c-MET-m^{stark}/PD-L1 + entwickeln alle Patienten innerhalb von 5 Jahren Metastasen (Mittelwert 30 Monate; KI: 10-50). Die Gruppe c-MET-m^{stark}/PD-L1 – weist ein 5-Jahres-metastasenfreies-Überleben von 33% (Mittelwert 30 Monate; KI: 0-75), die Gruppe c-MET-m^{schwach}/PD-L1 + von 40% (Mittelwert 60 Monate; KI: 31-88) auf. Zu beachten ist jedoch die geringe Patientenzahl von 3 in der zuerst genannten Gruppe, was den Vergleich erschwert.



Number at risk						
c-MET-m ^{stark} & PD-L1+	16	9	3	1	1	0
c-MET-m ^{stark} & PD-L1 -	7	2	2	2	1	0
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 +	18	14	10	5	4	2
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 -	19	15	15	10	8	3
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den kombinierten c-MET-m (gruppiert nach ROC) und PD-L1 Status



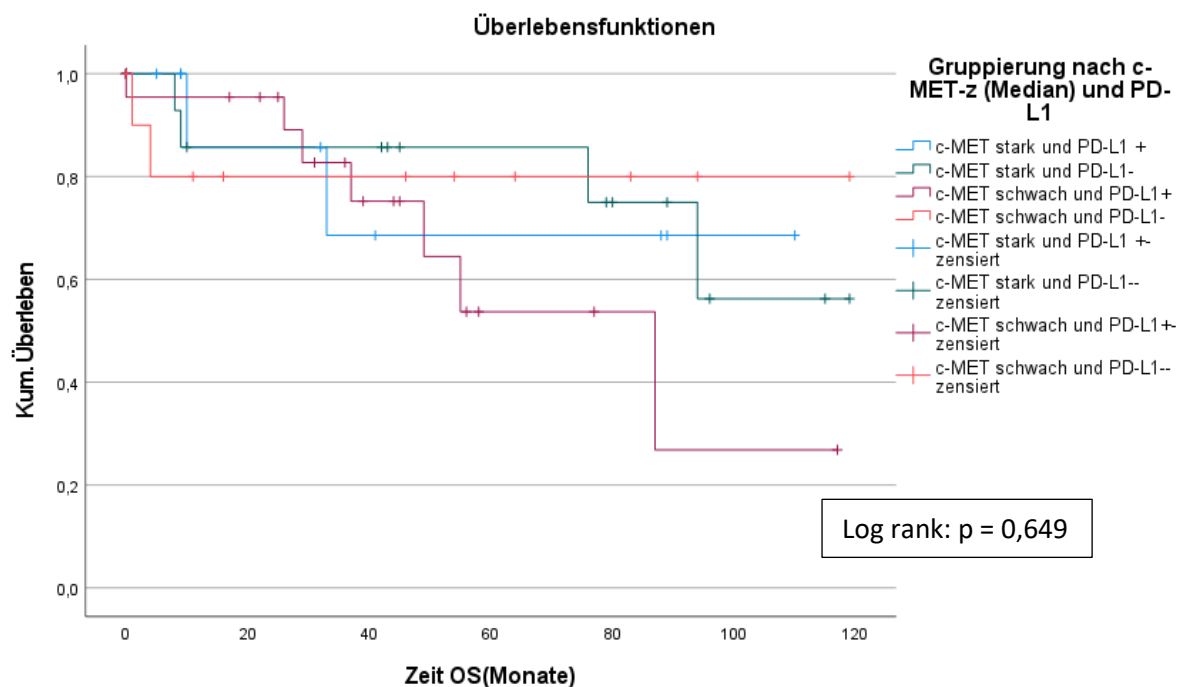
Number at risk						
c-MET-m ^{stark} & PD-L1 +	8	3	2	0	0	0
c-MET-m ^{stark} & PD-L1 -	3	1	1	1	0	0
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 +	15	8	6	2	2	1
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 -	13	13	13	9	8	3
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den kombinierten c-MET-m (gruppiert nach ROC) und PD-L1 Status

6.5.2 Kombinierte Analyse von c-MET-zytoplasmatisch und PD-L1

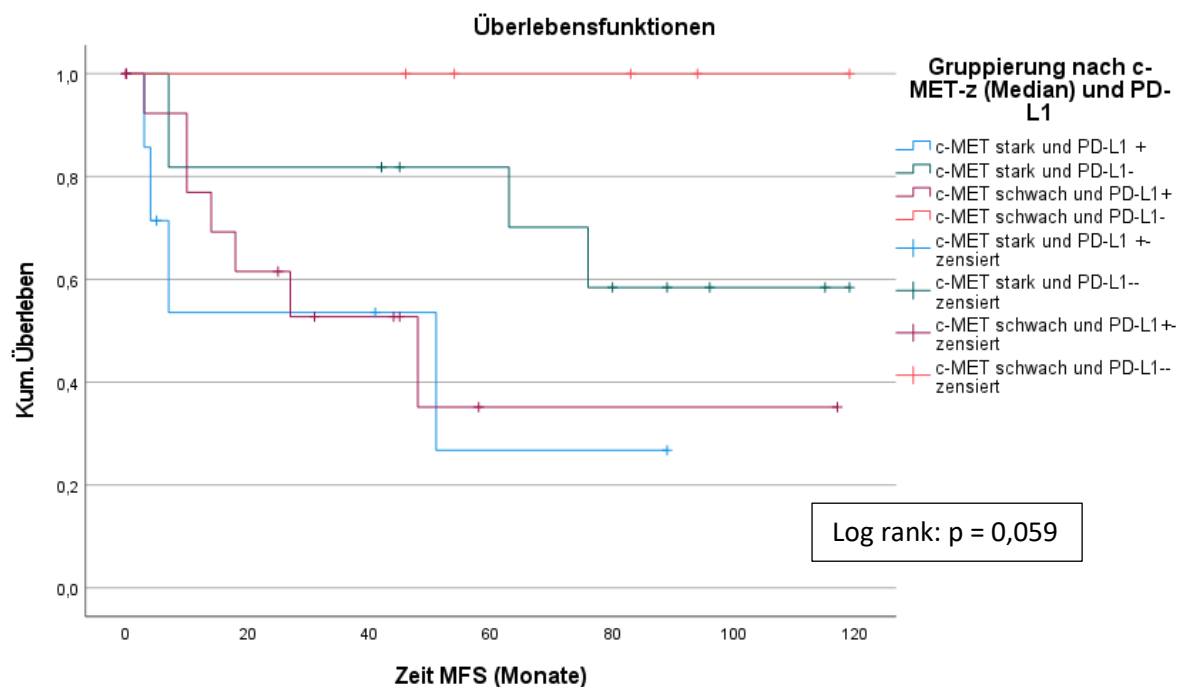
6.5.2.1 c-MET-zytoplasmatisch gruppiert nach Median

In dieser Analyse wurde PD-L1-Positivität weiterhin als H-Score >0 definiert, während c-MET-z anhand des Medians von 60 in eine schwache und starke Gruppe unterteilt wurde. In der kombinierten Analyse von c-MET-z gruppiert nach Median und der PD-L1-Expression kann kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben der verschiedenen Patientengruppen beobachtet werden ($p=0,649$; Abb.39). Das höchste 5-Jahresüberleben zeigt die Gruppe c-MET-z^{stark}/PD-L1- mit 86% bei einem Mittelwert von 94 Monaten (KI: 73-115), das kürzeste hingegen Patienten mit c-MET-z^{schwach}/PD-L1+ mit 54% bei einem Mittelwert von 72 Monaten (KI: 51-94), jedoch ohne statistische Signifikanz. Im Vergleich dazu ist beim MFS in Zusammenschau aller Gruppen ein Trend in der Überlebensanalyse zu verzeichnen ($p=0,059$; Abb.40). Wie auch schon in der vorherigen Untersuchung von c-MET-m zeigt die Gruppe c-MET-z^{schwach}/PD-L1- das längste metastasenfreie Überleben. Zu beachten ist jedoch die geringe Anzahl von 5 Patienten in dieser Kategorie. Nur noch 35% bzw. 27% der Patienten mit c-MET-z^{schwach}/PD-L1+ und c-MET-z^{stark}/PD-L1+ Status weisen nach 5 Jahren eine Metastasenfreiheit auf. Beim paarweisen Vergleich dieser beiden Gruppen mit der Gruppe c-MET-z^{schwach}/PD-L1- ergeben sich signifikante Unterschiede bezüglich des MFS ($p=0,040$ und $p=0,033$). In dieser Analyse hat daher der PD-L1-Status den tendenziell größeren negativen Einfluss auf die Metastasierung.



Number at risk						
c-MET-m ^{stark} & PD-L1+	12	6	4	3	3	1
c-MET-m ^{stark} & PD-L1 -	15	11	11	8	6	2
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 +	22	17	9	3	2	1
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 -	11	6	6	4	3	1
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 39: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den kombinierten c-MET-z (gruppiert nach Median) und PD-L1 Status



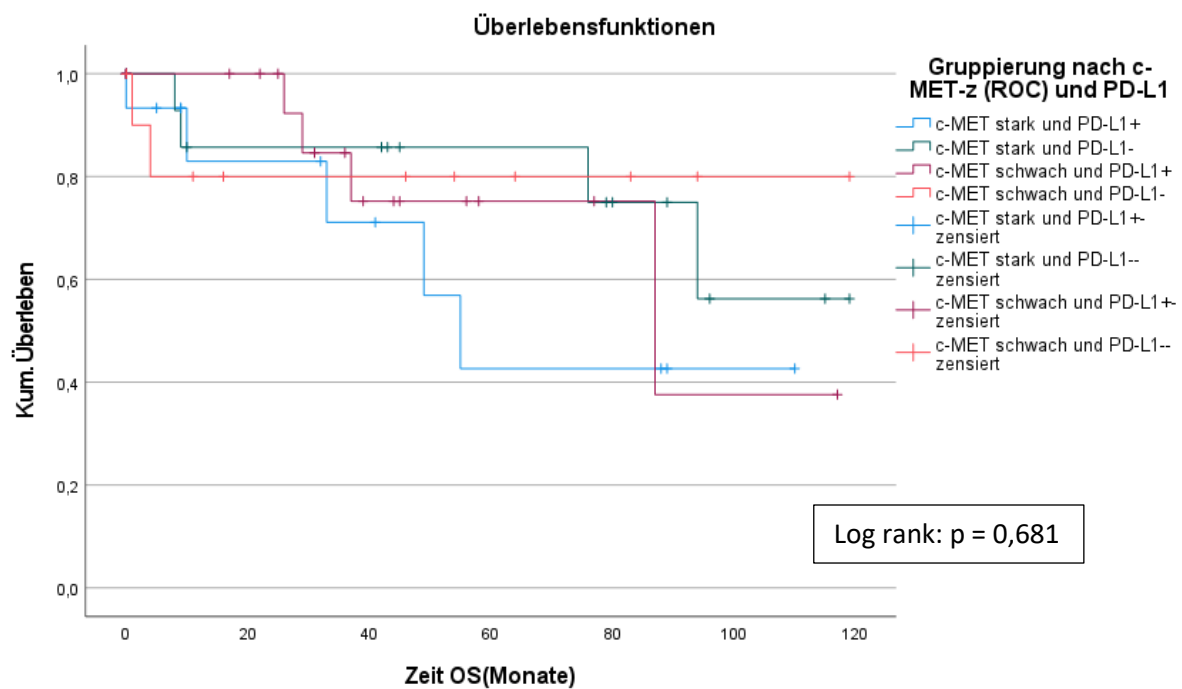
Number at risk						
c-MET-m ^{stark} & PD-L1+	7	3	3	1	1	0
c-MET-m ^{stark} & PD-L1 -	11	9	9	7	5	2
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 +	16	8	5	1	1	1
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 -	5	5	5	3	3	1
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 40: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den kombinierten c-MET-z (gruppiert nach Median) und PD-L1 Status

6.5.2.2 c-MET-zytoplasmatisch gruppiert nach ROC-Trennwert

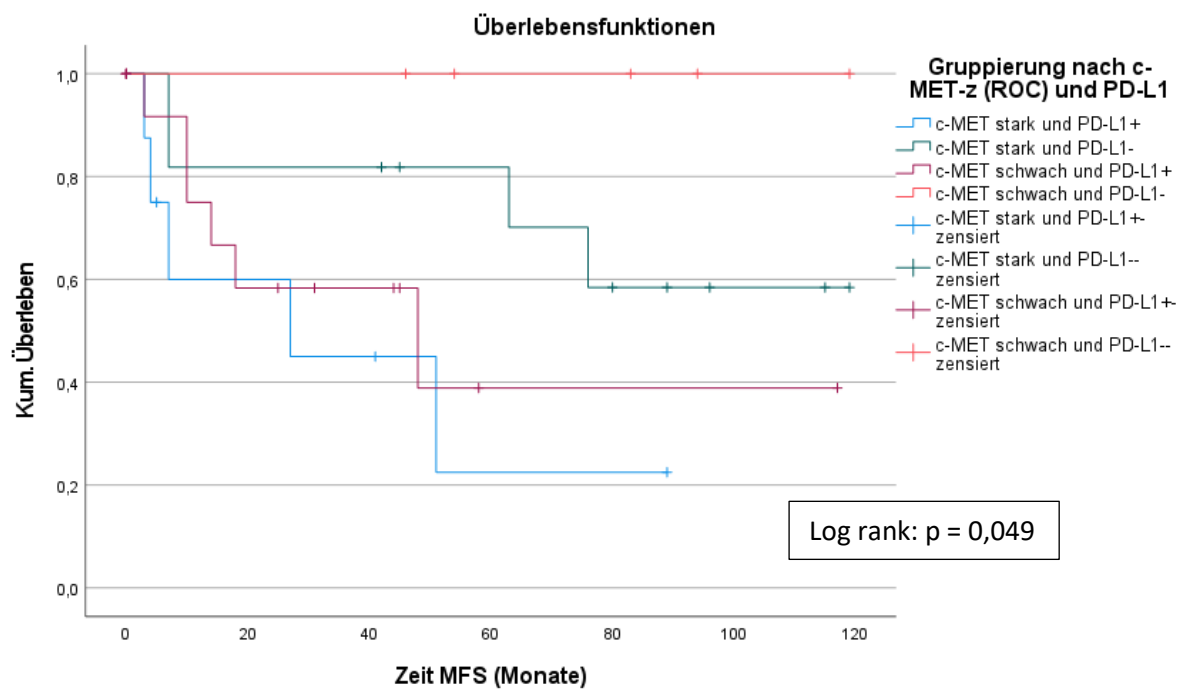
Gruppiert man c-MET-z nach dem ROC-Trennwert, so findet sich beim Gesamtüberleben ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kategorien ($p=0,681$; Abb.41). Das 5-Jahresüberleben von c-MET-z^{stark}/PD-L1+ ist mit 43% am kürzesten, die übrigen Gruppen bewegen sich um einen Wert von 75 - 86%. Auch das mittlere Überleben ist in der zuerst genannten Gruppe mit 67 Monaten (KI: 40-93) im Vergleich zu etwa 90 Monaten in den übrigen Gruppen am kürzesten. Insgesamt kann für den kombinierten c-MET-z-Status unabhängig von der Gruppierung und den PD-L1-Status kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben verzeichnet werden. Anders verhält es sich beim MFS, welches einen gerade noch signifikanten Unterschied zwischen den Kategorien zeigt ($p=0,049$; Abb.42). Wie

schon bei der Analyse von c-MET-m haben auch hier Patienten mit c-MET-z^{schwach}/PD-L1- Status die beste Prognose bezüglich der Metastasierung. Allerdings können wiederum nur 5 Patienten dieser Gruppe zugeordnet werden. Die schlechteste Prognose weisen Patienten mit c-MET-z^{schwach}/PD-L1+ (5-Jahres-metastasenfreies-Überleben 39%) und c-MET-z^{stark}/PD-L1+ Status (22%) auf. Der paarweise Vergleich dieser beiden Gruppen mit Patienten des c-MET-z^{schwach}/PD-L1- Status ergibt einen fast signifikanten bzw. signifikanten Unterschied im MFS ($p=0,052$ bzw. $0,021$). In dieser Analyse hat der PD-L1-Status einen tendenziell stärkeren negativen Einfluss auf die Metastasierung als c-MET.



Number at risk						
c-MET-m ^{stark} & PD-L1+	15	8	6	3	3	1
c-MET-m ^{stark} & PD-L1 -	15	11	11	8	6	2
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 +	19	15	7	3	2	1
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 -	11	6	6	4	3	1
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 41: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum Gesamtüberleben bezogen auf den kombinierten c-MET-z (gruppiert nach ROC) und PD-L1 Status



Number at risk						
c-MET-m ^{stark} & PD-L1+	8	4	3	1	1	0
c-MET-m ^{stark} & PD-L1 -	11	9	9	7	5	2
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 +	15	7	5	1	1	1
c-MET-m ^{schwach} & PD-L1 -	5	5	5	3	3	1
Monate	0	20	40	60	80	100

Abbildung 42: Kaplan-Meier-Kurve mit Number-at-risk-Tabelle zum metastasenfreien Überleben bezogen auf den kombinierten c-MET-z (gruppiert nach ROC) und PD-L1 Status

6.6 Cox-Regression

6.6.1 Univariate Cox-Regression

Um den Einfluss einzelner Variablen auf das Überleben zu bestimmen, erfolgte zunächst eine univariate Cox-Regression nach der Einschluss-Methode (Tab.14). Diese identifiziert das pT-Stadium als signifikante Risikovariablen für das OS und MFS (jeweils $p=0,001$). Bei getrennter Betrachtung der Untergruppen zeigen sich das pT3- und pT4-Stadium mit einer Hazard-Ratio von 7,64 (95% KI= 1,56-37,43) bzw. 44,57 (95% KI= 5,26-377,86) als signifikante Parameter für das Gesamtüberleben ($p=0,012$ bzw. $p<0,001$). Gleiches gilt für das metastasenfreie Überleben mit einer Hazard-Ratio von 5,1 (95% KI= 1,10-23,61; $p=0,037$) bzw. 43,26 (95% KI= 6,16-303,85; $p<0,001$). Allerdings fließen lediglich 7 (OS) bzw. 3 (MFS) Patienten in die Analyse von pT4 ein, sodass deren Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden sollten.

Der Nodalstatus wurde nicht in die Untersuchung mit aufgenommen, da dieser beim Großteil des Kollektivs unbekannt ist. Bezüglich des Gradings ergibt sich bei Betrachtung der gesamten Variable eine signifikante Risikosteigerung von 3,29 (95% KI= 1,29-8,36) für das OS ($p=0,012$), was nicht auf das metastasenfreie Überleben zutrifft ($p=0,448$). Da lediglich 3 Patienten (OS) bzw. 2 Patienten (MFS) den niedrigsten Malignitätsgrad G1 aufweisen, ist dies für eine Referenz nicht ausreichend, sodass eine getrennte Analyse der einzelnen Gradings nicht durchgeführt wird. Darüber hinaus ist das Grading bei etwa 40% der Patienten unbekannt, weshalb die Zahl der Ereignisse (für das OS: Tod) für diese Variable ebenfalls reduziert ist. Aus diesem Grund ist der Einschluss des Gradings in die anschließende multivariable Analyse nicht sinnvoll. Für Patienten mit Metastasierung zum OP-Zeitpunkt (=synchron) ergibt sich eine 5-fache Risikosteigerung (95% KI= 1,87-14,54) beim Gesamtüberleben verglichen mit solchen ohne Metastasen ($p=0,002$).

Die Analyse von c-MET-m gruppiert nach Median zeigt keinen signifikanten Einfluss auf OS und MFS, wohingegen bei Trennung nach ROC eine Risikosteigerung zu verzeichnen ist. Es liegt eine Hazard-Ratio von 2,87 (95% KI= 1,07-7,68) beim Gesamt- und 4,27 (95% KI= 1,61-11,33) beim metastasenfreien Überleben vor ($p=0,036$ bzw. $p=0,004$). Im Vergleich dazu können bei der Analyse von c-MET-z für beide Überlebenszeiten keine Signifikanzen festgestellt werden (Tab.14).

