

Aus dem Bereich Urologie  
Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **PSMA im klarzelligen Nierenzellkarzinom**

Eine neue Option zur Detektion von Metastasen

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2020

vorgelegt von:

Annika Leonie Thibaut

geb. am: 19.09.1993 in Konstanz

Tag der Promotion: 11.02.2021

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Junker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ezziddin

***Widmung***

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>PSMA im klarzelligen Nierenzellkarzinom</b>	<b>I</b>
Eine neue Option zur Detektion von Metastasen	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>1 Zusammenfassung / Abstract</b>	<b>2</b>
1.1 Zusammenfassung	2
1.2 Abstract	3
<b>2 Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1 Nierenzellkarzinom	4
2.1.1 Epidemiologie	4
2.1.2 Risikofaktoren und Ätiologie	4
2.1.3 Histopathologische Klassifizierung	5
2.1.4 Diagnostik und Stadieneinteilung	9
2.1.5 Therapie und Prognose	11
2.1.6 Metastasierung	12
2.2 Grundlagen der Tumorneoangiogenese	13
2.3 Prostata-spezifisches Membran-Antigen PSMA	15
2.3.1 Klinische Bedeutung von PSMA in der Diagnostik und Therapie	16
2.3.2 Prostatakarzinom	16
2.3.3 Nierenzellkarzinom	16
<b>3 Zielstellung</b>	<b>17</b>
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>18</b>
4.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben	18
4.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung	19
4.3 Lösungen und Materialien	20
4.4 Geräte und Hilfsmittel	21
4.5 Nachweis von PSMA und CD31 mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	21
4.6 Statistische Auswertung	22
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>23</b>
5.1 Etablierung der Fluoreszenzdoppelfärbung	23
5.2 Expression von PSMA im Prostata- und Nierenzellkarzinom	24
5.2.1 PSMA-Expression im Prostatakarzinom	24
5.2.2 PSMA-Expression im gesunden Nierengewebe und im Nierenzellkarzinom	24

5.2.3	Korrelation von PSMA zu klinisch-pathologischen Parametern	27
5.2.4	PSMA-Expression im Vergleich zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren	28
5.2.5	PSMA-Expression in Metastasen	34
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>55</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>56</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>57</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ccRCC	klarzelliges Nierenzellkarzinom
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe (engl., formalin-fixed paraffin-embedded tissue)
MRT	Magnetresonanztomographie
kNZK	klarzelliges Nierenzellkarzinom
PCa	Prostatakarzinom
PET/CT	Positronen-Emissions-Tomographie/ Computertomographie
PSMA	Prostataspezifisches Membranantigen
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
TBS	TRIS-buffered saline (TRIS-gepufferte Kochsalzlösung)
NaCl	Natriumchlorid
KCl	Kaliumchlorid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat

# 1 Zusammenfassung / Abstract

## 1.1 Zusammenfassung

Das prostata-spezifische Membranantigen (PSMA) wird im Prostatakarzinom vermehrt exprimiert. Die Expression von PSMA ist - anders als der Name vermuten lässt - nicht prostataspezifisch, sondern findet sich auch in vielen anderen Geweben. Das Ziel dieser Dissertation war die Untersuchung einer möglichen Expression des PSMA im klarzelligen Nierenzellkarzinom und dessen Metastasen zur Überprüfung der Fragestellung, ob das PSMA-PET/CT eine Option zur besseren Diagnostik dieser Erkrankung darstellt. Außerdem wurde eine mögliche Korrelation zwischen der PSMA-Expression und dem histologischen Grad sowie T-Stadium der Primärtumoren überprüft. Dazu wurden die Primärtumoren und Metastasen von insgesamt 57 Patienten (27 nicht-metastasiert, 30 metastasiert, 18 Metastasen und 10 Prostatakarzinome als Kontrolle) mittels Immunfluoreszenz gefärbt und histologisch ausgewertet. Neben PSMA wurde außerdem das Oberflächenprotein CD31 gefärbt, um Endothelzellen sichtbar zu machen und PSMA dadurch lokalisieren zu können.

In gesundem Nierengewebe gelang der Nachweis des PSMA in einigen Tubuli, jedoch nicht in Endothelzellen. Im Gegensatz dazu konnte PSMA in den klarzelligen Nierenzellkarzinomen in Endothelzellen detektiert werden, jedoch - anders als beim Prostatakarzinom - nicht in den Tumorzellen.

88% der ausgewerteten klarzelligen Nierenzellkarzinom Proben exprimierten PSMA in Gefäßen. Zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren konnte hierbei kein Unterschied nachgewiesen werden. Außerdem fand sich weder zwischen T-Stadium und PSMA-Expression noch zwischen histologischem Grad und PSMA-Expression eine Korrelation. Auch mit der Gefäßdichte konnte bzgl. dieser Parameter keine Korrelation gefunden werden. 89% der untersuchten Metastasen zeigten eine PSMA-Expression in den Gefäßen.

Da in einem hohen Anteil der Metastasen PSMA nachgewiesen werden konnte, ist die Anwendbarkeit eines PSMA-PET/CT eine Option für deren Detektion. Die Rolle des PSMA in Tumorgefäßen ist weiterhin nicht abschließend geklärt, sodass weitere Studien zu dessen Funktionen sowie daraus ableitbaren Möglichkeiten zur Diagnostik und Therapie durchgeführt werden sollten.

## 1.2 Abstract

The prostate specific membrane antigen (PSMA) is overexpressed in prostate carcinoma. The expression of PSMA – in contrast to what its name might suppose – is not specific for prostate, but can also be found in other tissues. The goal of this dissertation was to study a potential expression of PSMA in clear cell renal carcinoma and its metastases in order to answer the question if PSMA-PET/CT might represent an option for an improved diagnosis of this disease. In addition, a potential correlation between PSMA expression and its histological grade as well as the T-state of the primary tumor was tested. For that purpose the primary tumors and metastases of a total of 57 patients (27 non-metastasized, 30 metastasized, 18 metastases and 10 prostate carcinomas as control) were stained by means of immune-fluorescence and analyzed histologically. In addition to PSMA, the surface protein CD31 was stained in order to visualize endothelial cells and thereby to localize PSMA.

In healthy renal tissue the detection of PSMA was successful in some tubuli but not in endothelial cells. In contrast PSMA could be detected in endothelial cells of clear cell renal carcinoma but not in tumor cells as opposed to prostate carcinoma.

88% of the clear cell renal carcinoma samples expressed PSMA in blood vessels. No difference between non-metastatic and metastatic tumors could be demonstrated in that regard. In addition, neither a correlation between T-state and PSMA-expression, nor between histological grade and PSMA-expression could be found. With regard to these parameters also no correlation to vascular density could be found. 89% of the analyzed metastases revealed PSMA expression in the vasculature.

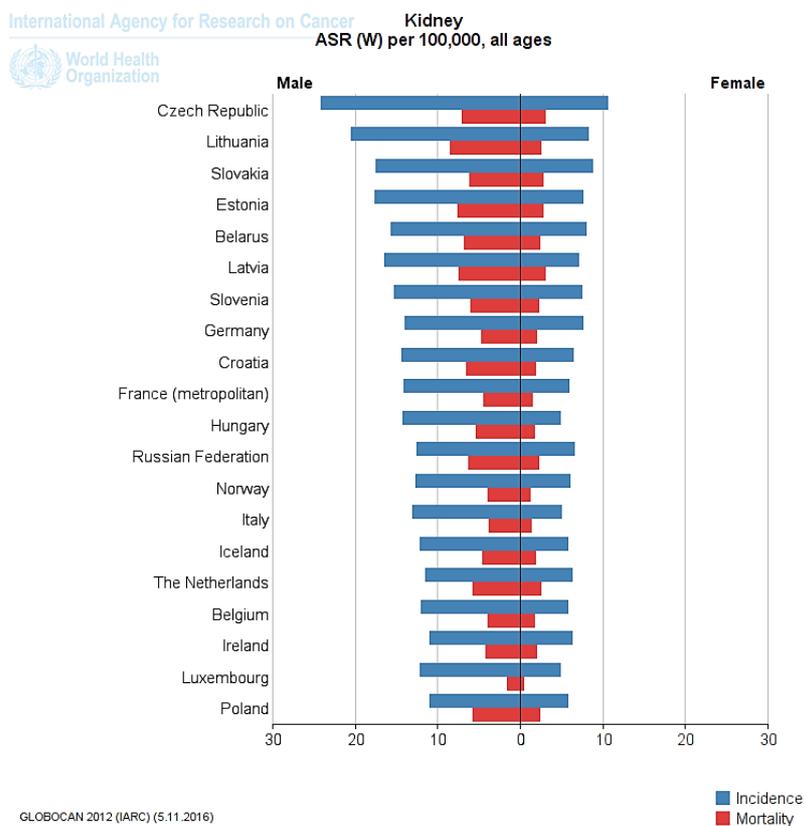
As it was possible to detect PSMA in a large fraction of metastases, the application of PSMA-PET/CT for their detection is an option. The role of PSMA in tumor vessels is still not fully elucidated, therefore additional studies of its functions and deducible options for diagnosis and therapy should be conducted.