Als Letztes folgt die Untersuchung der c-MET und PD-L1 Kombination. Es ergibt sich keine signifikante Risikosteigerung für die Gruppierung c-MET-m (Median) und PD-L1 beim OS. Bezüglich des MFS zeigen Patienten der Gruppen c-MET^{stark}/PD-L1+ und c-MET^{schwach}/PD-L1+ zwar eine signifikante Risikosteigerung von 14,31 (95% KI= 1,51-135,62; $p=0,020$) bzw. 11,57 (95% KI= 1,39-96,47; $p=0,024$) gegenüber der Referenz, allerdings besteht für die Gesamtvariable kein signifikanter Einfluss ($p=0,126$), weshalb sie nicht in die multivariable

Analyse eingeschlossen wird. Gleiches gilt für die Variable c-MET-m (ROC)/PD-L1 beim OS, welche im Gesamten ebenfalls keine signifikante Risikosteigerung aufweist ($p=0,074$). Anders verhält es sich diesbezüglich beim MFS. Alle drei Gruppierungen (c-MET-m^{stark}/PD-L1+, c-MET-m^{stark}/PD-L1- und c-MET-m^{schwach}/PD-L1+) zeigen ein signifikant erhöhtes Risiko von 23,22 (95% KI= 2,44-221,32); 23,56 (95% KI= 2,43-228,30) bzw. 12,52 (95% KI= 1,50-104,23) gegenüber der Referenzkohorte ($p=0,006$; $p=0,006$ bzw. $p=0,019$). Insgesamt beträgt die Signifikanz für diese Variable $p=0,034$. Die Analyse der Kombination c-MET-z und PD-L1 ergibt sowohl bei Gruppierung nach Median als auch nach ROC-Trennwert keine signifikanten Ergebnisse.

Parameter		OS		MFS	
		Hazard Ratio (95% KI)	p-Wert	Hazard Ratio (95% KI)	p-Wert
pT-Stadium	pT1	Referenz		Referenz	
	pT2	1,76 (0,32-9,66)	0,515	1,82 (0,47-7,06)	0,385
	pT3	7,64 (1,56-37,43)	0,012	5,10 (1,10-23,61)	0,037
	pT4	44,57 (5,26-377,86)	<0,001	43,26 (6,16-303,85)	<0,001
	gesamt		0,001		0,001
Grading	gesamt	3,29 (1,29-8,36)	0,012	1,66 (0,45-6,18)	0,448
Metastasierung zum OP-Zeitpunkt	keine	Referenz		Referenz	
	synchron	5,21 (1,87-14,54)	0,002		
c-MET-m Median	schwach	Referenz		Referenz	
	stark	2,53 (0,93-6,86)	0,068	2,23 (0,85-5,82)	0,103
c-MET-m ROC	schwach	Referenz		Referenz	
	stark	2,87 (1,07-7,68)	0,036	4,27 (1,61-11,33)	0,004
c-MET-z Median	schwach	Referenz		Referenz	
	stark	0,82 (0,32-2,15)	0,689	1,08 (0,41-2,82)	0,881
	schwach	Referenz		Referenz	

c-MET-z ROC	stark	1,46 (0,54-3,97)	0,458	1,25 (0,47-3,31)	0,652
c-MET-m (Median) und PD-L1	c-MET ^{schwach} /PD-L1-	Referenz		Referenz	
	c-MET ^{stark} /PD-L1+	5,29 (0,96-29,11)	0,055	14,31 (1,51-135,62)	0,020
	c-MET ^{stark} /PD-L1-	5,28 (0,96-29,15)	0,056	9,03 (0,94-87,13)	0,057
	c-MET ^{schwach} /PD-L1+	2,66 (0,48-14,62)	0,262	11,57 (1,39-96,47)	0,024
	gesamt		0,194		0,126
c-MET-m (ROC) und PD-L1	c-MET ^{schwach} /PD-L1-	Referenz		Referenz	
	c-MET ^{stark} /PD-L1+	5,60 (0,98-32,12)	0,053	23,22 (2,44-221,32)	0,006
	c-MET ^{stark} /PD-L1-	9,15 (1,66-50,45)	0,011	23,56 (2,43-228,30)	0,006
	c-MET ^{schwach} /PD-L1+	3,36 (0,65-17,44)	0,149	12,52 (1,50-104,23)	0,019
	gesamt		0,074		0,034
c-MET-z (Median) und PD-L1	c-MET ^{schwach} /PD-L1-	Referenz		Referenz	
	c-MET ^{stark} /PD-L1+	1,09 (0,15-7,77)	0,933	nicht berechnet (n.b.)	0,912
	c-MET ^{stark} /PD-L1-	1,09 (0,20-5,97)	0,921	n.b.	0,921
	c-MET ^{schwach} /PD-L1+	2,08 (0,43-10,12)	0,366	n.b.	0,914
	gesamt		0,662		0,413
c-MET-z (ROC) und PD-L1	c-MET ^{schwach} /PD-L1-	Referenz		Referenz	
	c-MET ^{stark} /PD-L1+	2,20 (0,42-11,39)	0,348	n.b.	0,913
	c-MET ^{stark} /PD-L1-	1,10 (0,20-6,01)	0,915	n.b.	0,922
	c-MET ^{schwach} /PD-L1+	1,35 (0,24-7,43)	0,733	n.b.	0,916
	gesamt		0,693		0,365

Tabelle 14: Univariate Cox-Regression

6.6.2 Multivariable Cox-Regression

In die Multivariable Cox-Regression (Methode: vorwärts Wald) wurden alle in der univariaten Analyse identifizierten signifikanten Parameter eingeschlossen, um diese auf Unabhängigkeit untereinander zu prüfen (Tab.15). Hierbei wurden nur solche Parameter berücksichtigt, welche in gesamt Betrachtung eine signifikante Risikosteigerung zeigten. Bei einer multivariablen Analyse wie dieser sollten für aussagekräftige Resultate pro untersuchter Variable 10 Ereignisse in der Kohorte vorliegen (OS: Tod und MFS: Metastasierung). In dieser Arbeit sind nur 17 bzw. 28 Ereignisse zu verzeichnen, sodass streng genommen schon ein Vergleich von zwei (OS) bzw. drei (MFS) Variablen nicht sinnvoll wäre. Nichtsdestotrotz wurde die Analyse durchgeführt. Die reduzierte Aussagekraft ist hierbei jedoch zu beachten.

Bezüglich des OS werden die drei Parameter pT-Stadium, Metastasierung zum OP-Zeitpunkt und c-MET-m (ROC) untereinander geprüft. Hierbei erweisen sich die beiden zuerst genannten Parameter als signifikant unabhängig ($p=0,009$ bzw. $p=0,050$), wobei das pT4-Stadium mit einer Risikosteigerung von 36,84 (95% KI= 4,23-320,98) und die Metastasierung mit einer Steigerung von 3,70 (95% KI= 1,00-13,72) einhergeht. Im Gegensatz dazu kann für den c-MET-m (ROC)-Status kein unabhängiger Einfluss auf das Gesamtüberleben verzeichnet werden ($p=0,973$).

Im Hinblick auf das metastasenfrem Überleben fließen die Parameter pT-Stadium, c-MET-m (ROC) und c-MET-m (ROC)/PD-L1 in die Analyse mit ein. Da sich die Daten der letzten beiden Variablen überschneiden, ist deren gleichzeitige Untersuchung nicht sinnvoll, weshalb diese getrennt voneinander jeweils zusammen mit dem pT-Stadium betrachtet werden. Die getrennten Analysen sind durch den schwarzen Doppelstrich gekennzeichnet (Tab.15). Da für das bereits erläuterte OS keine getrennte Analyse nötig war, bezieht sich die untere Tabellenhälfte nur auf das MFS. Berücksichtigt man das pT-Stadium und den c-MET-m (ROC)-Status, so erweisen sich diese als signifikant unabhängige Parameter für das MFS ($p=0,006$ bzw. $p=0,020$). Für das pT3- und pT4-Stadium ergeben sich Hazard-Ratios von 5,74 (95% KI= 1,22-27,04; $p=0,027$) bzw. 22,78 (95% KI= 3,09-167,75; $p=0,002$), für c-MET-m (ROC) eine Risikozunahme von 3,83 (95% KI= 1,24-11,83; $p=0,020$). Die Analyse von pT-Stadium und c-MET-m (ROC)/PD-L1-Status identifiziert Ersteres als unabhängigen Parameter ($p=0,035$) mit einer Hazard Ratio von 14,54 (95% KI= 1,52-139,12; $p=0,020$) für das pT4-Stadium. Die zweite untersuchte Variable ergibt im Gesamten keine signifikante Unabhängigkeit ($p=0,054$), allerdings sind für die beiden Gruppen c-MET-m^{stark}/PD-L1+ und c-MET-m^{schwach}/PD-L1+ signifikante Risikosteigerungen zu beobachten (28,41 95% KI= 2,63-306,60 bzw. 12,68 95% KI= 1,22-131,92). Diese Hazard-Ratios implizieren eine starke Risikozunahme, jedoch sollte dies insbesondere vor dem Hintergrund einer geringen analysierten Fallzahl von 8 Personen mit c-MET-m^{stark}/PD-L1+-Status bewertet werden.

Parameter		OS		MFS	
		Hazard Ratio (95% KI)	p-Wert	Hazard Ratio (95% KI)	p-Wert
pT-Stadium	pT1	Referenz		Referenz	
	pT2	2,11 (0,38-11,83)	0,396	1,47 (0,37-5,84)	0,587
	pT3	3,64 (0,66-20,17)	0,139	5,74 (1,22-27,04)	0,027
	pT4	36,84 (4,23-320,98)	0,001	22,78 (3,09-167,75)	0,002
	gesamt		0,009		0,006
Metastasier- ung zum OP- Zeitpunkt	keine	Referenz		Referenz	
	synchron	3,70 (1,00-13,72)	0,050		
c-MET-m ROC	schwach	Referenz		Referenz	
	stark	n.b.	0,973	3,83 (1,24-11,83)	0,020
pT-Stadium	pT1	Nicht analysiert		Referenz	
	pT2			0,71 (0,14-3,53)	0,671
	pT3			1,79 (0,27-11,74)	0,546
	pT4			14,54 (1,52-139,12)	0,020
	gesamt				0,035
c-MET-m (ROC) und PD-L1	c-MET ^{schwach} /PD-L1-	Nicht analysiert		Referenz	
	c-MET ^{stark} /PD-L1+			28,41 (2,63-306,60)	0,006
	c-MET ^{stark} /PD-L1-			13,04 (0,93-182,81)	0,057
	c-MET ^{schwach} /PD-L1+			12,68 (1,22-131,92)	0,034
	gesamt				0,054

Tabelle 15: Multivariable Cox-Regression. Die Tabellenhälfte unterhalb des schwarzen Doppelstrichs bezieht sich nur auf die multivariable Analyse des metastasenfrenen Überlebens.

6.7 Analyse der p-MET-Expression

6.7.1 Etablierung

Zunächst wurde für phosphoryliertes-MET (aktive Form von c-MET) ein ähnliches Protokoll wie für c-MET verwendet. Die Demaskierungszeit betrug allerdings 12,5 min und die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte 1h lang bei Raumtemperatur. Der Hersteller Cell Signaling Technology von dem Antikörper Phospho-Met (Tyr1234/1235) (D26) XP Rabbit mAb gab als Verdünnung für die Immunhistochemie von paraffinierten Schnitten 1:320 an. Anhand dieser Angabe wurden zunächst die Verdünnungen 1:150, 1:250 und 1:350 getestet. Allerdings zeigte keiner der klarzelligen NZK-Gewebeschnitte ein positives Signal. Aus diesem Grund wurde zur Signalverstärkung zum einen die Demaskierungszeit auf 15 min und 20 min erhöht, zum anderen die Antikörperverdünnung auf 1:150 und 1:100 erniedrigt. Doch auch diese Änderungen brachten nicht das gewünschte Ergebnis. Als Nächstes kam anstelle des Diluents von Dako eine 3% BSA in PBS Lösung zum Einsatz, zudem wurde die Verdünnung nochmals auf 1:80 reduziert. Auch hier konnte man unter dem Mikroskop keine spezifische Färbung erkennen (Abb.43).

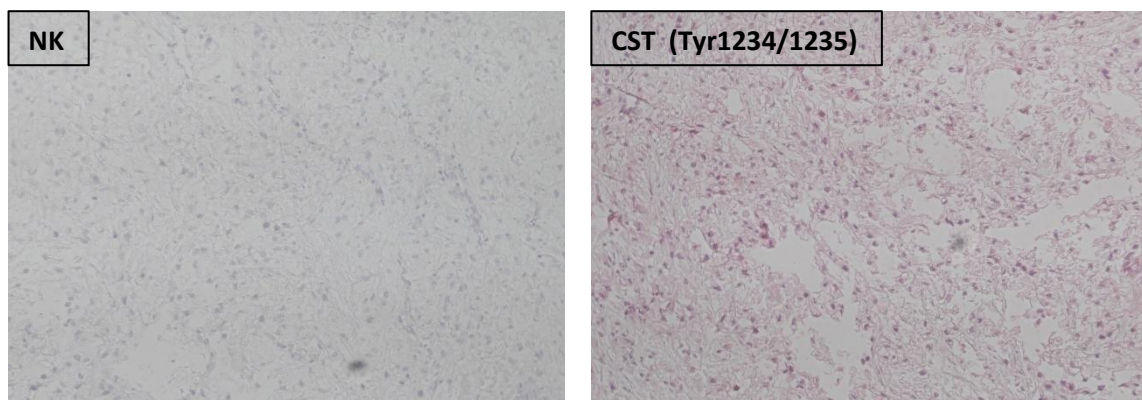


Abbildung 43: p-MET-Immunhistochemie vom klarzelligen NZK (FFPE) in 10-facher Vergrößerung. Verwendetes IHC-Protokoll: Tris-EDTA-Puffer, Demaskierungszeit 20 min, Blockierung 3% BSA in PBS Antikörperverdünnung 1:80 bei 1h Raumtemperatur, Antikörperdiluent 3% BSA in PBS, LSAB-Detektion. Links: Negativkontrolle (NK); Rechts: mit p-MET-Antikörper von Cell Signaling Technology (CST). Die Positivkontrolle zeigt über das gesamte Präparat verteilt eine unspezifische Färbung.

Das Ziel der weiteren Etablierung war der Erhalt einer Positivkontrolle, um feststellen zu können, ob der verwendete Antikörper, wie vom Hersteller angegeben, überhaupt in den FFPE-Schnitten funktioniert. Zunächst wurde Lebergewebe der Maus gefärbt, welches natürlicherweise eine hohe MET-Expression aufweist (mit freundlichem Dank an Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Linxweiler für die Bereitstellung der Präparate). Folgende Konditionen wurden getestet:

- Puffer: Tris-EDTA pH 9 und Citrat pH 6
- Demaskierungszeit: 20 min

- Permeabilisierung: PBS mit und ohne 0,2% Triton X
- Blockierung: 3% BSA in PBS mit und ohne 0,2% Triton X
- Antikörperverdünnung 1:100 in 3% BSA in PBS
- Antikörperinkubation: 1h bei Raumtemperatur
- Detektion: LSAB

Mit keiner der beschriebenen Konditionen konnte ein spezifisches Signal verzeichnet werden. Gleiches galt für die Färbung von menschlichem Lebergewebe, welches ebenfalls als Positivkontrolle getestet wurde:

- Puffer: Tris-EDTA pH 9 und Citrat pH 6
- Demaskierungszeit: 10, 15 und 20 min
- Blockierung: 3% BSA in PBS
- Antikörperverdünnung 1:100 in 3% BSA in PBS
- Antikörperinkubation: 1h bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C
- Detektion: LSAB

Die anschließenden Versuche wurden am papillären Nierenzellkarzinom durchgeführt, welches aufgrund seiner Überexpression positiv für p-MET sein sollte. Zunächst wurden folgende Konditionen getestet:

- Puffer: Citrat pH 6
- Demaskierungszeit: 10, 15 und 20 min
- Blockierung: 3% BSA in PBS
- Antikörperverdünnung 1:100 und 1:50 in 3% BSA in PBS
- Antikörperinkubation: über Nacht bei 4°C
- Detektion: LSAB

Zusätzlich erfolgte erstmalig eine Reduktion der Hämatoxylin-Gegenfärbung von 5 min auf 30s. Dies sollte verhindern, dass schwache spezifische Färbungen womöglich vom Hämatoxylin überdeckt werden. Letztendlich konnte aber bei keiner der beschriebenen Konditionen ein eindeutig spezifisches Signal verzeichnet werden (Abb.44).

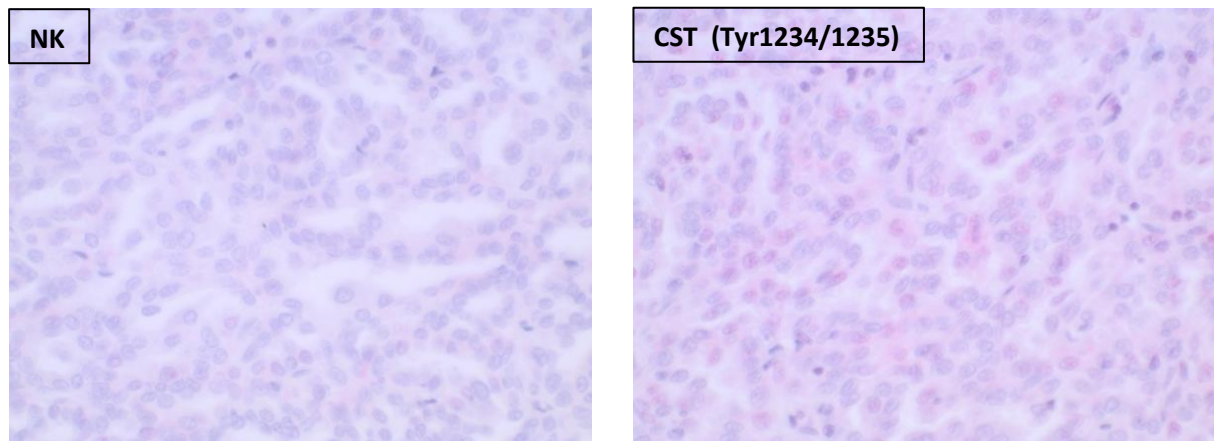


Abbildung 44: p-MET-Immunhistochemie vom papillären NZK (FFPE) in 40-facher Vergrößerung. Verwendetes IHC-Protokoll: Citratpuffer, Demaskierungszeit 20 min, Blockierung 3% BSA in PBS, Antikörperversdünung 1:50 über Nacht bei 4°C, Antikörperdiluente 3% BSA in PBS, LSAB-Detektion. Links: Negativkontrolle (NK); Rechts: mit p-MET-Antikörper von CST. Keine spezifische Färbung erkennbar.

Daraufhin wurde das Protokoll nochmals in einigen Aspekten geändert: Entparaffinierung der Schnitte bei 37°C über Nacht anstelle von 1h bei 60°C, Tris-EDTA-Puffer anstelle Citratpuffer, Blockierung mit 5% BSA statt 3% BSA und Verdünnung des Antikörpers in 1% BSA anstelle von 3% BSA (Abb. 45). Darüber hinaus beliefen sich die nächsten Überlegungen auf das Streptavidin/Alkalische Phosphatase Detektionssystem. Wir zogen eine mögliche Interaktion zwischen der Alkalischen Phosphatase und dem phosphorylierten Epitop in Betracht. Das ursprüngliche Detektionssystem wurde daraufhin durch das Dako REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB Rabbit/Mouse HRP ersetzt (Abb.45). Darüber hinaus kam im Folgenden ein 3%-iger Peroxidaseblock nach der Demaskierung für 10 min zum Einsatz. Dieser sollte die unspezifischen Färbungen durch die endogene Peroxidase im Nierengewebe reduzieren.