## 2 Einleitung

### 2.1 Nierenzellkarzinom

#### 2.1.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom (NZK) stellte mit einer Inzidenz von 11.353 (Männer) bzw. 7.262 (Frauen) 2012 die achthäufigste aller Krebsneuerkrankungen des Mannes und die zehnthäufigste der Frau in Europa dar (Ljungberg et al., 2011) (siehe Abbildung 1). Es handelt sich überwiegend um eine Krebserkrankung des älteren Menschen. Frauen erkranken im Durchschnitt mit 72 Jahren, Männer mit 68 Jahren. Im Jahre 2012 verstarben 4.716 Männer und 2.827 Frauen am NZK (Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015).



**Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität des Nierenzellkarzinoms bei Männern und Frauen in Europa (aus Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015)**

#### 2.1.2 Risikofaktoren und Ätiologie

In der Literatur wird zwischen modifizierbaren und nicht modifizierbaren Risikofaktoren unterschieden. Zu den modifizierbaren Risikofaktoren für die Entstehung eines NZK gehören Rauchen (Hunt et al., 2005), ein erhöhter BMI (Renehan et al., 2008) und erhöhter Blutdruck (Vatten et al.,

2007). Nicht modifizierbare Risikofaktoren sind terminale Niereninsuffizienz (Port et al., 1989) und hereditäre Tumorsyndrome (u.a. das von Hippel-Lindau-Syndrom (Decker, 2006) oder das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom (Pavlovich et al., 2002). Ursprung des klarzelligem NZK sind die proximalen Tubuluszellen der Niere. Andere Tumorentitäten entstehen aus distaleren Abschnitten (Baldewijns et al., 2008).

### 2.1.3 Histopathologische Klassifizierung

Nach aktuellen Leitlinien werden die Nierentumoren in 10 verschiedene Gruppen mit jeweils weiteren Untergruppen eingeteilt (siehe Tabelle 2, Abbildung 2). In Tabelle 1 ist die Histopathologie der häufigsten Subtypen aufgelistet.

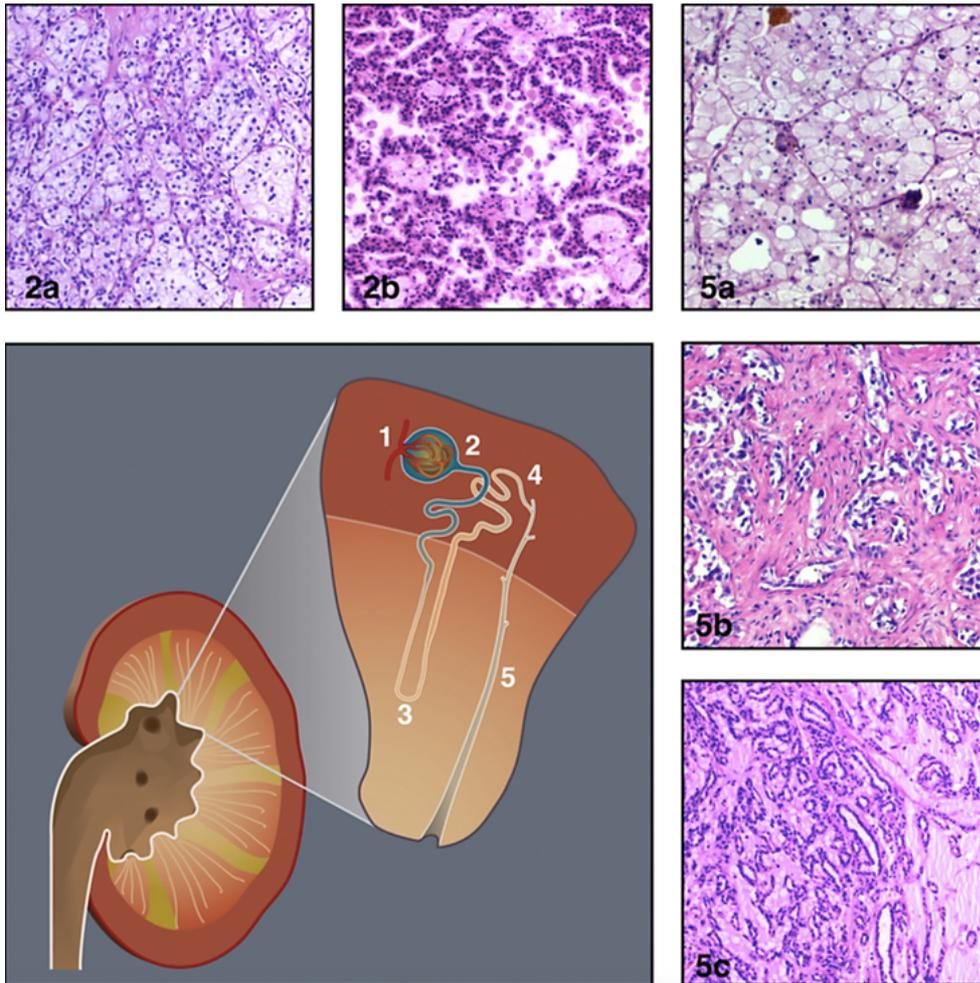
**Tabelle 1: Übersicht über die häufigsten Subtypen des Nierenzellkarzinoms (Shuch et al., 2015)**

<b>Tumortyp</b>	<b>Subtyp</b>	<b>Makroskopie</b>	<b>Mikroskopie</b>	<b>Somatische Mutationen</b>	<b>Chromosomale Aberrationen</b>
<b>Klarzellig</b>	-	Gelb, gut umschrieben, kann hämorrhagische und nekrotische Anteile haben	Reichlich klares Zytoplasma aufgrund der Glykogen- und Lipidverteilung	VHL, PBRM1, SETD2, BAP1, JARID1A, mTOR, PI3K	3p (90%), 14q, 8p, 9p, Zugewinn bei 5q und 12q
<b>Papillär</b>	1 2	Gemischte Beschaffenheit: Zystisch und solide, Läsionen häufig rotbraun, gut begrenzte Pseudokapsel	Papillär oder tubulopapillär. Verkalkungen, Nekrose und schaumige Makrophageninfiltrationen  Typ 1: dünne basophile Papillen mit klarem Zytoplasma  Typ 2: heterogen, dickere Papillen und eosinophiles Zytoplasma	MET, NRF2, CUL3	Zugewinn von 7, 8q, 12q, 16p, 17, 20; Verlust von 9p  Typ 2: Zugewinn von 8q, Verlust von 1p und 9p
<b>Chromophob</b>	Klassisch eosinophil	Großer gut umschriebener, hellbrauner Tumor mit gelegentlicher zentraler Narbe	Ausgeprägte Zellgrenzen und umfangreiches Zytoplasma, Kernmorphologie mit perinukleären Höfen und Binukleation  Klassisch: bleiches	TP53	Verlust der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13 und 17

## Einleitung

			Zytoplasma Eosinophil: große Tumorzellen mit feiner eosinophiler Granulation		
<b>Onkozytom</b>	-	Mahagoniefarben, gut umschrieben, gelegentlich zentrale Narbe, kaum Nekrosen	Polygonale Zellen mit reichlich eosinophilem Zytoplasma und runden, uniformen Kernen	Mitochondriale Gene Komplex I	Verlust von 1p, Y, häufig normaler Karyotyp
<b>Sammelrohr</b>	-	Teilweise cystisch, weißlich-graues Aussehen und häufige Invasion in die renalen Sinus	Tubulopapilläres Muster, Zellen häufig säulenartig angeordnet, mukinös, desmoplastisches Stroma	Nicht bekannt	Verluste an 8p, 16p, 1p, 9p, und Zugewinn an 13q
<b>Medullär</b>	-	Hellbraun/weiß, kaum definierte Kapsel, ausgeprägte Einblutungen und Nekrosen	Kaum differenzierte eosinophile Zellen, Entzündungs- zellen, netzförmiges Muster häufig	Nicht bekannt	Kaum beschrieben, wahrscheinlich normaler Karyotyp
<b>MiT Familie</b>	-	Gelbliches Gewebe, häufig übersät mit Einblutungen und Nekrosen	Papilläre oder geschachtelte Muster, granuläre und eosinophile Zellen mit voluminösem Zytoplasma	-	Sich wiederholende Translokationen: Xp11.2 (TFE3) oder 6p21 (TFEB)