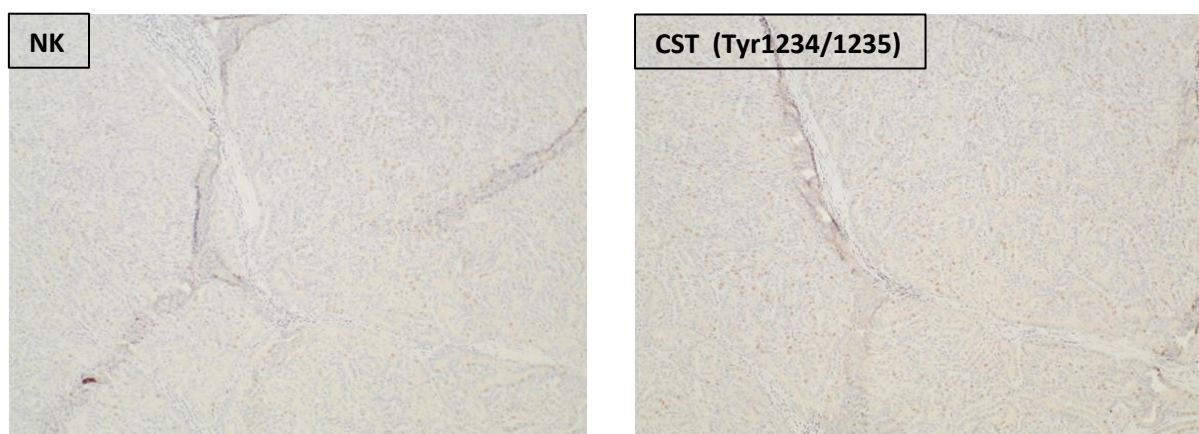


Abbildung 45: p-MET-Immunhistochemie vom papillären NZK (FFPE) in 5-facher Vergrößerung. Verwendetes IHC-Protokoll: Tris-EDTA-Puffer, Demaskierungszeit 20 min, Blockierung 3% Peroxidase, Antikörperversdünung 1:50 über Nacht bei 4°C, Antikörperdiluente 1% BSA in PBS, DAB-Detektion. Links: Negativkontrolle (NK); Rechts: mit p-MET-Antikörper von Cell Signaling Technology (CST). Keine Spezifität erkennbar.

Die eben genannten Komponenten wurden als nächstes jeweils unabhängig voneinander geändert. Es erfolgte der Vergleich zwischen:

- Entparaffinierung bei 37°C über Nacht und 60°C 1h
- Citratpuffer pH 6 und Tris-EDTA pH 9
- Blockierung mit 3% BSA und 5% BSA
- 3% und 1% BSA Antikörperdiluent

Dennoch ergab sich bei keiner der untersuchten Konditionen ein spezifisches Signal. Aufgrund der zahlreichen erfolglosen Protokolländerungen wurden als Nächstes frisch auf die Objektträger gezogene Schnitte gefärbt. Grundlage bildete hierfür die Überlegung, dass die Schnitte möglicherweise zu alt sind und das phosphorylierte Epitop nur auf frischen Schnitten stabil genug ist, um detektiert zu werden. Das Färbeergebnis änderte sich jedoch nicht. Im Laufe der weiteren Etablierung kam der zweite Anti-Met (c-Met) (phospho Y1349) antibody [EP2367Y] Antikörper von Abcam mit anderer Zielstruktur im Vergleich zum vorherigen Antikörper zum Einsatz (Tyr1349 anstelle von Tyr1234/1235). Doch auch hier zeigte sich mit keiner der getesteten Konditionen ein positives Ergebnis in den FFPE-Schnitten, sodass anschließend mit beiden p-MET Antikörpern sowohl Zellen der Reihe 786-O als auch KTCTL 26 nach Paraffineinbettung gefärbt wurden. Bei diesen Zellen ist dank Analyse mittels Westernblots bekannt, dass sie p-MET exprimieren und somit als Positivkontrolle fungieren können. Die Zellen durchliefen vor der Einbettung eine Behandlung mit Phosphatase-Inhibitoren zum Schutz der Phosphorylierung. Außerdem achtetet man auf eine niedrige Umgebungstemperatur. Die Bedingungen waren also genau kontrolliert. Es konnte erstmals ein starkes spezifisches Signal im Vergleich zur Negativkontrolle erzielt werden (Abb.46). Das zugrundeliegende Protokoll beinhaltete eine Antikörperverdünnung von 1:50 sowie die Verwendung eines Tris-EDTA-Puffers und DAB-Detektionssystems.

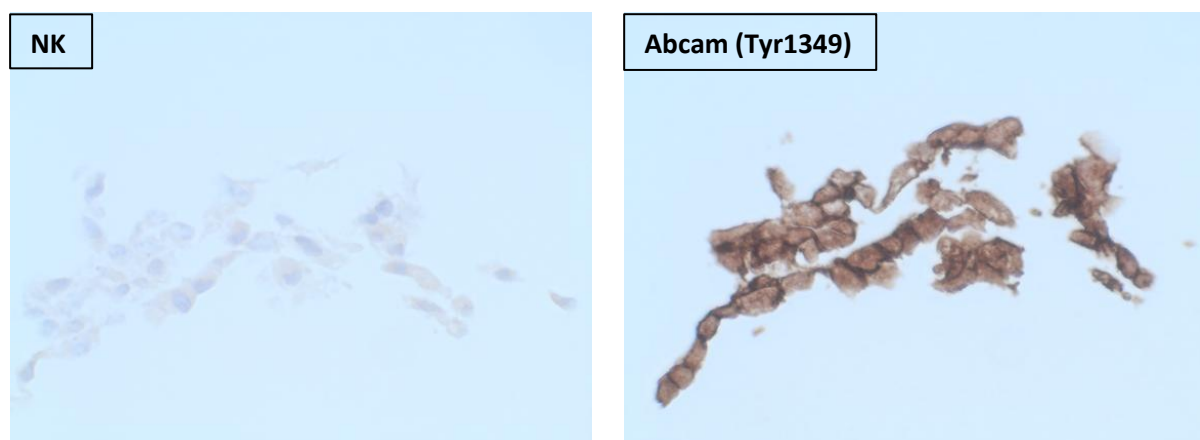


Abbildung 46: p-MET-Immunhistochemie von KTCTL26 Zellen in 40-facher Vergrößerung. Verwendetes IHC-Protokoll: Tris-EDTA-Puffer, Demaskierungszeit 20 min, Blockierung 3% Peroxidase, Antikörperverdünnung 1:50 über Nacht bei 4°C, Antikörperdiluent 1% BSA in PBS, DAB-Detektion. Links: Negativkontrolle (NK); Rechts: mit p-MET-Antikörper von Abcam. Spezifische Färbung erkennbar.

Mit der Vermutung, dass eventuell die Formalinfixierung der NZK-Gewebe die Phosphorylierung des MET-Rezeptors beeinträchtigt, wurden als Letztes kryokonservierte Gewebeschnitte zur Färbung herangezogen. Diese durchlaufen nicht die übliche Fixierung, sodass die Phosphorylierung des Rezeptors weniger beeinträchtigt wird. Zunächst wurden kryokonservierte Schnitte des papillären NZK als Positivkontrolle gefärbt, was mit beiden p-MET-Antikörpern gelang (Abb.47). In Zusammenschau mit den Zellen konnte gezeigt werden, dass der Antikörper generell funktioniert, jedoch nicht auf den FFPE-Gewebeproben.

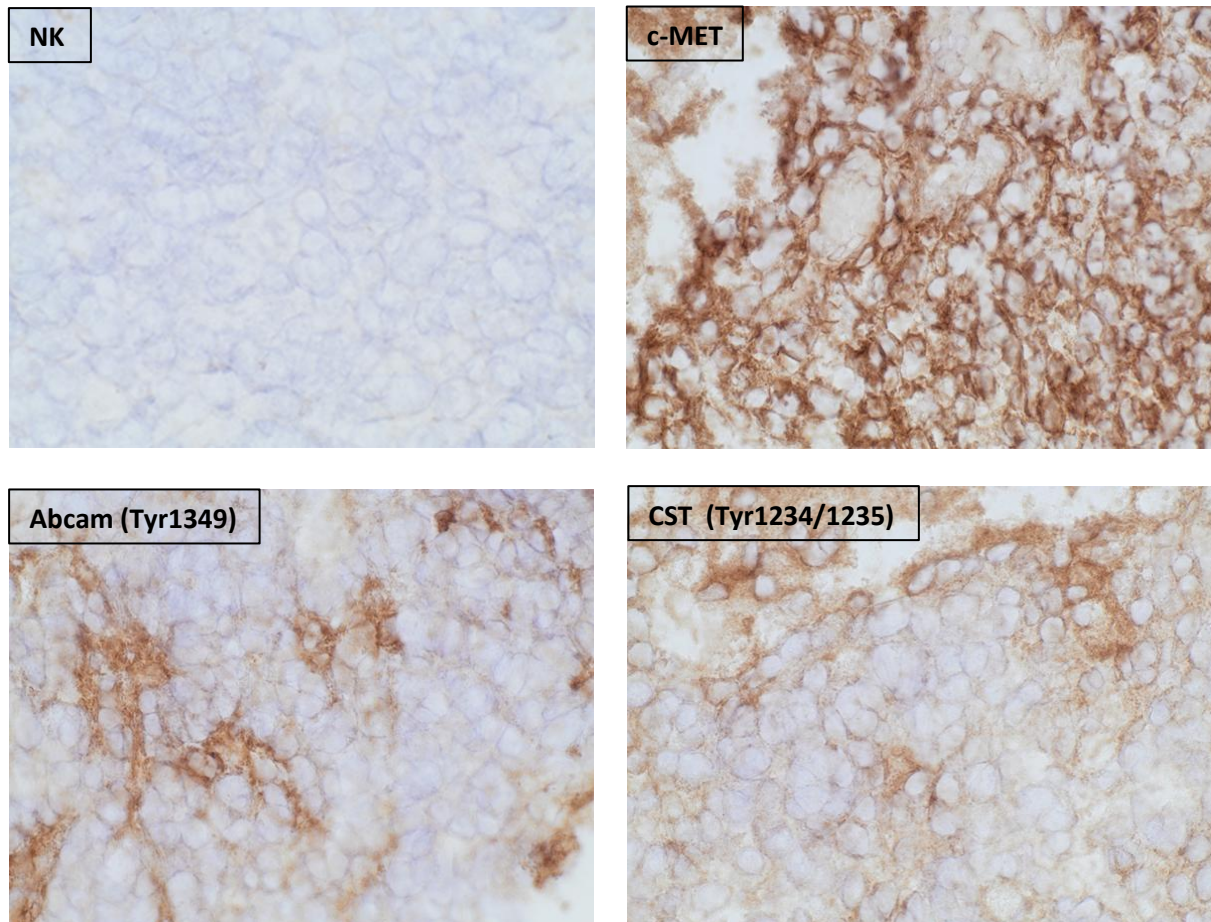


Abbildung 47: Immunhistochemische Färbung von kryokonserviertem papillären NZK-Gewebe in 60-facher Vergrößerung. Verwendetes IHC-Protokoll: Blockierung mit 3% H₂O₂ und 5% BSA in PBS, Antikörperverdünnung 1:50 über Nacht bei 4°C, DAB-Detektion. Oben links: NK; oben rechts: c-MET-Antikörper von Abcam; unten links: p-MET-Antikörper von Abcam; unten rechts: p-MET-Antikörper von Cell Signaling Technology (CST). Alle drei Antikörper zeigen spezifische Signale im papillären NZK, wobei die c-MET-Expression stärker als die p-MET-Expression ist.

6.7.2 Immunhistochemie der klarzelligen kryokonservierten Gewebe

Anschließend erfolgte die IHC von kryokonservierten klarzelligen NZK-Schnitten. Insgesamt wurden 10 Proben aus dem Patientenkollektiv gefärbt, von denen jeweils passend zu dem Paraffinblock auch ein kryokonservierter Gewebekblock vorhanden war. Beim Mikroskopieren konnte man allerdings bei 4 dieser Proben aufgrund von schlechter Gewebequalität keine weiteren Aussagen über die Färbung treffen. Die restlichen 6 Proben wiesen spezifische vorwiegend membranöse Färbungen mit den p-MET-Antikörpern auf. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen dem gesamten (c-MET) und phosphorylierten Status. Die c-MET-Expression war in allen Proben deutlich höher als die p-MET-Expression (Abb.48). Genauere Analyse waren jedoch nicht möglich, da einerseits nicht von jedem der 70 Patienten des Kollektivs auch ein kryokonservierter Gewebekblock vorhanden war, andererseits die Auswertung der kryokonservierten Schnitte durch die teils schlechte Qualität der Gewebemorphologie erschwert war.

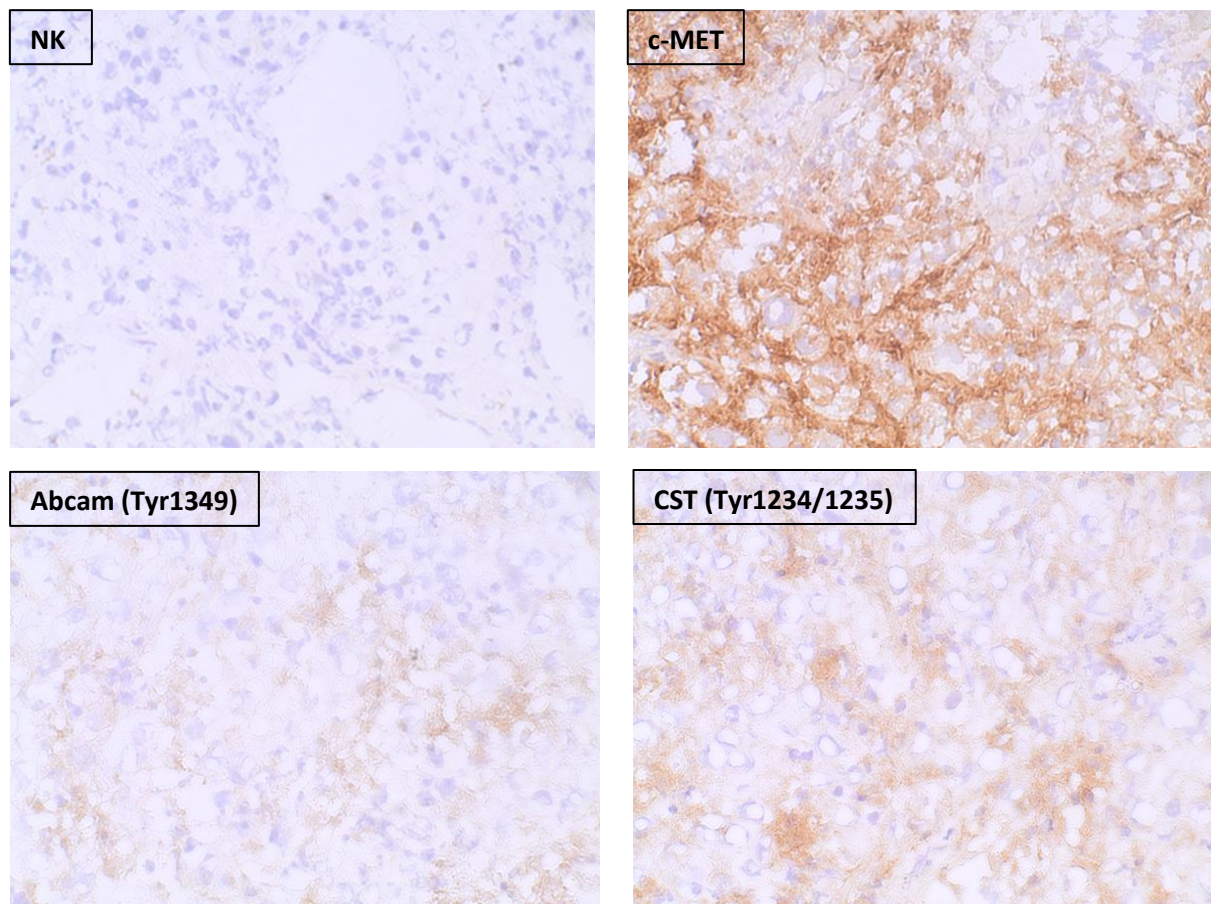


Abbildung 48: Immunhistochemische Färbung von kryokonserviertem klarzelligen NZK-Gewebe in 40-facher Vergrößerung. Verwendetes IHC-Protokoll: Blockierung mit 3% H₂O₂ und 5% BSA in PBS, Antikörperversdünnung 1:50 über Nacht bei 4°C, DAB-Detektion. Oben links: NK; oben rechts: c-MET-Antikörper von Abcam; unten links: p-MET-Antikörper von Abcam; unten rechts: p-MET-Antikörper von Cell Signaling Technology (CST). Alle drei Antikörper zeigen spezifische Signale im klarzelligen NZK, wobei die c-MET-Expression stärker als die p-MET-Expression ist.

7. Diskussion

Als häufigster Typ aller malignen Nierentumore nimmt das klarzellige Nierenzellkarzinom durch seine schlechte Prognose insbesondere im metastasierten Stadium und seine steigende Inzidenz eine immer bedeutendere Rolle in der Urologie ein [174] [144]. Im Falle einer fortgeschrittenen Erkrankung sollte laut den S3-Leitlinien eine Systemtherapie basierend auf Checkpoint- und Tyrosinkinaseinhibitoren erfolgen [85]. Daher ist die Erforschung dieser molekularen Angriffspunkte von großer Bedeutung. Der Rezeptortyrosinkinase c-MET, ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit, wurde in verschiedenen Tumorentitäten wie beispielsweise dem Mammakarzinom, kolorektalen Karzinom oder auch NSCLC eine prognostische Relevanz zugeschrieben [92] [93] [170]. Die Rolle von c-MET bezüglich der Prognose, aber auch der Interaktion mit anderen Proteinen ist im Nierenzellkarzinom nicht vollständig geklärt, wodurch sie Gegenstand der Forschung ist und somit auch als Grundlage dieser Arbeit dient. Die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der prognostischen Wertigkeit sind je nach untersuchtem Kollektiv zum Teil gegensätzlich. So können beispielsweise Kammerer-Jacquet et al. keine prognostische Relevanz des Rezeptors in einer Kohorte nach erfolgter Sunitinib-Therapie des klarzelligen NZK verzeichnen [67], Jung et al. bei Patienten ohne Systemtherapie hingegen schon [66]. Zusätzlich wurde in Anbetracht der Erstlinien-Kombinationstherapie von Cabozantinib (Multityrosinkinase-Inhibitor, welcher neben VEGFR2, RET, KIT, AXL und FLT3 auch MET hemmt [162]) und Nivolumab (CPI) das Augenmerk dieser Arbeit auf die Korrelation der beiden Targets dieser Kombinationstherapie MET und PD-L1 sowie deren prognostische Aussagekraft in Kombination gelegt. Nach unseren bisherigen Erkenntnissen wurde eine solche kombinierte Überlebensanalyse bisher nicht durchgeführt. Es konnte hingegen bereits in anderen Studien eine positive Korrelation der beiden Marker im metastasierten klarzelligen NZK beobachtet werden [67] [82]. Unser Kollektiv schließt jedoch sowohl metastasierte als auch nicht metastasierte Patienten mit ein. Als letzter Teil dieser Arbeit stand die Analyse von p-MET im Fokus, um Aussagen über die Aktivierung der RTK treffen zu können. In Untersuchungen von renalen Zelllinien hat sich bereits die Bestimmung der p-MET-Level mittels Immunblots etabliert (beispielsweise [119] [165]). Im Gegensatz dazu war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit die immunhistochemische Analyse dieses phosphorylierten Rezeptors in FFPE-Geweben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms unerforscht.

7.1 Patientencharakteristika

Das Patientenkollektiv dieser Arbeit zeigte ähnliche Charakteristika wie in der Literatur zu finden. Laut Robert-Koch-Institut beträgt das mittlere Erkrankungsalter des Nierenzellkarzinoms in Deutschland 68 (männlich) bzw. 71 (weiblich) Jahre [166]. In der untersuchten Kohorte ergab sich ein mittleres Erkrankungsalter von 64 Jahren, wobei auch hier die Frauen erst später erkrankten als die Männer (65 vs. 63,5 Jahre). Kleinere Abweichungen gegenüber den Daten des RKI sind in Anbetracht der vergleichsweise kleinen Patientenkohorte und der Beschränkung auf den klarzelligen Typ des Nierenzellkarzinoms erklärbar. Das mittlere Erkrankungsalter von 64 Jahren liegt unter dem weltweiten Durchschnitt von 75 Jahren, wobei die Daten diesbezüglich je nach geographischer Region deutlich variieren [19]. Die Geschlechterverteilung mit 46 männlichen und 24 weiblichen Patienten kann als repräsentativ für Deutschland angesehen werden. Im Bericht des RKI aus dem Jahre 2022 beträgt die Geschlechterverteilung etwa 2:1 [166]. Auch im weltweiten Vergleich ist dieses Verhältnis über die Zeit und in verschiedenen Ländern stabil zu beobachten [19].

Die pT-Einteilung des Patientenkollektivs ergab eine ähnliche prozentuale Verteilung über die ersten drei Stadien (24,3%; 30% und 35,7 %) und weicht damit von anderen Studienergebnissen ab. In einer großen multizentrischen Kohortenstudie zum Thema TNM-Klassifikation mit etwa 5300 analysierten Patienten zeigte sich bei 62,5 % der Fälle ein T1-Stadium, wohingegen insbesondere das T2- (11 %) und das T3-Stadium (22,5 %) deutlich seltener als in unserer Studie diagnostiziert wurden [112]. Diese merklichen Differenzen sind auf die gezielte Auswahl des eigenen Patientenkollektivs zurückzuführen, bei welcher auf eine möglichst homogene Verteilung geachtet wurde. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass in der Vergleichsstudie neben dem klarzelligen NZK (81%) auch weitere Typen betrachtet wurden [112]. Laut RKI liegt das 5-Jahres-Überleben insgesamt beim Nierenzellkarzinom in Deutschland bei 77% (Männer) bzw. 79% (Frauen), in unserem Kollektiv bei knapp 70% [166]. Getrennt für jedes T-Stadium wiesen unsere Patienten (pT1=94%, pT2=80%, pT3=42%, pT4=0%) ein ähnliches 5-Jahres-Überleben auf wie die Studie von Chang et al. (82,3%; 84,5%; 57,5% und 0%), welche eine Kohorte von über 300 Patienten mit NZK untersuchten [27]. Kleinere Differenzen sind durch die fehlende Beschränkung auf den klarzelligen Typ erklärbar [27]. Durch die sinkende Überlebensrate bei zunehmendem Tumorstadium kann unsere Kohorte in dieser Hinsicht als repräsentativ bezeichnet werden. Zudem erwiesen sich das pT3- und pT4- Stadium in der univariaten Analyse als signifikante Prognoseparameter für OS und MFS, pT4 konnte in der multivariablen Cox-Regression bezüglich des OS zusätzlich als unabhängiger Faktor identifiziert werden. Gleiches gilt auch für das MFS, wobei hier bei gleichzeitigem Einschluss der Variable c-MET-m (ROC) ebenfalls das pT3-Stadium signifikant

unabhängig war. Insgesamt wird die Tumorgröße bzw. -ausbreitung als anatomischer Prognosefaktor im Nierenzellkarzinom somit bestätigt [45].

Bezüglich des N- und M-Stadiums ist ein Vergleich zu anderen Arbeiten nur schwer möglich, da etwa 71% bzw. 64% unserer Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung diesbezüglich nicht eingeteilt werden konnten. Ein wichtiger Faktor ist hierbei die laut S3-Leitlinien nicht empfohlene systematische Lymphadenektomie, welche sich auch in unseren nur wenig aussagekräftigen Ergebnissen der Überlebensanalyse bezüglich des Nodalstatus widerspiegelt [85]. Darüber hinaus zeigt unser Kollektiv, wie zu erwarten, ein tendenziell kürzeres Überleben bei steigendem Grading und eine signifikante Risikosteigerung beim OS in der univariaten Analyse, allerdings erlauben die unzureichenden Daten keine genaueren Aussagen.

40% der Patienten wiesen eine synchrone Metastasierung (zum Zeitpunkt der Primärdiagnose oder innerhalb der ersten drei Monate) auf, was über dem durchschnittlich beobachteten Wert von etwa 15% liegt [41]. In der Studie von Dabestani et. al mit über 3000 Patienten ergab sich eine metachrone Metastasierungsrate von 20%, welche mit unserer Rate von 24,3 % in Einklang steht [38]. Jedoch ist auch hier bei beiden Studien einerseits die fehlende Beschränkung auf den klarzelligen Typ und andererseits die Patientenselektion in unserer Untersuchung zu berücksichtigen. Unsere Überlebensdaten bezüglich der Metastasierung verdeutlichen dessen prognostische Relevanz. Eine synchrone, früh metachrone (≤ 24 Monate) oder auch spät metachrone Metastasierung (> 24 Monate) bedeuten eine signifikant schlechtere Prognose für den Patienten. Zwischen der aggressiveren Metastasierung (synchron und früh metachron) und der weniger aggressiven Form (spät metachron) konnte allerdings entgegen unserer Erwartungen kein signifikanter Unterschied bezüglich des OS festgestellt werden, wobei die Aussagekraft dieser Analyse durch die lediglich eingeflossenen 6 metachron metastasierten Patienten eingeschränkt ist. Die Ergebnisse der univariaten und multivariablen Cox-Regression bestätigen eine Metastasierung zum OP-Zeitpunkt als unabhängigen Prognosefaktor.

7.2 Analyse der c-MET-Expression

7.2.1 Etablierung und Auswertung der c-MET-Expression

Der für die immunhistochemischen Färbungen verwendete Anti-Met (c-Met) antibody [SP44] - C-terminal von Abcam ist für Forschungszwecke in diversen Tumorentitäten bereits gut etabliert [24] [36] [52]. Die Angaben des Herstellers sowie die der Arbeiten mit identischem Antikörper dienten als Orientierungshilfe für die Etablierung [1]. Bezüglich der Auswertung der

c-MET-Expression sind in verschiedenen Arbeiten unterschiedliche Vorgehensweisen zu finden. In unseren Färbungen trat eine hohe Heterogenität in verschiedenen Tumorbereichen auf. Aus diesem Grund verwendeten wir den H-Score, welcher sowohl die Anzahl der positiven Zellen als auch die Intensität berücksichtigt. Awad et al., Cho et al. und Gymnopoulos et al. sind nur einige Beispielarbeiten zum Einsatz des H-Scores bei der c-MET-Auswertung in verschiedenen Tumoren [10] [31] [52]. Ein anderes Verfahren ist die alleinige Einteilung der Intensität in 0 (keine) – 3 (stark), welche jedoch aufgrund der geringen Differenzierung für unsere Analysen als unzureichend erschien [67] [84]. Die Bildung des Immunoreactive Scores (IRS), dem Produkt aus Intensität (0-3) und Quantität (0 = keine Expression, 1 < 10% positive Zellen, 2 = Positivität bei 10% bis 50%, 3 = Positivität bei 51% bis 80%, 4 = Positivität bei mehr als 80%) gilt als eine weitere Möglichkeit [94]. Somit sollte beim Vergleich mit anderen Arbeiten stets bedacht werden, dass die Ergebnisse auf unterschiedlichen Auswertungsmethoden beruhen können. Es sollte auch beachtet werden, ob die membranöse und zytoplasmatische Färbung (getrennt oder gemeinsam) berücksichtigt wurde, wie es beispielsweise bei Awad et al. und Kammerer-Jacquet et al. der Fall ist [10] [67]. Allerdings erfolgte hier keine Unterscheidung zwischen beiden Färbungen im Gegensatz zu unserer getrennten Analyse von membranöser und zytoplasmatischer Expression. Da c-MET eine membranständige Rezeptortyrosinkinase ist [169], stellt sich die Frage, wieso auch eine zytoplasmatische Expression in vielen Arbeiten inklusive unserer Untersuchungen vorliegt. Eine mögliche Erklärung besteht in der Internalisierung des Rezeptors nach dessen Aktivierung [63]. Die Bindung des Liganden bewirkt eine Polyubiquitinierung und damit verbundene Instabilität von c-MET, was letztendlich zum proteasomalen Abbau führt [63]. GRB2, eines der Downstream-Effektormoleküle, spielt eine entscheidende Rolle in der c-MET-Endozytose [89]. Teile des Rezeptors können sich also auch innerhalb der Zelle befinden, was für eine zytoplasmatische Färbung spricht.

Zur Erstellung von aussagekräftigen Überlebensanalysen war eine Gruppierung der c-MET-Expression notwendig. Gängig ist hierbei die ebenfalls in dieser Arbeit genutzte Einteilung der Expression in hoch/stark und niedrig/schwach. Oftmals wird eine Färbeintensität von 2 (moderat) oder 3 (stark) als hohe, von 0 (keine) oder 1 (schwach) als niedrige Expression definiert (beispielsweise [67] [75] [76]). Da wir jedoch aufgrund der heterogenen Expression in unseren Gewebeschnitten den H-Score bestimmten, war eine andere Gruppierung erforderlich. Die Verwendung des Medians als Trennwert für die Gruppierung der c-MET-Expression ist in der Literatur etabliert [37] [64] [99]. Diese Trennung erlaubt eine annähernd gleiche Gruppengröße, sofern keiner der Expressionswerte dem Trennwert entspricht und alle Patienten in die jeweilige Analyse miteinfließen. Nachteil ist allerdings, dass es sich hierbei womöglich nicht um den optimalen Trennwert handelt, wie unsere Überlebensanalysen zeigen. Die eingesetzte ROC-Analyse bestimmt eben diesen optimalen Wert, was jedoch eine

größere Varianz in der Gruppengröße nach sich zieht. Außerdem ist in jener Analyse die Trennschärfe des ermittelten Cut-offs für die Aussagekraft relevant, welche in unserem Fall für die membranöse Expression besser ausfiel. In dieser Arbeit waren die ROC-Trennwerte jeweils höher als der Median, was die statistische Signifikanz in der Überlebensanalyse erklären kann. ROC-Kurven kommen in der klinischen Onkologie zur Evaluation und zum Vergleich von Sensitivität und Spezifität diagnostischer Tests zum Einsatz [173]. Die ROC-Analyse kann aber auch zur Bestimmung von klinisch relevanten Cut-offs bei immunhistochemischen Färbungen eingesetzt werden [173], wie es bereits in anderen Arbeiten der Fall ist [88] [159]. Durch die fehlende Standardisierung von Cut-offs ergibt sich eine große Spannweite von eingesetzten Methoden, was wiederum die Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Arbeiten beeinträchtigt [173]. Dies macht die Interpretation und das Treffen einer Therapieentscheidung anhand dieser Resultate schwierig, da je nach eingesetzter Gruppierung auch die prognostische Relevanz variiert. Um in Zukunft auf dem Gebiet der Immunhistochemie validere Aussagen treffen zu können, ist eine höhere Standardisierung daher unumgänglich.

7.2.2 Assoziation von c-MET mit klinisch-histopathologischen Parametern

Die Rezeptortyrosinkinase c-MET ist bereits bei vielen verschiedenen Tumorentitäten in der Vergangenheit in den Fokus gerückt. Eine Assoziation von c-MET und Lymphgefäßinvasion, Lymphknotenmetastasierung, Tumordurchmesser und Tumorstadium wurden für das Magenkarzinom beschrieben [59] [111]. Hu et al. beobachteten eine signifikante Korrelation von c-MET mit Differenzierung, Lymphknotenmetastasierung und TNM-Stadium beim NSCLC [58]. Auch beim Mammakarzinom und Cholangio-Karzinom stellte man eine Assoziation mit histopathologischen Parametern fest [99] [170]. Mit Blick auf weitere urologische Tumore konnte eine Metaanalyse von Blasen-Karzinomen keinen Zusammenhang zwischen Grading bzw. Tumorstadium und c-MET-Expression feststellen [161], wohingegen Cheng et al. signifikante Ergebnisse beim Grading, Stadium und Tumorgröße beobachteten [30]. Beim Nierenzellkarzinom variieren die bisherigen Erkenntnisse ebenfalls.

In unseren Analysen konnte eine signifikante Assoziation zwischen membranöser c-MET-Expression und dem pT-Stadium identifiziert werden. Die fehlende Assoziation von pT1 bzw. pT2 gegenüber pT4 lässt sich vermutlich durch die geringe Patientenzahl (7) in diesem höchsten Stadium erklären. Darüber hinaus wurde eine signifikante Assoziation von membranöser c-MET-Expression mit synchroner und früh metachroner Metastasierung im Vergleich zu keiner Metastasierung festgestellt. Dies bestätigt die bisherigen Erkenntnisse, dass c-MET eine wichtige Rolle in der Tumorprogression bzw. Metastasierung spielt [147]

[151]. Es lässt sich daraus schließen, dass c-MET insbesondere in aggressiveren Tumoren, welche früh (innerhalb von 24 Monaten) metastasieren, hoch exprimiert ist. Da man bei einer spät metachronen bzw. keiner Metastasierung von einem weniger aggressiven Geschehen ausgehen kann, ist die fehlende Signifikanz beim Vergleich der c-MET-Expression dieser beiden Gruppen durchaus plausibel. Allerdings würde man auch signifikant höhere H-Scores bei synchroner und früh metachroner Metastasierung verglichen mit spät metachroner Metastasierung erwarten. Zwar lässt sich ein entsprechender Trend in den Diagrammen erkennen, jedoch könnte die geringe Patientenzahl der spät metachronen Gruppe (6 Patienten) die Analyse beeinflussen. Ebenfalls kritisch zu bewerten sind die Ergebnisse von c-MET-m und dem Nodalstatus sowie dem Grading, bei welchen nur etwa 30% bzw. 60% der Patienten aufgrund fehlender Daten in die Testungen einfließen. Gleiches gilt für die Assoziation von zytoplasmatischem c-MET mit dem Nodalstatus, welche aufgrund der zu geringen Patientenzahl vernachlässigt werden kann. Davon abgesehen zeigte diese Arbeit keine signifikante Assoziation der zytoplasmatischen Expression von c-MET mit den übrigen klinisch-histopathologischen Parametern. In der Literatur ist eine getrennte Analyse von c-MET-z und c-MET-m bisher nicht vorzufinden, meist wird lediglich die membranöse Expression betrachtet, seltener beide zusammen [66] [67]. Generell ist die Rezeptorinternalisierung ein komplexer physiologischer Vorgang mit hoher funktionaler Bedeutung [127], sodass seine effektive Erfassung mittels IHC ein Problem darstellen könnte.

In einer Arbeit mit über 500 untersuchten klarzelligen NZK zeigten sich zum Teil andere Ergebnisse als in unseren Analysen [94]. Dort ergab sich eine signifikante Assoziation zwischen c-MET-Expression und Grading sowie Fernmetastasierung [94]. Lymphknotenmetastasierung und pT-Stadium zeigten keine Signifikanz [94]. Die Unterschiede zur Vergleichsstudie können einerseits auf die deutlich höhere Fallzahl, andererseits auf die abweichende c-MET-Auswertung zurückgeführt werden. Macher-Goeppinger et. al. nutzten den IRS, bildeten anhand dessen drei Gruppen (negative, niedrige und hohe Expression) und verglichen diese mit histopathologischen Parametern [94]. Unsere Tests basierten hingegen auf dem fortlaufenden membranösen H-Score. Diese Herangehensweise könnte ein differenzierteres Verständnis der c-MET-Expression gegenüber der kategorialen Gruppierung liefern. Eine weitere Studie von Chen et al. zeigte Signifikanzen beim Grading und pT-Stadium, als Grundlage zur Analyse diente die Gruppierung mit Hilfe des IRS [29]. Kammerer-Jacquet et al. beobachteten eine signifikante Assoziation zwischen hoher c-MET-Expression und Grading, Lymphknotenstatus und sarkomatoider Komponente, welche bei uns nicht untersucht wurde [67]. Eine hohe Expression wurde hierbei als Färbeintensität von 2 oder 3 definiert [67]. Beide zuletzt genannten Studien waren im Patientenumfang ähnlich zu unserer (90 vs. 70 Patienten), allerdings kam in keiner der Arbeiten der fortlaufende H-Score zum Einsatz [29] [67]. Jung et al. untersuchten über 400 Patienten mit klarzelligem NZK auf c-MET-Expression,

bei welchen sie eine Korrelation zwischen hoher Expression und ungünstiger IMDC-Risikogruppe, hohem TNM-Stadium und hohem Grading feststellten [66]. Hierfür erfolgte eine Klassifikation in die beiden Gruppen geringe und hohe c-MET-Expression anhand des Cut-offs der Summe aus Färbeanteil und Intensität, welcher durch statistische Signifikanz in der Überlebensanalyse festgelegt wurde [66]. Viele weitere Arbeiten betrachten das Nierenzellkarzinom insgesamt und fokussieren sich nicht auf den klarzelligen Typ, was es beim Vergleich mit deren Ergebnissen zu beachten gilt. So weist das papilläre NZK als zweithäufigster Typ in seiner hereditären Form mehrheitlich Mutationen des MET-Gens auf [116]. Auch in der sporadische Form treten selten solche Mutationen auf [116]. Im Gegensatz dazu ist beim klarzelligen NZK das VHL-Gen am häufigsten betroffen [167], sodass sich je nach Typ unterschiedliche Einflüsse auf die c-MET-Expression und damit auch auf dessen klinische Relevanz ergeben. Gibney et. al identifizierten bei knapp 300 Patienten (70% davon klarzellig) ein signifikant höheres Grading und T-Stadium bei höherer c-MET-Expression, wobei in dieser Arbeit das bereits verlassene Fuhrman-Grading in die Testung einfluss [49]. Der automated quantitative analysis (AQUA)-Score (0-255) wurde anhand der durchschnittlichen Signalintensität der jeweils untersuchten Gewebekomponente bestimmt und zur Analyse verwendet [49]. Ähnlich zu unseren Testungen nutzten die Autoren den fortlaufenden Score zur nicht-parametrischen Testung [49]. In Zusammenschau lässt sich sagen, dass c-MET je nach Studie mit teils unterschiedlichen histopathologischen Parametern assoziiert ist und damit von Relevanz für Tumorentstehung bzw. -progression zu sein scheint. Allerdings ist von komplexen Mechanismen auszugehen, was die teils abweichenden Ergebnisse signalisieren. Bestätigt wird dies durch eine Metaanalyse von 12 in den Jahren 1997-2017 veröffentlichten Studien zum Thema Effekte von hoher c-MET-Expression im NZK, bei welcher insgesamt ein signifikant höheres Grading und pT-Stadium bei hoher verglichen mit niedriger c-MET-Expression verzeichnet werden konnte [70]. Durch die unterschiedlichen Auswertungen und Gruppierungen von c-MET sowie die unterschiedlich berücksichtigten NZK-Typen in den zahlreichen Studien ist jedoch ein exakter Vergleich der Ergebnisse schwierig.

7.2.3 Überlebensanalyse der c-MET-Expression

Neben den schon besprochenen Untersuchungen bezüglich der klinisch-histopathologischen Parameter wurde ebenfalls die prognostische Relevanz von c-MET in unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht. Zahlreiche Studien demonstrierten bereits die negative prognostische Relevanz von c-MET in Tumoren wie dem Cholangiokarzinom, Magen- und kolorektalen Karzinom, hepatozellulären Karzinom, Mammakarzinom, Pankreaskarzinom, Nasopharynxkarzinom oder dem NSCLC [71] [72] [90] [92] [93] [99] [111] [170]. Auch beim

Nierenzellkarzinom liegen diesbezüglich bereits Daten von Überlebensanalysen vor, welche jedoch je nach Studie variieren.