Am häufigsten kommt das kzNZK mit einem Anteil von 75 % aller Nierentumoren vor (Lopez-Beltran et al., 2006).



**Abbildung 2: Ursprungsorte und Histopathologie der verschiedenen Subtypen des Nierenzellkarzinoms (aus Baldewijns et al., 2008).** Das Nephron besteht aus folgenden Abschnitten: Nierenkörperchen (1) und Nierentubulus, was wiederum in vier histologische Zonen unterteilt werden kann: proximaler Tubulus (2), Henle Schleife (3), distaler Tubulus (4) und Sammelrohr (5). Die unterschiedlichen Subtypen des NZK entstehen aus den verschiedenen Abschnitten des Tubulussystems: aus dem proximalen Tubulus entstehen das kzNZK (2a) und das papilläre NZK (2b) und aus dem Sammelrohr das chromophobe NZK (5a), das Sammelgangkarzinom (5b) und das muzinöses tubuläres und spindelzelliges NZK (5c).

**Tabelle 2: Übersicht zur histologischen Klassifikation der Nierentumoren (aus Moch et al., 2016)**

<b>Nierenzelltumoren</b>	Papilläres Adenom
	Onkozytom
	Klarzelliges NZK <ul style="list-style-type: none"> <li>Multilokulärer zystischer Nierenzelltumor mit niedrig malignem Potential</li> </ul>
	Papilläres NZK
	Chromophobes NZK

	Sammelgang-Karzinom
	Renales medulläres NZK
	MiT-assoziiertes Translokalisations-NZK <ul style="list-style-type: none"> <li>• Xp11-Translokations-NZK</li> <li>• t(16;11)-NZK</li> </ul>
	Muzinöses tubuläres und spindelzelliges NZK
	Tubulozystisches NZK
	NZK assoziiert mit einer erworbenen zystischen Nierenerkrankung
	Klarzelliges papilläres NZK
	NZK assoziiert mit hereditärer Leiomyomatose
	SDH-B-Defizienz-assoziiertes NZK
	NZK, NOS
<b>Metanephrische Tumore</b>	Metanephrisches Adenom
	Metanephrisches Adenofibrom
	Metanephrischer Stromatumor
<b>Nephroblastische Tumoren</b>	Nephrogene Reste
	Nephroblastom
	Zystisches partiell differenziertes Nephroblastom
<b>Mesenchymale Tumoren bei Kindern</b>	Klarzell-Sarkom
	Rhabdoid-Tumor
	Kongenitales mesoblastisches Nephrom
	Ossifizierender renaler Tumor des Säuglingsalters
<b>Mesenchymale Tumoren bei Erwachsenen</b>	Angiomyolipom
	Epitheloides Angiomyolipom
	Myom
	Hämangiom

	Leiomyom
	Lymphangiom
	Juxtaglomerularzelltumor
	Renomedullärer interstitieller Tumor
	Schwannom
	Solitärer fibröser Tumor
	Primitiver neuroektodermaler Tumor
	Synoviales Sarkom
<b>Gemischte mesenchymale und epitheliale Tumoren</b>	Zystisches Nephrom/Gemischter epithelialer Stromatumor (MEST)
<b>Neuroendokrine Tumoren</b>	Low-grade neuroendokriner Tumor (Karzinoid)
	High-grade neuroendokriner Tumor (Neuroendokrines Karzinom)
	Neuroblastom
	Phäochromozytom
<b>Hämatopoetische und lymphoide Tumoren</b>	Lymphom
	Leukämie
	Plasmozytom
<b>Keimzelltumoren</b>	Teratom
	Chorionkarzinom
<b>Metastatische Nierenzellkarzinome</b>	