In dieser Arbeit konnte der zytoplasmatischen c-MET-Expression keine prognostische Bedeutsamkeit zugeschrieben werden. Das OS und MFS zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen niedriger und hoher Expression, unabhängig davon, ob nach Median oder ROC-Analyse gruppiert wurde. Da es sich bei c-MET, wie bereits zuvor erwähnt, um eine membranständige Rezeptortyrosinkinase handelt, kann die durch die Internalisierung verursachte zytoplasmatische Expression als nachrangig für unsere Analysen erachtet werden. Weil der Internalisierungsprozess vielen komplexen Faktoren und Mechanismen unterliegt, ist die membranöse Expression für unsere Analysen als verlässlicher anzusehen. Hier wies die c-MET-m^{stark} Gruppe ein tendenziell kürzeres (gruppiert nach Median) bzw. signifikant kürzeres (gruppiert nach ROC) OS und MFS auf. Die Steigerung der Signifikanz ist durch den erhöhten Trennwert bei der ROC-Analyse erklärbar. Die Verwendung dieser Analyse zur Gruppierung der c-MET-Expression lieferte eine präzisere und besser angepasste Klassifikation der Patienten, was den potentiellen Nutzen dieser Methode in zukünftigen prognostischen Studien hervorhebt. Die membranöse c-MET-Expression konnte insgesamt als negativer prognostischer Marker identifiziert werden. Auch in der univariaten Cox-Regression zeigte sich c-MET-m gruppiert nach ROC-Trennwert als signifikanter Faktor sowohl für das OS als auch MFS. In der multivariablen Analyse bestätigte sich die Unabhängigkeit dieses Markers für das metastasenfreie Überleben. Bezüglich des Gesamtüberlebens hatten Tumorstadium und Metastasierung hingegen einen größeren Einfluss, was wiederum die Komplexität der prognostischen Faktoren unterstreicht. Die alleinige Betrachtung von c-MET als Prognosefaktor ist unzureichend, vielmehr könnte eine zusätzliche Information über den c-MET-Status neben anderen Faktoren in die Therapieplanung miteinfließen. In Vergleichsarbeiten variieren die Ergebnisse der Überlebensanalyse von c-MET. Kammerer-Jacquet et al. verzeichneten keinen Unterschied bei Gesamt- und progressionsfreiem Überleben (PFS), wobei es sich hier um eine Kohorte nach Sunitinib-Therapie handelt [67]. Die multivariable Analyse von Chen et al. ergab ein signifikant kürzeres krankheitsspezifisches Überleben (CSS) bei hoher c-MET-Expression, welches aufgrund der wenigen bestätigten am Tumor verstorbenen Todesfälle in unserer Arbeit nicht berücksichtigt wurde [29]. Macher-Goeppinger et al. stellten in einem deutlich größeren Kollektiv (über 500 Patienten) in der univariaten Analyse eine Signifikanz beim CSS fest, welche jedoch in der Multiregressions-Analyse nicht bestehen blieb [94]. Im Vergleich dazu konnten Gibney et al. bei einer etwas kleineren Kohorte mit abweichender Gruppierung von c-MET auch nach multivariabler Analyse eine hohe Expression als negativen prognostischen Marker für ein kürzeres Überleben identifizieren [49]. Ähnliche Ergebnisse verzeichneten Jung et al., welche eine hohe c-MET-Expression als unabhängigen negativen

prognostischen Faktor beim klarzelligen NZK ausmachen konnten, jedoch wiederum eine andere Gruppierungsmethode einsetzten [66]. In der bereits erwähnten Metaanalyse von Kim et al. (siehe 7.2.2 Assoziation von c-MET mit klinisch-histopathologischen Parametern) zeigten Patienten mit hoher c-MET-Expression verteilt über alle Typen des NZK ein signifikant kürzeres OS [70]. Diese Signifikanz konnte aber bei der alleinigen Betrachtung des klarzelligen NZK nicht bestätigt werden [70]. Zu beachten ist jedoch, dass lediglich 3 Studien, welche sich auf diesen NZK-Typ beschränkten, in die Analyse miteinfließen. Insgesamt lässt sich also sagen, dass c-MET neben vielen anderen Tumorentitäten auch, wie von uns bestätigt, im Nierenzellkarzinom von prognostischer Relevanz ist. Allerdings gilt es weiterhin, die fehlende Standardisierung in der Durchführung, Auswertung und Gruppierung der immunhistochemischen c-MET-Expression beim Vergleich der Ergebnisse zu berücksichtigen. Die Einführung eines allgemein anerkannten Bewertungssystems würde die Reproduzierbarkeit dieser Studien verbessern und eindeutigere Schlussfolgerungen zum prognostischen Wert von c-MET ermöglichen. Darüber hinaus sind Studien ausschließlich zum klarzelligen Nierenzellkarzinom deutlich seltener vorzufinden, oftmals werden alle Typen dieser Tumorerkrankung miteingeschlossen, was wiederum die Resultate beeinflusst.

7.3 Korrelations- und Überlebensanalyse der c-MET- und PD-L1-Expression

Checkpoint-Inhibitoren, welche den PD-1/PD-L1-Signalweg beeinflussen sowie Tyrosinkinase-Inhibitoren gegen den Rezeptor c-MET werden zunehmend in die Therapie des NZK integriert [85], weshalb die Abhängigkeit dieser beiden Marker und deren mögliche gemeinsame Signalwege von entscheidender Bedeutung sind. In dieser Arbeit wurde zunächst eine Korrelationsanalyse der beiden Marker anhand des H-Scores durchgeführt. Bei den PD-L1-Daten, welche vom Doktoranden Kévin Junk der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes stammten, fielen die deutlich niedrigeren H-Scores im Gegensatz zu c-MET auf. Etwa zwei Drittel der Tumorpräparate wiesen eine PD-L1-Negativität oder einen minimalen H-Score von 1 auf, der Höchstwert betrug bei einem einzigen Patienten 100. In Ergänzung dazu gab es in unserer Kohorte keine c-MET-m-Negativität und nur einen c-MET-z negativen Patienten bei ebenso deutlich höheren Maximalwerten von 270 bzw. 220. In unserem Kollektiv wiesen die Primärtumoren daher insgesamt eine deutlich höhere c-MET- als PD-L1-Expression auf. In einer Arbeit zum klarzelligen NZK von Lalani et al. konnte eine ähnlich geringe Expression mit 29% PD-L1 positiven Primärtumoren bei ebenfalls höherer c-MET-Expression beobachtet werden [82]. Diese Diskrepanz der beiden Expressionen verdeutlicht die vielfältigen und auch sich unterscheidenden Regulationsmechanismen der beiden Marker, welche insbesondere im Fall von PD-L1 sowohl genomische Veränderungen, transkriptionelle und posttranskriptionelle als

auch posttranslationale Modifikationen umfassen [26]. Der Spearman-Koeffizient zeigte eine signifikante mäßig stark ausgeprägte Korrelation von c-MET-m und PD-L1, was durch tendenziell höhere PD-L1-Werte bei stärkerer c-MET-m-Expression deutlich wurde. Demgegenüber ergab sich keine Signifikanz für c-MET-z. Diese Ergebnisse sprechen für eine bereits in der Literatur beschriebene Signalweginteraktion der beiden Marker, wobei unsere Analysen nur die membranöse Expressionsform als relevant identifizieren. Während Shin et al. im unselektierten klarzelligen NZK als Erstes eine Assoziation von c-MET- und PD-L1-Expression beobachteten [126], konnten Balan et al. erstmalig im Nierenzellkarzinom eine HGF/c-MET-induzierte Hochregulation von PD-L1 nachweisen [13]. Eine Schlüsselrolle spielt der Ras-Signalweg, welcher die Überexpression des zytoprotektiven und anti-apoptotischen Moleküls HO-1 bewirkt und im Folgenden die PD-L1-Expression stimuliert [13]. Kammerer-Jacquet et al. beschrieben ebenfalls eine signifikante Assoziation von hoher c-MET- und PD-L1-Überexpression bei Patienten mit metastasiertem klarzelligen NZK nach Sunitinib-Erstlinientherapie [67]. Lalani et al. wiesen sowohl in klarzelligen Primärtumoren als auch Metastasen eine höhere c-MET-Expression in PD-L1 positiven Schnitten nach [82]. Auch in anderen Tumorentitäten wie dem Magenkarzinom, hepatozellulären Karzinom, Pankreaskarzinom und malignem Melanom wurde eine signifikante positive Assoziation von c-MET und PD-L1 Expression beschrieben [86] [132] [160] [163]. Je nach Tumorart variieren die Erkenntnisse jedoch auch, was die Vielschichtigkeit der molekularen Interaktionen verdeutlicht. So beobachteten Domènech et al. eine Korrelation von MET-Amplifikation und PD-L1 im NSCLC [40], wohingegen Ilić et al. keine Korrelation zwischen c-MET und PD-L1 Expression im NSCLC verzeichneten [61]. Abgesehen von dem bereits beschriebenen Ras-Signalweg, welcher neben dem NZK auch im Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) als mitverantwortlich erkannt wurde, wurden auch Akt-abhängige Signalwege und der MAPK/NF- κ Bp65 Signalweg als Mechanismus der c-MET verursachten Hochregulation der PD-L1 Expression identifiziert [18] [160] [163]. Die molekularen Mechanismen sind aber weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung. In unserer Arbeit konnte zwar eine Korrelation zwischen den beiden Targets nachgewiesen werden, allerdings bleibt die Kausalität, insbesondere auch die genaue Signalweginteraktion, unbekannt.

Die untersuchte Korrelation erlaubt darüber hinaus keine Aussagen über die klinische Relevanz der Resultate. Um den prognostischen Wert der c-MET- und PD-L1-Expression genauer zu analysieren, wurden daher Kaplan-Meier-Kurven für die Kombination beider Marker erstellt. Dabei wurde die bisherige Gruppierung von c-MET nach Median und ROC-Analyse beibehalten. Da das Patientenkollektiv in mehr als der Hälfte der Fälle PD-L1 negativ war, ergab sich für uns die unter Material und Methodik beschriebene Gruppierung. Hierbei ist anzumerken, dass diese aufgrund der hohen Variabilität in der Literatur von vielen Arbeiten abweicht. Durch die schwache Expression in den Gewebsschnitten waren die häufig

eingesetzten Schwellenwerte für unsere Auswertung nicht sinnvoll. So definierten Taube et al. und viele weitere Studien die PD-L1-Positivität als membranöse Expression bei $\geq 5\%$ der Zellen, ebenfalls häufig angewandte Cutoff-Wert sind 1% oder 10% [137] [152]. Bei einer weiteren Arbeit zum klarzelligen NZK kam ein Trennwert von 0% zum Einsatz, was wiederum am ehesten mit unserem Trennwert (H-Score=0) vergleichbar ist [82]. Während unsere Testungen keinen signifikanten Einfluss des zytoplasmatischen c-MET/PD-L1-Status auf das OS ergaben, konnte für das MFS nach Erhöhung des Cut-offs (ROC-Trennwert anstelle von Median) eine Signifikanz verzeichnet werden. Die PD-L1-Positivität bei gleichzeitig starker c-MET-z-Expression konnten als negative prognostische Marker bezüglich der Metastasierung identifiziert werden. Die Univariate Regression erbrachte allerdings keine Signifikanzen bei jeglicher Kombination von PD-L1 mit c-MET-z. Des Weiteren wurden insbesondere beim metastasenfreien Überleben je nach Gruppe nur wenige Patienten berücksichtigt, sodass eine genaue Interpretation dieser Ergebnisse schwierig ist. Unsere Analysen können die kombinierte Bestimmung dieser beiden Marker zur Prognoseeinschätzung nicht empfehlen. Bezüglich c-MET-m und PD-L1 zeigten OS und MFS signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kombinationen. Interessanterweise konnte auch hier erst nach ROC-Gruppierung von c-MET-m ein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben verzeichnet werden. Erklärbar ist dies wie bereits zuvor bei c-MET-z durch den deutlich höheren Trennwert von 107,5 verglichen mit dem Median von 82,5. Daraus lässt sich schließen, dass c-MET-m erst bei höherem Expressionslevel jenseits eines H-Scores von 100 einen relevanten Einfluss auf das Überleben hat, was sich bereits in der Einzel-Überlebensanalyse von c-MET-m andeutete. Anders verhielt es sich beim MFS, wo im Fall von beiden Gruppierungen eine statistische Signifikanz vorlag, welche aber durch Einsatz des höheren ROC-Trennwertes gesteigert werden konnte. Beim paarweisen Vergleich wiesen alle übrigen Gruppen gegenüber Patienten mit schwacher c-MET-m- und negativer PD-L1-Expression ein signifikant kürzeres metastasenfreies Überleben auf, wohingegen sie beim Vergleich untereinander keine Signifikanzen zeigten. Es lässt sich daher anhand dieser Analyse nicht sagen, ob c-MET-m oder PD-L1 den größeren Einfluss auf das metastasenfreie Überleben hat, jedoch wird unser Ergebnis aus der zuvor durchgeführten Einzelanalyse von c-MET-m als negativer prognostischer Faktor bestätigt. Sowohl c-MET-m als auch PD-L1 scheinen einen Einfluss auf das MFS zu haben, da deren gemeinsame Expression gegenüber der alleinigen Expression das Risiko tendenziell steigert. Die univariate Regression identifizierte den c-MET-m (ROC)/PD-L1-Status als signifikante Variable für das MFS. In der multivariablen Analyse wiesen die Gruppen c-MET-m^{stark}/PD-L1+ und c-MET-m^{schwach}/PD-L1+ eine unabhängige Risikosteigerung auf, was auf einen größeren prognostischen Einfluss von PD-L1 hinweist, welcher jedoch durch eine starke c-MET-Expression gesteigert wird. Allerdings sind die Resultate der Cox-Regression aufgrund der wenigen Ereignisse nur unter Vorbehalt zu

interpretieren. Dennoch lässt sich daraus schließen, dass beide Faktoren insbesondere in der Metastasierung eine Rolle spielen und die Adressierung beider Targets im fortgeschrittenen Stadium durchaus als sinnvoll zu erachten ist, wobei eine alleinige Fokussierung auf diese beiden Marker unzureichend wäre. Welches der beiden Proteine letztendlich die höhere prognostische Relevanz hat, lässt sich aus unseren Analysen nicht definitiv sagen. In diversen Tumorentitäten wird die kombinierte Blockierung beider Targets bereits untersucht. Yang et al. verzeichneten bei Zellen des Magenkarzinoms bei c-MET-Blockade eine gesteigerte T-Killerzell-Aktivität, wodurch die Effektivität eines PD1-Antikörpers erhöht wurde [163]. Auch beim Pankreaskarzinom zeigten sich signifikante Vorteile bei der Kombination von MET-Inhibition und Checkpointblockade [86]. Wie sinnvoll eine Kombinationstherapie ist, signalisieren auch die Erkenntnisse von Sun et al. im NSCLC [134] und Li et al. im HCC [87]. Die Inhibition von c-MET reduzierte die Phosphorylierung von GSK3 β , was zu einer Stabilisierung von PD-L1 führte, sodass die Tumorzellen dem Immunsystem besser entkommen können [87] [134]. Eine zusätzliche Gabe von Checkpoint-Inhibitoren könnte jenen Mechanismus eindämmen. Diese bisherigen Erkenntnisse über den Vorteil der Kombinationstherapie werden durch unsere Ergebnisse in der Überlebensanalyse unterstützt. Natürlich gilt es bei jeglicher Interpretation, wie bereits zuvor angesprochen, die geringe Patientenzahl in unserer Arbeit zu berücksichtigen. Es konnten je nach Status teils nur wenige Patienten analysiert werden, weshalb die Untersuchung einer größeren Kohorte die Aussagekraft verstärken würde. Darüber hinaus könnte eine immunhistochemische Analyse des gleichen Patientenkollektivs mit einem CD8+ Antikörper weitere Erkenntnisse liefern. Es handelt sich um einen Marker von aktivierten T-Zellen, welche als wichtiger Bestandteil der Tumorumgebung gelten [140]. Eine langanhaltende Antigenstimulation, wie sie bei Krebserkrankungen auftritt, verursacht eine T-Zell-Erschöpfung [7]. Diese ist unter anderem durch die Hochregulation von PD-1 gekennzeichnet, was wiederum den Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren begründet [7]. Somit ist eine immunologische Charakterisierung der Tumorumgebung durchaus für die Therapie relevant.

7.4 Analyse der p-MET-Expression

7.4.1 Etablierung der p-MET-Expression

Um die prognostische Wertigkeit von MET genauer zu untersuchen, war es von Interesse, inwiefern die Rezeptortyrosinkinase im untersuchten Gewebe überhaupt in ihrer aktivierten Form (=p-MET) vorliegt. Wenn dies der Fall ist, werden letztendlich Downstream-Signalwege wie Ras/Raf/MAPK oder PI3K/AKT/mTOR aktiviert und der Rezeptor kann seine zahlreichen Wirkungen entfalten [83]. Bei der Betrachtung von c-MET allgemein ist eine Aussage über

dessen Aktivität hingegen nicht möglich. Im Laufe der Etablierung wurden zwei verschiedene Antikörper für p-MET verwendet.

Der Phospho-Met (Tyr1234/1235) (D26) XP Rabbit mAb von Cell Signaling Technology ist laut Angaben des Herstellers für immunhistochemische Färbungen von formalin-fixierten paraffin-eingebetteten Schnitten geeignet, eine Antikörperversdünnung von 1:320 wird empfohlen und ist damit deutlich höher als sie in unserer Etablierung angewandt wurde (bis 1:50) [25]. In einem vom Hersteller vorgeschlagenen IHC-Protokoll kommen, wie in unserem Protokoll, ein EDTA-Puffer, 3%iges H_2O_2 zur Blockierung und ein DAB-Detektionssystem zum Einsatz [25]. Andere Protokolle sind jedoch auch möglich, wie die Studie von Wu et al. zeigt, in welcher Gewebeschnitte von Magenkarzinomen in Citratpuffer behandelt, sowie mit BSA blockiert und mit dem oben genannten Antikörper nach der Streptavidin-Biotin-Methode detektiert wurden [156]. Nach Informationen des Herstellers ist der Antikörper sowohl zur Anwendung an menschlichem als auch an Maus-Gewebe geeignet, sodass die Färbung von Präparaten der Maus in unseren Etablierungsversuchen als mögliche Fehlerquelle auszuschließen war [25]. Eine erfolgreiche immunhistochemische Untersuchung von Maus-Gehirnen kann dies bestätigen [171]. In jener Arbeit kamen FFPE-Schnitte zum Einsatz, welche zunächst einen Konzentrationsgradienten von Xylol und Ethanol durchliefen und anschließend durch 20-minütiges Erhitzen mittels Mikrowelle in Citratpuffer pH 6 dem Antigen-Retrieval unterzogen wurden [171]. Es folgte eine Blockierung mit 3%-igem H_2O_2 und 10%-igem fetal bovine serum (FBS) bevor die Schnitte in einer Verdünnung von 1:200 bei 4°C über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert wurden [171]. Zum Schluss erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, immundetektiert wurde mittels DAB-Lösung und gegengefärbt mit Hämatoxylin [171]. Der einzige Unterschied zu unseren Etablierungsversuchen ist in diesem Fall die zusätzliche Anwendung von 10%-igem FBS zur Blockierung [171]. Als ausschlaggebender Aspekt kann dies aber wohl vernachlässigt werden, da unter anderem in der erst genannten Arbeit von Wu et. al eine alleinige Blockierung mit BSA für eine erfolgreiche Färbung ausreichend war [156]. In beiden Vergleichsarbeiten konnten mittels der jeweiligen Protokolle spezifische p-MET Färbungen generiert werden. Es waren keine wesentlichen Unterschiede der Durchführung im Vergleich zu unseren Protokollen zu identifizieren, weshalb die Fehlerquelle mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht in der IHC-Methodik liegt.

Im Folgenden wurde ein zweiter Antikörper getestet, welcher einen anderen Ansatzpunkt aufweist. Bei der Aktivierung von c-MET durch HGF kommt es letztendlich unter anderem zur Autophosphorylierung von Y1234,1235 und 1349 [169]. Während der zuerst angewandte Antikörper an die ersten beiden Tyrosinreste bindet, ist Y1349 das Target des zweiten Antikörpers. Mit der Hypothese, dass möglicherweise bisher nicht das optimale Epitop adressiert wurde, folgten weitere Etablierungsversuche. Der Anti-Met (c-Met) (phospho

Y1349) antibody [EP2367Y] von Abcam ist laut Herstellerinformation für immunhistochemische Färbungen von FFPE-Geweben geeignet [2]. Eine Antikörperverschüttung von 1:50 bis 1:100, welche in unserem IHC-Protokoll so berücksichtigt wurde, wird empfohlen [2]. Des Weiteren wird zur Benutzung eines Tris/EDTA-Puffers mit pH 9 angeraten, welchen wir ebenfalls verwendeten [2]. In einer Arbeit von Sjöström et al. kam der Antikörper zur immunhistochemischen Färbung von FFPE-Mammakarzinom-Tumoren zum Einsatz [129]. Im Gegensatz zu unseren Färbungen wurden hier Tissue Microarrays genutzt. Beim Vergleich unseres Protokolls mit dem der anderen Arbeit ergeben sich folgende kleine Unterschiede: Anstatt über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank erfolgte die Entparaffinierung in der Vergleichsarbeit bei 60°C für zwei Stunden, nach dem Antigen-Retrieval wurden die TMA-Schnitte mit 3%iger H₂O₂-Lösung und zusätzlich einer serumfreien Proteinblockierung inkubiert [129]. Die übrigen Schritte, Retrieval mit EDTA-Puffer pH 9, Inkubation mit Primärantikörper bei 4°C über Nacht 1:50, Detektion mit DAB und Gegenfärbung mit Hämatoxylin waren mit unseren vergleichbar [129]. Sjöström et al. generierte spezifische p-MET-Färbungen in deren Gewebeschnitten, sodass erneut ein Problem in unserem Protokoll ausgeschlossen werden konnte.

In der kürzlich erschienen Arbeit von Akioka et al., welche erstmals den p-MET-Status in FFPE-Geweben des Nierenzellkarzinoms mittels Immunhistochemie analysierten, kam ein weiterer Antikörper (c-MET Y1235 phosphorylated von Immuno-Biological Laboratories (Gunma, Japan)) erfolgreich zum Einsatz [5]. Abgesehen von einer verstärkten Blockierung mit 3%igem H₂O₂ sowie 3%igem BSA und 5%igem Ziegsenserum gab es keine Abweichungen zu unseren Protokollen [5]. Daher könnte in Folgearbeiten die Eignung dieses Antikörpers zur Detektion der p-MET-Expression in klarzelligen FFPE-Geweben überprüft werden.

7.4.2 Probleme der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine weit verbreitete Technik zur Analyse der Proteinexpression in Gewebeschnitten, jedoch können verschiedene technische Hürden die Verlässlichkeit der Ergebnisse beeinträchtigen. Im Zuge der Fehlersuche war es daher unabdingbar, verschiedene Aspekte der IHC zu beleuchten. Der Erfolg immunhistochemischer Färbungen wird durch vielerlei Faktoren beeinflusst. Zunächst muss ein geeigneter Antikörper ausgewählt werden, welcher für die Untersuchungsmethode, in diesem Fall die Immunhistochemie von FFPE-Geweben, geeignet ist [51]. Außerdem sollte eine Spezifität für die zu untersuchende Spezies und auch das Epitop bestehen. Bei unseren Antikörpern konnten wir uns diesbezüglich anhand des Datasheets vom jeweiligen Hersteller versichern. Einen weiteren kritischen Punkt stellen Probleme des Färbesignals dar. Falsch-positive Signale sind eine

häufige Herausforderung [51]. In unserer Arbeit konnte dies durch ein unspezifisches Hintergrundsignal von endogener Peroxidase oder endogenem Biotin verursacht sein [51]. Dies wiederum verhinderten wir durch Verwendung eines Peroxidase- bzw. Biotinblocks im Anschluss an das Antigen-Retrieval. Ein weiterer Faktor sind zu hohe Antikörperkonzentrationen, welche insbesondere im Kern ein falsch-positives Signal hervorrufen können [51]. Mit der von uns zumeist eingesetzten Verdünnung von 1:50 verwendeten wir zwar hohe Konzentrationen, im Verlauf der Etablierung wurden aber auch deutlich höhere Verdünnungen bis 1:350 getestet. Darüber hinaus kam diese Konzentration von 1:50 in den Untersuchungen von Sjöström et al. erfolgreich zum Einsatz [129]. Abgesehen von falsch-positiven Signalen können natürlich auch falsch-negative Ergebnisse auftreten. Häufig liegt dies an schlechter Gewebefixierung, einem zu verdünnten Antikörper oder einer unpassenden Antigen-Retrieval-Methode [51]. Die beiden letzten Punkte können bei unseren Untersuchungen ausgeschlossen werden, da die zuvor erwähnte Konzentration von 1:50 als hoch zu werten ist und die Antigen-Retrieval-Methode mit Erhitzung des Puffers in der Mikrowelle und Inkubation der Schnitte im Wasserkocher bei den erwähnten Vergleichsarbeiten bereits etabliert ist. Darüber hinaus kamen beide von uns verwendeten Puffer (Citratpuffer pH 6 und EDTA-Puffer pH 9) in der Literatur bereits erfolgreich bei der p-MET-Färbung zum Einsatz [129] [171]. Die Gewebefixierung könnte hingegen ein ausschlaggebender Punkt bei unserer p-MET-Etablierung sein. Werner et al. beschreiben einerseits das Problem der Verzögerung der Fixierung, diese sollte spätestens 30 min nach chirurgischer Entfernung gestartet werden, andererseits Schwankungen in der Dauer der Fixierung, welche bis zur Überfixierung führen können [154]. Bezüglich der Gewebeaufbereitung ist eine unzureichende Dehydrierung des Gewebes vor der Paraffineinbettung ebenfalls problematisch [154]. Da unsere untersuchten Gewebeschnitte vom Institut für allgemeine und spezielle Pathologie in Homburg fixiert und eingebettet wurden, haben wir keine Informationen über die genauen Gegebenheiten und Umstände jedes einzelnen Präparates, sodass eine Beurteilung schwierig ist. Bekannt ist jedoch der nachteilige Einfluss der Formalinfixierung auf die Reaktivität zellulärer Proteine und somit auch auf die Antikörperbindung, was unbedingt ein Antigen-Retrieval nötig macht [117]. In unserem Fall ist eine suboptimale Fixierung als Problem der p-MET-Färbung am naheliegendsten, da die Fehlerquelle im IHC-Protokoll durch den Vergleich mit anderen Arbeiten nahezu ausgeschlossen werden kann. Dies wird durch die erfolgreiche Färbung der Zellen weiter untermauert, welche unter streng kontrollierten Bedingungen in der Zellkultur behandelt wurden. Das phosphorylierte Protein p-MET könnte womöglich instabiler sein als dessen nicht phosphoryliertes Korrelat c-MET, wodurch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Fixierung in Erwägung gezogen werden muss. Für andere phosphorylierte Marker wurden diesbezüglich schon Untersuchungen durchgeführt. Im Fall von p-Akt im Kolonkarzinomen konnte eine

starke Färbeintensität in Biopsien bei fehlender Färbung in den entsprechenden Operationspräparaten verzeichnet werden [12]. Eine mögliche Erklärung besteht in der schnellen Fixierung von Biopsien, wohingegen OP-Präparate unter Umständen über längere Zeit von der Blutversorgung getrennt sind, bevor eine Entfernung und Fixierung erfolgen kann [12]. Dadurch bleibt mehr Zeit für die Dephosphorylierung, weshalb bei diesen Präparaten von einer geringeren Aussagekraft bezüglich des phosphorylierten Markers ausgegangen werden kann [12]. Auch Theiss et al. verdeutlichen die Wichtigkeit von kontrollierten Bedingungen bei der postoperativen kalten Ischämie sowie Fixierung der Gewebe, da Standardprotokolle die Konservierung der labilen phosphorylierten Proteine stark beeinträchtigen können [139]. Durch die Verwendung von kryokonservierten Schnitten versuchten wir diesen Aspekt zu umgehen. In einer Studie zum Vergleich der IHC von kryokonservierten und Paraffingeweben konnte bei ersterem Verfahren eine höhere Färbeerfolgsrate verzeichnet werden, was auf einen geringeren Verlust der Antigenität und Epitopmaskierung zurückzuführen ist [55]. Diese Vorteile gehen allerdings mit einer schlechteren Gewebemorphologie und damit verbundener erschwerter Auswertung einher, was wir bestätigen konnten [55]. Alternativ können zur Detektion von (phosphorylierten) Proteinen auch Methoden wie das Immunoblotting oder die Massenspektrometrie eingesetzt werden, was jedoch mit einem technischen Mehraufwand einhergeht und eine zellspezifische Analyse wie am histologischen Schnitt ausschließt [100] [143] [165].

7.4.3 Auswertung der p-MET-Expression

Da die ursprünglich geplanten immunhistochemischen Färbungen der Paraffinschnitte nicht durchgeführt werden konnten, war eine Analyse des p-MET-Status nicht möglich. Die wenigen untersuchten kryokonservierten Schnitte zeigten eine deutlich geringere p-MET als c-MET-Expression. Dies ist nicht überraschend, da es sich um die aktivierte Form des Rezeptors handelt und daher daraus geschlossen werden kann, dass sich die c-MET-Rezeptoren nicht in allen Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung im aktivierten Zustand befanden. In der Literatur wird diese Beobachtung bestätigt. In der bisher einzig veröffentlichten Arbeit zur p-MET-Expression in FFPE-Gewebeschnitten im Nierenzellkarzinom wurden sowohl Primärtumoren als auch Metastasen immunhistochemisch untersucht [5]. Hierbei zeigten 93,5% der Primärtumoren eine erhöhte c-MET- und nur 12,9% eine erhöhte p-MET-Expression [5]. Im Gegensatz dazu wurde in Metastasen bei 84,1% eine erhöhte c-MET- und bei 70,5% eine erhöhte p-MET-Expression beobachtet [5]. Damit konnte eine signifikante Hochregulation der Phosphorylierung des Rezeptors in Metastasen festgestellt werden, was dessen Inaktivierung in der Behandlung von metastasierten Patienten befürwortet [5]. Allerdings war die Kohorte dieser Studie mit 31 Patienten eher klein [5]. Außerdem wurden nur Patienten mit

metastasierter Erkrankung eingeschlossen und eine Differenzierung der untersuchten Nierenzellkarzinom-Typen (klarzellig, papillär, etc.) des Kollektivs war nicht angegeben [5]. In einer anderen Studie zum NSCLC ergab sich ebenfalls eine höhere c-MET-Expression von 22,2% bei einer p-MET-Expression von 5,8% [142]. Die MET-Expression zeigt jedoch starke Variationen je nach Tumorentität und Patientenkollektiv (weitere Studie zum NSCLC: c-MET positiv 74,6% und p-MET positiv 21,5% [110]; Magenkarzinom: c-MET positiv 39% und p-MET positiv 6% [115]; Ovarialkarzinom starke c-MET-Expression 70,26% und starke p-MET-Expression 36,8% [91]). Den Trend der höheren c-MET- gegenüber der p-MET-Expression haben die Vergleichsarbeiten jedoch gemeinsam. Allerdings fällt auch hier wieder auf, dass unterschiedliche Definitionen von Positivität oder starker Expression eingesetzt wurden. Akioka et al., Tsuta et al. sowie Peng et al. definierten die Expression von p-MET bei einer membranösen Färbung von ≥ 10 % der Zellen als positiv [5] [115] [142], Nakamura et al. verwenden einen Schwellenwert von 5% [110]. In verschiedenen Studien konnte eine signifikante Assoziation zwischen c-MET und p-MET identifiziert werden [110] [115], beim Vergleich mit histopathologischen Parametern traten jedoch Unterschiede auf. Im NSCLC ergab sich bei Tsuta et al. eine signifikante Korrelation von c-MET und histologischem Grading, die nicht für p-MET galt oder bei Nakamura et al. eine signifikante Assoziation von p-MET und Tumordifferenzierung, welche nicht auf c-MET zutraf [110] [142]. Im metastasierten Nierenzellkarzinom konnte weder für c-MET noch für p-MET eine signifikante Korrelation mit dem pT-Stadiums beobachtet werden [5]. Die Ergebnisse sind nicht nur bezüglich histopathologischer Parameter heterogen, Überlebensanalysen von p-MET weisen ebenfalls Unterschiede auf. Im metastasierten NZK ergab sich keine Korrelation von MET-Phosphorylierung und Prognose [5], während sich p-MET beim Mammakarzinom als signifikanter prognostischer Faktor für das rückfallsfreie Überleben herausstellte [118]. Beim Magenkarzinom wurde p-MET als unabhängiger prognostischer Faktor bezeichnet [156], in einer Studie zum NSCLC konnte keine Korrelation zum Gesamtüberleben beobachtet werden [142]. In Zusammenschau dieser Erkenntnisse spielt p-MET eine Rolle bei vielen Krebserkrankungen, die Varianz in verschiedenen Studien zeigt jedoch die Komplexität der Mechanismen. Darüber hinaus lassen sich die c-MET- und p-MET-Expression nicht gleichsetzen, wie man bereits in unseren wenigen kryokonservierten Präparaten erkennen kann. Bisher ist jedoch nicht geklärt, welcher Marker die höchste Aussagekraft bezüglich der Aggressivität und Prognose besitzt und somit für Analysen präferiert werden sollte. Erste Erkenntnisse für NZK-FFPE-Gewebe konnten durch die Arbeit von Akioka et al. erlangt werden [5]. Dennoch bleibt unklar, inwiefern sich deren Ergebnisse auf den klarzelligen Typ beziehen, sodass weitere Untersuchungen zur immunhistochemischen p-MET-Expression im klarzelligen Nierenzellkarzinom notwendig sind.

7.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit korrelierte die membranöse c-MET-Expression signifikant mit klinisch-histopathologischen Parametern, zusätzlich wurde sie in der Überlebensanalyse als negativer prognostischer Marker identifiziert und ist entsprechend mit fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert. Es stellt somit auch ein geeignetes therapeutisches Target bei fortgeschrittenem/metastasiertem klarzelligen Nierenzellkarzinom dar. Darüber hinaus zeigte sich in der multivariablen Analyse für das metastasenfreie Überleben eine prognostische Unabhängigkeit dieses Markers, sodass dieser neben anderen Variablen wie dem pT-Stadium oder der Metastasierung zur Prognoseeinschätzung herangezogen werden kann. Im Vergleich dazu konnte der zytoplasmatischen c-MET-Expression keine signifikante Rolle zugeschrieben werden, sodass der Fokus in zukünftigen Untersuchungen auf die membranöse Expression gelegt werden sollte.

Diese Arbeit konnte die in vielen anderen Tumoren identifizierte signifikante Korrelation von membranöser c-MET- und PD-L1-Expression im klarzelligen Nierenzellkarzinom bestätigen. Bei kombinierter Betrachtung beider Marker zeigte sich eine signifikante prognostische Wertigkeit für Gesamt- und metastasenfreies Überleben, welches für Letzteres in der univariaten und multivariablen Cox-Regression bestätigt wurde. Diese Ergebnisse sprechen für eine Signalweginteraktion der beiden Targets, welche, wie bereits beim Nierenzellkarzinom der Fall, im Therapieansatz berücksichtigt werden sollten. Die kombinierte Adressierung von c-MET und PD-L1 wird damit unterstützt. Die möglichen synergistischen Effekte bei Ko-Inhibition müssen in vitro weiter untersucht werden. Bisher werden molekulare Prognosefaktoren beim klarzelligen Nierenzellkarzinom nicht genutzt, allerdings könnte dies für den Patienten im Sinne einer individualisierten Therapie in Zukunft von Relevanz sein. Unsere Daten sprechen auch für den Einbezug des c-MET- und PD-L1-Status in die Therapieentscheidung. Um weitere Erkenntnisse bezüglich des Nutzens von Checkpoint-Inhibitoren zu erlangen, wäre eine Charakterisierung der immunologischen Tumormikroumgebung des Kollektivs interessant.

Die vorliegende Arbeit weist einige Limitationen auf. Das Patientenkollektiv umfasste 70 Patienten, die nach Tumorstadium ausgewählt wurden. Dies kann zwar die Kontrolle über bestimmte Variablen verbessern, entspricht damit aber nicht der Gesamtpopulation von Nierentumorpatienten. Darüber hinaus ist insbesondere die Cox-Regression aufgrund geringer Ereignisse in der untersuchten Kohorte nur unter Vorbehalt zu interpretieren. Zudem stellt die mangelnde Standardisierung der Immunhistochemie sowie deren Auswertung bezüglich verwendeter Scores und Cut-Offs eine weitere Einschränkung dar. Insbesondere der in dieser Arbeit eingesetzte H-Score als subjektives Verfahren wurde ohne Analyse-Software von mir als Doktorandin selbst bestimmt, wohingegen die Auswertung in

vergleichbaren Studien häufig durch zwei voneinander unabhängige Pathologen vorgenommen wird. Ein möglicher Qualitätsunterschied ist daher nicht zu vernachlässigen.

Die ursprünglich geplante Analyse von p-MET konnte aufgrund der fehlgeschlagenen immunhistochemischen Färbung der FFPE-Schnitte nicht erfolgen. Wir konnten die Immunhistochemie als solches als Fehlerquelle ausschließen und stattdessen die Fixierung der Präparate als problematischen Faktor identifizieren. Diese Erkenntnisse weisen insbesondere im Hinblick auf die Detektion phosphorylierter Proteine auf die Notwendigkeit einer verbesserten Standardisierung bei der Gewebeprovorbereitung und den immunhistochemischen Protokollen hin. Für zukünftige aussagekräftige Analysen des p-MET-Status in diesem Kollektiv müssen entweder kryokonservierte Schnitte von jedem Patienten in guter Qualität vorliegen oder eine genau kontrollierte Fixierung und Paraffineinbettung der Tumorpräparate erfolgen. Die Relevanz von p-MET im klarzelligen Nierenzellkarzinom konnte in dieser Arbeit nicht ausreichend eruiert werden, allerdings können die durch die umfangreiche immunhistochemische Etablierung erlangten Erkenntnisse als Anhaltspunkt für Folgearbeiten dienen.

8. Literaturverzeichnis

1. Abcam Datasheet Anti-Met (c-Met) antibody - C-terminal [SP44] (ab227637) [Internet]. URL: <https://www.abcam.com/en-us/products/primary-antibodies/met-c-met-antibody-sp44-c-terminal-ab227637#application=ihc-p>
2. Abcam Datasheet Anti-Met (c-Met) (phospho Y1349) antibody [EP2367Y] [Internet]. URL: <https://www.abcam.com/en-us/products/primary-antibodies/met-c-met-phospho-y1349-antibody-ep2367y-ab68141#application=ihc-p>
3. Adams KF, Leitzmann MF, Albanes D, Kipnis V, Moore SC, Schatzkin A, Chow W-H (2008) Body Size and Renal Cell Cancer Incidence in a Large US Cohort Study. *Am J Epidemiol* 168:268–277
4. Adibi M, Thomas AZ, Borregales LD, Merrill MM, Slack RS, Chen H-C, Sircar K, Murugan P, Tamboli P, Jonasch E, Tannir NM, Matin SF, Wood CG, Karam JA (2015) Percentage of sarcomatoid component as a prognostic indicator for survival in renal cell carcinoma with sarcomatoid dedifferentiation. *Urol Oncol* 33:427.e17–23
5. Akioka T, Kimura S, Katayama Y, Fujii M, Kiwaki T, Kawaguchi M, Fukushima T, Sato Y, Mukai S, Kamoto T, Sawada A (2025) Phosphorylation of MET Is Upregulated in Metastatic Sites of Renal Cell Carcinoma: Possible Role of MET and Hepatocyte Growth Factor Activation-Targeted Combined Therapy. *Biomedicines* 13:811
6. Alaghehbandan R, Perez Montiel D, Luis AS, Hes O (2019) Molecular Genetics of Renal Cell Tumors: A Practical Diagnostic Approach. *Cancers* 12:85
7. Ando S, Araki K (2022) CD8 T-cell heterogeneity during T-cell exhaustion and PD-1-targeted immunotherapy. *Int Immunol* 34:571–577
8. Arai E, Kanai Y (2011) Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. *Int J Clin Exp Pathol* 4:58–73
9. Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, Ibañez-Vea M, Breckpot K, Kochan G, Escors D (2017) PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget* 8:51936–51945
10. Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, Savukoski DO, Hall D, Shivdasani P, Heng JC, Dahlberg SE, Jänne PA, Verma S, Christensen J, Hammerman PS, Sholl LM (2016) MET Exon 14 Mutations in Non–Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression. *J Clin Oncol* 34:721–730
11. Bahadoram S, Davoodi M, Hassanzadeh S, Bahadoram M, Barahman M, Mafakher L (2022) Renal cell carcinoma: an overview of the epidemiology, diagnosis, and treatment. *G Ital Nefrol Organo Uff Della Soc Ital Nefrol* 39:2022-vol3
12. Baker AF, Dragovich T, Ihle NT, Williams R, Fenoglio-Preiser C, Powis G (2005) Stability of Phosphoprotein as a Biological Marker of Tumor Signaling. *Clin Cancer Res* 11:4338–4340

13. Balan M, Teran EM y, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Choueiri TK, Freeman G, Pal S (2015) Novel Roles of c-Met in the Survival of Renal Cancer Cells through the Regulation of HO-1 and PD-L1 Expression. *J Biol Chem* 290:8110–8120
14. Bianchi M, Sun M, Jeldres C, Shariat SF, Trinh Q-D, Briganti A, Tian Z, Schmitges J, Graefen M, Perrotte P, Menon M, Montorsi F, Karakiewicz PI (2012) Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 23:973–980
15. Blom JHM, van Poppel H, Maréchal JM, Jacqmin D, Schröder FH, de Prijck L, Sylvester R (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* 55:28–34
16. Boenisch T (ed) (2001) Immunohistochemical Staining Methods. 3rd ed. Dako Cooperation, Carpinteria, California. URL: <https://www.yumpu.com/en/document/read/8531069/dako-handbook-ihc-world>
17. Borowiak M, Garratt AN, Wüstefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C (2004) Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10608–10613
18. Boschert V, Teusch J, Aljasem A, Schmucker P, Klenk N, Straub A, Bittrich M, Seher A, Linz C, Müller-Richter UDA, Hartmann S (2020) HGF-Induced PD-L1 Expression in Head and Neck Cancer: Preclinical and Clinical Findings. *Int J Mol Sci* 21:8770
19. Bukavina L, Bensalah K, Bray F, Carlo M, Challacombe B, Karam JA, Kassouf W, Mitchell T, Montironi R, O'Brien T, Panebianco V, Scelo G, Shuch B, van Poppel H, Blosser CD, Psutka SP (2022) Epidemiology of Renal Cell Carcinoma: 2022 Update. *Eur Urol* 82:529–542
20. Bundesministerium der Justiz Berufskrankheiten-Verordnung (BKV) Anlage 1 [Internet]. URL: https://www.gesetze-im-internet.de/bkv/anlage_1.html
21. Butler AM, Olshan AF, Kshirsagar AV, Edwards JK, Nielsen ME, Wheeler SB, Brookhart MA (2015) Cancer Incidence Among US Medicare ESRD Patients Receiving Hemodialysis, 1996-2009. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 65:763–772
22. Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD (2015) CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic. *Front Oncol* 4:385
23. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, Gore JL, Sun M, Wood C, Russo P (2019) Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 75:74–84
24. Cazes A, Betancourt O, Esparza E, Mose ES, Jaquish D, Wong E, Wascher AA, Tiriach H, Gymnopoulos M, Lowy AM (2021) A MET Targeting Antibody–Drug Conjugate Overcomes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 27:2100–2110

25. Cell Signaling Technology Datasheet Phospho-Met (Tyr1234/1235) (D26) XP® Rabbit mAb #3077 [Internet]. URL: https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/phospho-met-tyr1234-1235-d26-xp-rabbit-mab/3077?srltid=AfmBOooW6W0YqN6smfCnGGY_h85Q3cF2rZcdRjnbyqEc8ZZzvAT1LMeO
26. Cha J-H, Chan L-C, Li C-W, Hsu JL, Hung M-C (2019) Mechanisms controlling PD-L1 expression in cancer. *Mol Cell* 76:359–370
27. Chang Y-H, Chuang C-K, Pang S-T, Wu C-T, Chuang K-L, Chuang H-C, Liao S-K (2011) Prognostic value of TNM stage and tumor necrosis for renal cell carcinoma. *Kaohsiung J Med Sci* 27:59–63
28. Chayed Z, Kristensen LK, Ousager LB, Rønlund K, Bygum A (2021) Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma: a case series and literature review. *Orphanet J Rare Dis* 16:34
29. Chen S, Zhu Y, Cui J, Wang Y, Xia Y, Song J, Cheng S, Zhou C, Zhang D, Zhang B, Shi B (2017) The role of c-Met in prognosis and clinicopathology of renal cell carcinoma: Results from a single-centre study and systematic review. *Urol Oncol* 35:532.e15-532.e23
30. Cheng H-L, Trink B, Tzai T-S, Liu H-S, Chan S-H, Ho C-L, Sidransky D, Chow N-H (2002) Overexpression of c-met as a Prognostic Indicator for Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder: A Comparison With p53 Nuclear Accumulation. *J Clin Oncol* 20:1544–1550
31. Cho YA, Kim EK, Heo SJ, Cho BC, Kim HR, Chung JM, Yoon SO (2016) Alteration status and prognostic value of MET in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer* 7:2197–2206
32. Choueiri TK, Hessel C, Halabi S, Sanford B, Michaelson MD, Hahn O, Walsh M, Olencki T, Picus J, Small EJ, Dakhil S, Feldman DR, Mangeshkar M, Scheffold C, George D, Morris MJ (2018) Cabozantinib versus sunitinib as initial therapy for metastatic renal cell carcinoma of intermediate or poor risk (Alliance A031203 CABOSUN randomised trial): Progression-free survival by independent review and overall survival update. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 94:115–125
33. Choueiri TK, Tomczak P, Park SH, Venugopal B, Ferguson T, Chang Y-H, Hajek J, Symeonides SN, Lee JL, Sarwar N, Thiery-Vuillemin A, Gross-Goupil M, Mahave M, Haas NB, Sawrycki P, Gurney H, Chevreau C, Melichar B, Kopyltsov E, Alva A, Burke JM, Doshi G, Topart D, Oudard S, Hammers H, Kitamura H, Bedke J, Perini RF, Zhang P, Imai K, Willemann-Rogerio J, Quinn DI, Powles T, KEYNOTE-564 Investigators (2021) Adjuvant Pembrolizumab after Nephrectomy in Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 385:683–694
34. Choueiri TK, Powles T, Burotto M, Escudier B, Boursion MT, Zurawski B, Oyervides Juárez VM, Hsieh JJ, Basso U, Shah AY, Suárez C, Hamzaj A, Goh JC, Barrios C, Richardet M, Porta C, Kowalyszyn R, Feregrino JP, Żołnierek J, Pook D, Kessler ER, Tomita Y, Mizuno R, Bedke J, Zhang J, Maurer MA, Simsek B, Ejzykowicz F, Schwab

- GM, Apolo AB, Motzer RJ, CheckMate 9ER Investigators (2021) Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 384:829–841
35. Chow W-H, Gridley G, Fraumeni JF, Järnholm B (2000) Obesity, Hypertension, and the Risk of Kidney Cancer in Men. *N Engl J Med* 343:1305–1311
 36. Chu C-Y, Lin C-Y, Lin C-C, Li C-F, Wu S-Y, Tsai J-S, Yang S-C, Chen C-W, Lin C-Y, Chang C-C, Yen Y-T, Tseng Y-L, Su P-L, Su W-C (2023) Effect of BIM expression on the prognostic value of PD-L1 in advanced non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. *Sci Rep* 13:3943
 37. Crees ZD, Shearrow C, Lin L, Girard J, Arasi K, Bhoraskar A, Berei J, Eckburg A, Anderson AD, Garcia C, Munger A, Palani S, Smith TJ, Sreenivassappa SB, Vitali C, David O, Puri N (2020) EGFR/c-Met and mTOR signaling are predictors of survival in non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol* 12:1–15
 38. Dabestani S, Thorstenson A, Lindblad P, Harmenberg U, Ljungberg B, Lundstam S (2016) Renal cell carcinoma recurrences and metastases in primary non-metastatic patients: a population-based study. *World J Urol* 34:1081–1086
 39. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ (2019) Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia* 33:299–312
 40. Domènech M, Marmol AMM, Mate JL, Estival A, Moran T, Cucurull M, Saigi M, Hernandez A, Sanz C, Hernandez-Gallego A, Urbizu A, Martinez-Cardus A, Bernat A, Carcereny E (2021) Correlation between PD-L1 expression and MET gene amplification in patients with advanced non-small cell lung cancer and no other actionable oncogenic driver. *Oncotarget* 12:1802–1810
 41. Donskov F, Xie W, Overby A, Wells JC, Fraccon AP, Sacco CS, Porta C, Stukalin I, Lee J-L, Koutsoukos K, Yuasa T, Davis ID, Pezaro C, Kanesvaran R, Bjarnason GA, Sim H-W, Rathin N, Kollmannsberger CK, Canil CM, Choueiri TK, Heng DY (2020) Synchronous Versus Metachronous Metastatic Disease: Impact of Time to Metastasis on Patient Outcome—Results from the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium. *Eur Urol Oncol* 3:530–539
 42. Drilon A, Cappuzzo F, Ou S-HI, Camidge DR (2017) Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET? *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 12:15–26
 43. EAU Guidelines on RCC - Diagnostic Evaluation - Uroweb [Internet]. URL: <https://uroweb.org/guidelines/renal-cell-carcinoma/chapter/diagnostic-evaluation>
 44. EAU Guidelines on RCC - Disease Management - Uroweb [Internet]. URL: <https://uroweb.org/guidelines/renal-cell-carcinoma/chapter/disease-management>
 45. EAU Guidelines on RCC - Prognostic Factors - Uroweb [Internet]. URL: <https://uroweb.org/guidelines/renal-cell-carcinoma/chapter/prognostic-factors>

46. EAU Guidelines on RCC - Staging and Classification Systems - Uroweb [Internet]. URL: <https://uroweb.org/guidelines/renal-cell-carcinoma/chapter/staging-and-classification-systems>
47. El Dib R, Touma NJ, Kapoor A (2012) Cryoablation vs radiofrequency ablation for the treatment of renal cell carcinoma: a meta-analysis of case series studies. *BJU Int* 110:510–516
48. Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA, Bearman SI, Roy V, McGrath PC, Caton JR, Munshi N, Crawford ED (2001) Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. *N Engl J Med* 345:1655–1659
49. Gibney GT, Aziz SA, Camp RL, Conrad P, Schwartz BE, Chen CR, Kelly WK, Kluger HM (2012) c-Met is a prognostic marker and potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 24:343–349
50. Glodde N, Bald T, van den Boorn-Konijnenberg D, Nakamura K, O'Donnell JS, Szczepanski S, Brandes M, Eickhoff S, Das I, Shridhar N, Hinze D, Rogava M, van der Sluis TC, Ruotsalainen JJ, Gaffal E, Landsberg J, Ludwig KU, Wilhelm C, Riek-Burchardt M, Müller AJ, Gebhardt C, Scolyer RA, Long GV, Janzen V, Teng MWL, Kastenmüller W, Mazzone M, Smyth MJ, Tüting T, Hölzel M (2017) Reactive Neutrophil Responses Dependent on the Receptor Tyrosine Kinase c-MET Limit Cancer Immunotherapy. *Immunity* 47:789-802.e9
51. Gown AM (2016) Diagnostic Immunohistochemistry: What Can Go Wrong and How to Prevent It. *Arch Pathol Lab Med* 140:893–898
52. Gymnopoulos M, Betancourt O, Blot V, Fujita R, Galvan D, Lieuw V, Nguyen S, Snedden J, Stewart C, Villicana J, Wojciak J, Wong E, Pardo R, Patel N, D'Hooge F, Vijayakrishnan B, Barry C, Hartley JA, Howard PW, Newman R, Coronella J (2019) TR1801-ADC: a highly potent cMet antibody–drug conjugate with high activity in patient-derived xenograft models of solid tumors. *Mol Oncol* 14:54–68
53. Hallscheidt PJ, Bock M, Riedasch G, Zuna I, Schoenberg SO, Autschbach F, Soder M, Noeldge G (2004) Diagnostic Accuracy of Staging Renal Cell Carcinomas Using Multidetector-Row Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging: A Prospective Study With Histopathologic Correlation. *J Comput Assist Tomogr* 28:333–339
54. Hartmann JT, Bokemeyer C (1999) Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 19:1541–1543
55. Hira VVV, de Jong AL, Ferro K, Khurshed M, Molenaar RJ, Van Noorden CJF (2019) Comparison of different methodologies and cryostat versus paraffin sections for chromogenic immunohistochemistry. *Acta Histochem* 121:125–134
56. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, Heng DY, Larkin J, Ficarra V (2017) Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primer* 3:17009

57. Hsieh JJ, Le VH, Oyama T, Ricketts CJ, Ho TH, Cheng EH (2018) Chromosome 3p Loss–Orchestrated VHL, HIF, and Epigenetic Deregulation in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 36:3533–3539
58. Hu X, Fu X, Wen S, Zou X, Liu Y (2012) Prognostic Value of MACC1 and c-met Expressions in Non-small Cell Lung Cancer. *Chin J Lung Cancer* 15:399–403
59. Huang TJ, Wang JY, Lin SR, Lian ST, Hsieh JS (2001) Overexpression of the c-met protooncogene in human gastric carcinoma--correlation to clinical features. *Acta Oncol Stockh Swed* 40:638–643
60. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P (2005) Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: Meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer* 114:101–108
61. Ilić M, Hofman V, Bontoux C, Goffinet S, Benzaquen J, Heeke S, Boutros J, Lassalle S, Long-Mira E, Zahaf K, Lalvée S, Lespinet-Fabre V, Bordone O, Tanga V, Gómez-Caro A, Cohen C, Berthet J-P, Marquette C-H, Hofman P (2023) Lack of correlation between MET and PD-L1 expression in non-small cell lung cancer revealed by comparative study of matched biopsies and surgical resection samples. *Lung Cancer* 181:107230
62. Immanuel Albertinen Diakonie Sonographie-Bilder, Malignome der Niere, Nierenzellkarzinom [Internet]. URL: <https://sonographiebilder.de/nierentumore>
63. Jeffers M, Taylor GA, Weidner KM, Omura S, Woude GFV (1997) Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* 17:799–808
64. Jiang M, Zhang H, Xiao H, Zhang Z, Que D, Luo J, Li J, Mao B, Chen Y, Lan M, Wang G, Xiao H (2017) High expression of c-Met and EGFR is associated with poor survival of patients with glottic laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 15:931–939
65. Jin J, Xie Y, Zhang J-S, Wang J-Q, Dai S-J, He W, Li S-Y, Ashby CR, Chen Z-S, He Q (2023) Sunitinib resistance in renal cell carcinoma: From molecular mechanisms to predictive biomarkers. *Drug Resist Updat* 67:100929
66. Jung M, Lee S, Moon KC (2022) c-Met and EPHA7 Receptor Tyrosine Kinases Are Related to Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Focusing on the Association with Myoferlin Expression. *Cancers* 14:1095
67. Kammerer-Jacquet S-F, Medane S, Bensalah K, Bernhard J-C, Yacoub M, Dupuis F, Ravaud A, Verhoest G, Mathieu R, Peyronnet B, Brunot A, Laguerre B, Lespagnol A, Mosser J, Dugay F, Belaud-Rotureau M-A, Rioux-Leclercq N (2017) Correlation of c-MET Expression with PD-L1 Expression in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma Treated by Sunitinib First-Line Therapy. *Target Oncol* 12:487–494
68. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008) PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol* 26:677–704

69. Kim I, Ha J, Lee J-H, Yoo K-M, Rho J (2014) The Relationship between the Occupational Exposure of Trichloroethylene and Kidney Cancer. *Ann Occup Environ Med* 26:12
70. Kim JH, Kim BJ, Kim HS (2017) Clinicopathological impacts of high c-Met expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis and review. *Oncotarget* 8:75478–75487
71. Kim JH, Kim HS, Kim BJ, Jang HJ, Lee J (2017) Prognostic value of c-Met overexpression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis and review. *Oncotarget* 8:90351–90357
72. Kim JH, Kim HS, Kim BJ, Lee J, Jang HJ (2017) Prognostic value of c-Met overexpression in pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis. *Oncotarget* 8:73098–73104
73. Klatte T, Rossi SH, Stewart GD (2018) Prognostic factors and prognostic models for renal cell carcinoma: a literature review. *World J Urol* 36:1943–1952
74. Knudson AG (1971) Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820–823
75. Koh YW, Park Y-S, Kang HJ, Shim JH, Yu E (2015) MET is a predictive factor for late recurrence but not for overall survival of early stage hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol* 36:4993–5000
76. Kondo S, Ojima H, Tsuda H, Hashimoto J, Morizane C, Ikeda M, Ueno H, Tamura K, Shimada K, Kanai Y, Okusaka T (2013) Clinical impact of c-Met expression and its gene amplification in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol* 18:207–213
77. Krabbe L-M, Bagrodia A, Margulis V, Wood CG (2014) Surgical Management of Renal Cell Carcinoma. *Semin Interv Radiol* 31:27–32
78. Krebs in Deutschland für 2019/2020, Krebs gesamt, 14. Ausgabe Robert Koch Institut, Berlin 2023 [Internet]. URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2023/kid_2023_c00_97_krebs_gesamt.pdf?__blob=publicationFile
79. Krebs in Deutschland für 2029/2020, Nierenkrebs, 14. Ausgabe Robert Koch Institut, Berlin 2023 [Internet]. URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2023/kid_2023_c64_niere.pdf?__blob=publicationFile
80. Kwok G, Yau TCC, Chiu JW, Tse E, Kwong Y-L (2016) Pembrolizumab (Keytruda). *Hum Vaccines Immunother* 12:2777–2789
81. Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, Bower M, Pinato DJ (2018) Pd-L1. *J Clin Pathol* 71:189–194
82. Lalani A-KA, Gray KP, Albiges L, Callea M, Pignon J-C, Pal S, Gupta M, Bhatt RS, McDermott DF, Atkins MB, Woude GFV, Harshman LC, Choueiri TK, Signoretti S (2017) Differential expression of c-Met between primary and metastatic sites in clear-

- cell renal cell carcinoma and its association with PD-L1 expression. *Oncotarget* 8:103428–103436
83. Lam BQ, Dai L, Qin Z (2016) The role of HGF/c-MET signaling pathway in lymphoma. *J Hematol Oncol* 9:135
 84. Lee SJ, Lee J, Sohn I, Mao M, Kai W, Park C-K, Lim HY (2013) A Survey of c-MET Expression and Amplification in 287 Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res* 33:5179–5186
 85. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 5.0, 2024, AWMF-Registernummer: 043-017OL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/nierenzellkarzinom/>; Zugriff am [04.11.2024]
 86. Li E, Huang X, Zhang G, Liang T (2021) Combinational blockade of MET and PD-L1 improves pancreatic cancer immunotherapeutic efficacy. *J Exp Clin Cancer Res* 40:279
 87. Li H, Li C-W, Li X, Ding Q, Guo L, Liu S, Liu C, Lai C-C, Hsu J-M, Dong Q, Xia W, Hsu JL, Yamaguchi H, Du Y, Lai Y-J, Sun X, Koller PB, Ye Q, Hung M-C (2019) MET Inhibitors Promote Liver Tumor Evasion of the Immune Response by Stabilizing PDL1. *Gastroenterology* 156:1849-1861.e13
 88. Li M, Lv H, Zhong S, Zhou S, Lu H, Yang W (2021) FOXC1: A Specific Biomarker for Triple-Negative Breast Cancer Diagnosis and Classification. *Arch Pathol Lab Med* 146:994–1003
 89. Li N, Lorinczi M, Ireton K, Elferink LA (2007) Specific Grb2-mediated Interactions Regulate Clathrin-dependent Endocytosis of the cMet-tyrosine Kinase. *J Biol Chem* 282:16764–16775
 90. Li Y, Li W, He Q, Xu Y, Ren X, Tang X, Wen X, Yang X, Sun Y, Zeng J, Yun J, Liu N, Ma J (2015) Prognostic value of MET protein overexpression and gene amplification in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 6:13309–13319
 91. Lim L, Wu C-C, Hsu Y-T, Sun F-J, Chang C-L (2019) Clinical significance of c-Met and phospho-c-Met (Tyr1234/1235) in ovarian cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol* 58:105–110
 92. Liu Y, Yu X-F, Zou J, Luo Z-H (2015) Prognostic value of c-Met in colorectal cancer: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 21:3706–3710
 93. Ma G, Deng Y, Chen W, Liu Z, Ai C, Li X, Zhou Q (2019) The Prognostic Role of MET Protein Expression Among Surgically Resected Non-small Cell Lung Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Front Oncol* 9:1441
 94. Macher-Goeppinger S, Keith M, Endris V, Penzel R, Tagscherer KE, Pahernik S, Hohenfellner M, Gardner H, Gröllich C, Schirmacher P, Roth W (2016) MET expression

- and copy number status in clear-cell renal cell carcinoma: prognostic value and potential predictive marker. *Oncotarget* 8:1046–1057
95. Maher ER, Neumann HP, Richard S (2011) von Hippel–Lindau disease: A clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* 19:617–623
 96. Maher ER (2018) Hereditary renal cell carcinoma syndromes: diagnosis, surveillance and management. *World J Urol* 36:1891–1898
 97. Makhov P, Joshi S, Ghatalia P, Kutikov A, Uzzo RG, Kolenko VM (2018) Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies. *Mol Cancer Ther* 17:1355–1364
 98. Manski D Urologielehrbuch.de, Nierenzellkarzinom: Ursachen und TNM-Stadien [Internet]. URL: <https://www.urologielehrbuch.de/nierenzellkarzinom.html>
 99. Mao Z-Y, Zhu G-Q, Ren L, Guo X-C, Su D, Bai L (2016) Prognostic Value of C-met Expression in Cholangiocarcinoma. *Technol Cancer Res Treat* 15:227–233
 100. Martins-Gomes C, Silva AM (2018) Western Blot Methodologies for Analysis of In Vitro Protein Expression Induced by Teratogenic Agents. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1797:191–203
 101. McDermott U, Pusapati RV, Christensen JG, Gray NS, Settleman J (2010) Acquired resistance to MET kinase inhibition in MET-dependent non-small cell lung cancer cells mediated by a switch to EGFR dependency. *Cancer Res* 70:1625–1634
 102. Menko FH, Maher ER (2016) Diagnosis and Management of Hereditary Renal Cell Cancer. Springer International Publishing, Cham. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-319-29998-3_6
 103. Mo H-N, Liu P (2017) Targeting MET in cancer therapy. *Chronic Dis Transl Med* 3:148–153
 104. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM (2016) The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 70:93–105
 105. Moch H, Amin MB, Berney DM, Compérat EM, Gill AJ, Hartmann A, Menon S, Raspollini MR, Rubin MA, Srigley JR, Hoon Tan P, Tickoo SK, Tsuzuki T, Turajlic S, Cree I, Netto GJ (2022) The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 82:458–468
 106. Moch H WHO-ISUP-Graduierungssystem für Nierenkarzinome, Ausgabe 4/2016, Springer Medizin [Internet]. URL: <https://www.springermedizin.de/pathologie/nierenkarzinom/who-isup-graduierungssystem-fuer-nierenkarzinome/10239142>

107. Mongre RK, Mishra CB, Shukla AK, Prakash A, Jung S, Ashraf-Uz-Zaman M, Lee M-S (2021) Emerging Importance of Tyrosine Kinase Inhibitors against Cancer: Quo Vadis to Cure? *Int J Mol Sci* 22:11659
108. Motzer R, Alekseev B, Rha S-Y, Porta C, Eto M, Powles T, Grünwald V, Hutson TE, Kopyltsov E, Méndez-Vidal MJ, Kozlov V, Alyasova A, Hong S-H, Kapoor A, Alonso Gordo T, Merchan JR, Winkquist E, Maroto P, Goh JC, Kim M, Gurney H, Patel V, Peer A, Procopio G, Takagi T, Melichar B, Rolland F, De Giorgi U, Wong S, Bedke J, Schmidinger M, Dutkus CE, Smith AD, Dutta L, Mody K, Perini RF, Xing D, Choueiri TK (2021) Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 384:1289–1300
109. Nakamura Y, Matsubara D, Goto A, Ota S, Sachiko O, Ishikawa S, Aburatani H, Miyazawa K, Fukayama M, Niki T (2007) Constitutive activation of c-Met is correlated with c-Met overexpression and dependent on cell–matrix adhesion in lung adenocarcinoma cell lines. *Cancer Sci* 99:14–22
110. Nakamura Y, Niki T, Goto A, Morikawa T, Miyazawa K, Nakajima J, Fukayama M (2007) c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: An immunohistochemical analysis. *Cancer Sci* 98:1006–1013
111. Noguchi E, Saito N, Kobayashi M, Kameoka S (2015) Clinical significance of hepatocyte growth factor/c-Met expression in the assessment of gastric cancer progression. *Mol Med Rep* 11:3423–3431
112. Novara G, Ficarra V, Antonelli A, Artibani W, Bertini R, Carini M, Cosciani Cunico S, Imbimbo C, Longo N, Martignoni G, Martorana G, Minervini A, Mirone V, Montorsi F, Schiavina R, Simeone C, Serni S, Simonato A, Siracusano S, Volpe A, Carmignani G (2010) Validation of the 2009 TNM Version in a Large Multi-Institutional Cohort of Patients Treated for Renal Cell Carcinoma: Are Further Improvements Needed? *Eur Urol* 58:588–595
113. Pantuck AJ, Zisman A, Rauch MK, Belldegrun A (2000) Incidental renal tumors. *Urology* 56:190–196
114. Pathorama PathoPic - image database ID 4890 [Internet]. URL: <https://v2.pathorama.ch/pathopic/4890/show>
115. Peng Z, Li Z, Gao J, Lu M, Gong J, Tang E-T, Oliner KS, Hei Y-J, Zhou H, Shen L (2015) Tumor MET Expression and Gene Amplification in Chinese Patients with Locally Advanced or Metastatic Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer. *Mol Cancer Ther* 14:2634–2641
116. Pezzicoli G, Musci V, Ciciriello F, Salone F, Cafforio P, Lionetti N, Ragno A, Rizzo M (2024) Genomic profiling and molecular characterization of non-clear cell renal cell carcinoma: a narrative review from a clinical perspective. *Ther Adv Med Oncol* 16:1–17
117. Plénat F, Antunes L, Haller T, Piet-Ounnoughene M, Klein-Monhoven N, Champigneulle J, Chenal P, Bland V, Garcia-Pimenta F, Labouyrie E (2001) [Formaldehyde fixation in the third millennium]. *Ann Pathol* 21:29–47

118. Raghav KP, Wang W, Liu S, Chavez-MacGregor M, Meng X, Hortobagyi GN, Mills GB, Meric-Bernstam F, Blumenschein GR Jr, Gonzalez-Angulo AM (2012) cMET and Phospho-cMET Protein Levels in Breast Cancers and Survival Outcomes. *Clin Cancer Res* 18:2269–2277
119. Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, Viswanathan K, Finger EC, Diep AN, LaGory EL, Kariolis MS, Chan A, Lindgren D, Axelson H, Miao YR, Krieg AJ, Giaccia AJ (2014) Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:13373–13378
120. Recondo G, Che J, Jänne PA, Awad MM (2020) Targeting MET Dysregulation in Cancer. *Cancer Discov* 10:922–934
121. Rini BI, McDermott DF, Hammers H, Bro W, Bukowski RM, Faba B, Faba J, Figlin RA, Hutson T, Jonasch E, Joseph RW, Leibovich BC, Olencki T, Pantuck AJ, Quinn DI, Seery V, Voss MH, Wood CG, Wood LS, Atkins MB (2016) Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of renal cell carcinoma. *J Immunother Cancer* 4:81
122. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, Pouliot F, Alekseev B, Soulières D, Melichar B, Vynnychenko I, Kryzhanivska A, Bondarenko I, Azevedo SJ, Borchellini D, Szczylik C, Markus M, McDermott RS, Bedke J, Tartas S, Chang Y-H, Tamada S, Shou Q, Perini RF, Chen M, Atkins MB, Powles T, KEYNOTE-426 Investigators (2019) Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 380:1116–1127
123. Sacco E, Pinto F, Sasso F, Racioppi M, Gulino G, Volpe A, Bassi P (2009) Paraneoplastic Syndromes in Patients with Urological Malignancies. *Urol Int* 83:1–11
124. Schmidt LS, Linehan WM (2015) Molecular Genetics and Clinical Features of Birt-Hogg-Dubé-Syndrome. *Nat Rev Urol* 12:558–569
125. Shabbir A, Kojadinovic A, Shafiq T, Mundi PS (2023) Targeting RET alterations in cancer: Recent progress and future directions. *Crit Rev Oncol Hematol* 181:103882
126. Shin S-J, Jeon YK, Kim P-J, Cho YM, Koh J, Chung DH, Go H (2016) Clinicopathologic Analysis of PD-L1 and PD-L2 Expression in Renal Cell Carcinoma: Association with Oncogenic Proteins Status. *Ann Surg Oncol* 23:694–702
127. Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S, Fiore PPD (2008) Clathrin-Mediated Internalization Is Essential for Sustained EGFR Signaling but Dispensable for Degradation. *Dev Cell* 15:209–219
128. Silverman SG, Pedrosa I, Ellis JH, Hindman NM, Schieda N, Smith AD, Remer EM, Shinagare AB, Curci NE, Raman SS, Wells SA, Kaffenberger SD, Wang ZJ, Chandarana H, Davenport MS (2019) Bosniak Classification of Cystic Renal Masses, Version 2019: An Update Proposal and Needs Assessment. *Radiology* 292:475–488
129. Sjöström M, Veenstra C, Holmberg E, Karlsson P, Killander F, Malmström P, Niméus E, Fernö M, Stål O (2020) Expression of HGF, pMet, and pAkt is related to benefit of

- radiotherapy after breast-conserving surgery: a long-term follow-up of the SweBCG91-RT randomised trial. *Mol Oncol* 14:2713–2726
130. Smaldone MC, Kutikov A, Egleston BL, Canter DJ, Viterbo R, Chen DYT, Jewett MA, Greenberg RE, Uzzo RG (2012) Small Renal Masses Progressing to Metastases under Active Surveillance: A Systematic Review and Pooled Analysis. *Cancer* 118:997–1006
 131. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, Rodríguez-Abreu D, Moro-Sibilot D, Thomas CA, Barlesi F, Finley G, Kelsch C, Lee A, Coleman S, Deng Y, Shen Y, Kowanetz M, Lopez-Chavez A, Sandler A, Reck M, IMpower150 Study Group (2018) Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med* 378:2288–2301
 132. Song KY, Desai S, Pengo T, Shanley R, Giubellino A (2020) Correlation of MET and PD-L1 Expression in Malignant Melanoma. *Cancers* 12:1847
 133. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN (2018) Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* 48:434–452
 134. Sun X, Li C-W, Wang W-J, Chen M-K, Li H, Lai Y-J, Hsu JL, Koller PB, Chan L-C, Lee P-C, Cheng F-J, Yam C, Chen G-Y, Hung M-C (2020) Inhibition of c-MET upregulates PD-L1 expression in lung adenocarcinoma. *Am J Cancer Res* 10:564–571
 135. Tait C, Tandon S, Baker L, Goodman C, Townell N, Nabi G (2011) Long-term oncologic outcomes of laparoscopic radical nephrectomy for kidney cancer resection: Dundee cohort and metaanalysis of observational studies. *Surg Endosc* 25:3154–3161
 136. Tang Q, Chen Y, Li X, Long S, Shi Y, Yu Y, Wu W, Han L, Wang S (2022) The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. *Front Immunol* 13:964442
 137. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, Chen L, Pardoll DM, Topalian SL, Anders RA (2014) Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 20:5064–5074
 138. Taylor CR, Rudbeck L (eds) (2013) *Immunohistochemical Staining Methods*. 6th ed. Dako, Denmark.
 139. Theiss AP, Chafin D, Bauer DR, Grogan TM, Baird GS (2014) Immunohistochemistry of Colorectal Cancer Biomarker Phosphorylation Requires Controlled Tissue Fixation. *PLoS ONE* 9:e113608
 140. Thommen DS, Schumacher TN (2018) T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* 33:547–562
 141. Tsui K-H, Shvarts O, Smith RB, Figlin R, de KJB, Beldegrun A (2000) Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors. *J Urol* 163:426–430

142. Tsuta K, Kozu Y, Mimae T, Yoshida A, Kohno T, Sekine I, Tamura T, Asamura H, Furuta K, Tsuda H (2012) c-MET/Phospho-MET Protein Expression and MET Gene Copy Number in Non-small Cell Lung Carcinomas. *J Thorac Oncol* 7:331–339
143. Tuli L, Ransom HW (2009) LC–MS Based Detection of Differential Protein Expression. *J Proteomics Bioinform* 2:416–438
144. Tumorregister München Überleben ICD-10 C64: Nierenkarzinom [Internet]. URL: https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/sC64__G-ICD-10-C64-Nierenkarzinom-Survival.pdf
145. Varshney N, Kebede AA, Owusu-Dapaah H, Lather J, Kaushik M, Bhullar JS (2017) A Review of Von Hippel-Lindau Syndrome. *J Kidney Cancer VHL* 4:20–29
146. Vasudev NS, Wilson M, Stewart GD, Adeyoku A, Cartledge J, Kimuli M, Datta S, Hanbury D, Hrouda D, Oades G, Patel P, Soomro N, Sullivan M, Webster J, Selby PJ, Banks RE (2020) Challenges of early renal cancer detection: symptom patterns and incidental diagnosis rate in a multicentre prospective UK cohort of patients presenting with suspected renal cancer. *BMJ Open* 10:e035938
147. Viticchiè G, Muller PAJ (2015) c-Met and Other Cell Surface Molecules: Interaction, Activation and Functional Consequences. *Biomedicines* 3:46–70
148. Volpe A, Patard JJ (2010) Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World J Urol* 28:319–327
149. Volpe A (2016) The role of active surveillance of small renal masses. *Int J Surg Lond Engl* 36:518–524
150. Walsh N, Larkin A, Kennedy S, Connolly L, Ballot J, Ooi W, Gullo G, Crown J, Clynes M, O'Driscoll L (2009) Expression of multidrug resistance markers ABCB1 (MDR-1/P-gp) and ABCC1 (MRP-1) in renal cell carcinoma. *BMC Urol* 9:6
151. Wang H, Rao B, Lou J, Li J, Liu Z, Li A, Cui G, Ren Z, Yu Z (2020) The Function of the HGF/c-Met Axis in Hepatocellular Carcinoma. *Front Cell Dev Biol* 8:55
152. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J (2016) PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets Ther* 9:5023–5039
153. Warren AY, Harrison D (2018) WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World J Urol* 36:1913–1926
154. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H (2000) Effect of Formalin Tissue Fixation and Processing on Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24:1016–1019
155. Winter H, Meimarakis G, Angele MK, Hummel M, Staehler M, Hoffmann R-T, Hatz RA, Löhe F (2010) Tumor infiltrated hilar and mediastinal lymph nodes are an independent prognostic factor for decreased survival after pulmonary metastasectomy in patients with renal cell carcinoma. *J Urol* 184:1888–1894

156. Wu J, Yu J, Wu H, Zheng L, Ni X, Li X, Du G, Jiang B (2014) Expressions and clinical significances of c-MET, p-MET and E2f-1 in human gastric carcinoma. *BMC Res Notes* 7:6
157. Wu Q, Jiang L, Li S, He Q, Yang B, Cao J (2021) Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin* 42:1–9
158. Wu Z, Li M, Liu B, Cai C, Ye H, Lv C, Yang Q, Sheng J, Song S, Qu L, Xiao L, Sun Y, Wang L (2014) Robotic versus Open Partial Nephrectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 9:e94878
159. Xitlally P-N, Alejandro A-S, Norma H-P, Mario O-M, Enrique C-P, Cesar C-R, José L-L, Pedro B-B, Juan-Manuel H-M, Oscar A (2024) Prognostic impact of nectin-like molecule-5 (CD155) expression in non-small cell lung cancer. *J Transl Med* 22:841
160. Xu R, Liu X, Li A, Song L, Liang J, Gao J, Tang X (2022) c-Met up-regulates the expression of PD-L1 through MAPK/NF- κ Bp65 pathway. *J Mol Med* 100:585–598
161. Xu X, Zhang G, He L, Zhu Y (2019) Clinicopathological impacts of c-Met overexpression in bladder cancer: evidence from 1,336 cases. *OncoTargets Ther* 12:2695–2702
162. Yakes FM, Chen J, Tan J, Yamaguchi K, Shi Y, Yu P, Qian F, Chu F, Bentzien F, Cancilla B, Orf J, You A, Laird AD, Engst S, Lee L, Lesch J, Chou Y-C, Joly AH (2011) Cabozantinib (XL184), a Novel MET and VEGFR2 Inhibitor, Simultaneously Suppresses Metastasis, Angiogenesis, and Tumor Growth. *Mol Cancer Ther* 10:2298–2308
163. Yang Y, Wang C, Dai C, Liu X, Li W, Huang M, Zhao X, Ji D, Li J, Guo W (2021) Amplification and expression of c-MET correlate with poor prognosis of patients with gastric cancer and upregulate the expression of PDL1. *Acta Biochim Biophys Sin* 53:547–557
164. Yi M, Niu M, Xu L, Luo S, Wu K (2021) Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment. *J Hematol Oncol* 14:10
165. Zaccagnino A, Vynnytska-Myronovska B, Stöckle M, Junker K (2023) An In Vitro Analysis of TKI-Based Sequence Therapy in Renal Cell Carcinoma Cell Lines. *Int J Mol Sci* 24:5648
166. Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut Nierenkrebs [Internet]. URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Nierenkrebs/nierenkrebs_no de.html
167. Zhang J, Zhang Q (2018) VHL and Hypoxia Signaling: Beyond HIF in Cancer. *Biomedicines* 6:35
168. Zhang L, Henske EP (2020) Chromophobe renal cell carcinoma: New genetic and metabolic insights. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 38:678–681

169. Zhang Y, Xia M, Jin K, Wang S, Wei H, Fan C, Wu Y, Li X, Li X, Li G, Zeng Z, Xiong W (2018) Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Mol Cancer* 17:45
170. Zhao X, Qu J, Hui Y, Zhang H, Sun Y, Liu X, Zhao X, Zhao Z, Yang Q, Wang F, Zhang S (2017) Clinicopathological and prognostic significance of c-Met overexpression in breast cancer. *Oncotarget* 8:56758–56767
171. Zhong J, Wu X, Gao Y, Chen J, Zhang M, Zhou H, Yang J, Xiao F, Yang X, Huang N, Qi H, Wang X, Bai F, Shi Y, Zhang N (2023) Circular RNA encoded MET variant promotes glioblastoma tumorigenesis. *Nat Commun* 14:4467
172. Zhou L, Liu X-D, Sun M, Zhang X, German P, Bai S, Ding Z, Tannir N, Wood CG, Matin SF, Karam JA, Tamboli P, Sircar K, Rao P, Rankin EB, Laird DA, Hoang AG, Walker CL, Giaccia AJ, Jonasch E (2016) Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene* 35:2687–2697
173. Zlobec I, Steele R, Terracciano L, Jass JR, Lugli A (2007) Selecting immunohistochemical cut-off scores for novel biomarkers of progression and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 60:1112–1116
174. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F (2015) International Variations and Trends in Renal Cell Carcinoma Incidence and Mortality. *Eur Urol* 67:519–530

9. Publikationen

Vorträge

64. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie, 19.-22.06.2024, Freiburg

Prognostische Wertigkeit von c-MET im klarzelligen Nierenzellkarzinom in Korrelation zum PD-L1 Status

Piller M.¹, Junk K.¹, Zeuschner P.¹, Stahl P.R.², Stöckle M.¹, Junker K.¹, Zaccagnino A.¹

¹Universität des Saarlandes, Klinik für Urologie und Kinderurologie, Homburg/Saar

²Medical School Berlin, Medizinische Fakultät, Berlin

Postervortrag 15. AuF-Symposium, 15.-16.11.2024, Homburg

Exploring interplay between MET axis and PD-L1 in renal cell carcinoma cell lines

Zaccagnino A.¹, Dietrich K.¹, **Piller M.**¹, Junk K.¹, Zeuschner P.¹, Stahl P.^{2,3}, Jaschkowitz G.¹, Nößner E.⁴, Stöckle M.¹, Junker K.¹

¹Department of Urology and Pediatric Urology, Saarland University, Homburg

²Institut for Pathology, Saarland University Hospital, Homburg

³Institut for Pathology, Section Molekularpathology und Cytopathology, University Hospital Hamburg

⁴Helmholtz-Zentrum, Munich

10. Dank

Mein Dank gilt zuallererst Frau Prof. Dr. Kerstin Junker für die Überlassung des Themas, die tolle Unterstützung sowie die unzähligen Ratschläge, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Frau Dr. rer. nat. Angela Zaccagnino danke ich für die ausgezeichnete Betreuung, ihre Geduld und ihr stets offenes Ohr bei sämtlichen Fragen, die sich im Laufe der Zeit ergeben haben. Eure Expertise und Begeisterung für die Wissenschaft waren eine große Motivation für mich.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Forschungslabors bedanken, insbesondere bei Maria Link für die großartige Einarbeitung in die Immunhistochemie und bei Michelle Ip, die mir bei jeglichen Anliegen in der Laborarbeit immer weiterhalf. Danke auch an Kévin Junk für die Überlassung seiner Daten und an das Team der Pathologie des Uniklinikums Erlangen für das Einscannen meiner Gewebeschnitte.

Zudem gilt mein Dank Frau Dipl.-Stat. Gudrun Wagenpfeil und Herrn Dr. Jan Mink, die mir mit ihren Hinweisen die statistische Auswertung erleichterten.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung während des gesamten Studiums bedanken. Ein großes Dankeschön an meine Großeltern, ihr habt stets mit mir mitgefiebert und immer an mich geglaubt. Danke Leo für deine unglaubliche Geduld, Unterstützung und liebevolle Art, die mir in stressigen Zeiten immer wieder Kraft gaben. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, ihr habt mich mein ganzes Leben lang uneingeschränkt unterstützt, standet immer hinter mir und habt mir dadurch das Erreichen meiner Ziele überhaupt erst ermöglicht.

11. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.