### 2.1.4 Diagnostik und Stadieneinteilung

Das NZK wird häufig zufällig diagnostiziert. Nur rund 30% der NZK werden aufgrund von Symptomen erkannt, welche meist unspezifisch sind. Häufige Symptome sind akute oder chronische Flankenschmerzen, Hypertonie, Kachexie und Anämie. Seltener dagegen lassen sich Makrohämaturie, palpable Raumforderungen, Fieber oder Hyperkalziämie finden. Nach Anamnese, körperlicher Untersuchung und Erstellen eines Blutbilds erfolgt eine Sonographie der Nieren, wobei jede

Auffälligkeit mittels CT oder MRT weiter abgeklärt werden sollte (Capitano and Montorsi, 2016). In der Diskussion stehen weiterführende bildgebende Verfahren wie die Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomografie (Giannarini et al., 2012) oder das PET-CT (Park et al., 2009). Diese zählen jedoch noch nicht zu den Standardverfahren der Diagnostik.

Zur Abklärung von möglichen Lungenmetastasen und vergrößerten mediastinalen Lymphknoten wird das Thorax-CT (Lim and Carter, 1993) empfohlen. Da andere Metastasen wie Knochen- und Hirnmetastasen oft klinisch bereits auffällig sind, wird hier bei fehlender Symptomatik keine routinemäßige Bildgebung empfohlen (Koga et al., 2001). Laut aktuellen Leitlinien sollte der Tumor nach dem WHO-ISUP-Grading-System eingeteilt werden (siehe Tabelle 3). Tabelle 4 gibt eine Übersicht der Kriterien für die Einteilung der TNM-Klassifikation wieder.<sup>1</sup>

**Tabelle 3: Vancouver-Klassifikation von Nierentumoren (nach Kristiansen et al., 2015)**

<b>Grad 1</b>	Nukleoli der Tumorzellen nicht sichtbar oder klein und basophil bei 400facher Vergrößerung
<b>Grad 2</b>	Nukleoli der Tumorzellen auffällig bei 400facher Vergrößerung aber unauffällig bei 100facher Vergrößerung
<b>Grad 3</b>	Nukleoli der Tumorzellen eosinophil und deutlich sichtbar bei 100facher Vergrößerung
<b>Grad 4</b>	Tumor zeigt deutlich pleomorphe Zellkerne und/oder enthält Tumorroiesenzellen und/oder sarkomatoide und/oder rhabdoide Differenzierungsmuster

---

<sup>1</sup> T=Tumor, Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors; N=Nodus, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen; M=Metastasen, Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen

**Tabelle 4: TNM-Klassifikation für das Nierenzellkarzinom nach UICC 2010 (Langer, 2010)**

<b>TX</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>T1</b>	Tumor ≤ 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
<b>T1a</b>	Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung
<b>T1b</b>	Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung
<b>T2</b>	Tumor > 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
<b>T3a</b>	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenale Fettkapsel, aber nicht Gerota'sche Faszie
<b>T3b</b>	Tumorausbreitung in Nierenvenen oder Hohlvene unterhalb des Zwerchfells
<b>T3c</b>	Tumorausdehnung in Vena cava oberhalb des Zwerchfells
<b>T4</b>	Tumorausdehnung über Gerota'sche Faszie hinaus
<b>NX</b>	Benachbarte (regionäre) Lymphknoten sind nicht beurteilbar
<b>N0</b>	Kein Anhalt für benachbarte Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Metastase in einem benachbarten Lymphknoten
<b>N2</b>	Metastase in mehr als einem benachbarten Lymphknoten
<b>MX</b>	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen

### 2.1.5 Therapie und Prognose

Laut aktueller Leitlinie sollten lokal begrenzte NZK in der Kategorie T1 und T2 nierenerhaltend operiert werden. Dabei ist die laparoskopische Resektion der offenen vorzuziehen, da der Blutverlust der Patienten geringer und Klinikaufenthalte kürzer gehalten werden können („Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.2, 2017, AWMF Registernummer: 043/017OL“). Allerdings ist die Gesamt- und tumorspezifische Überlebensrate bei beiden Operationsmethoden gleich groß (MacLennan et al., 2012). Nicht zur standardmäßigen Therapie zählt die Lymphaden-

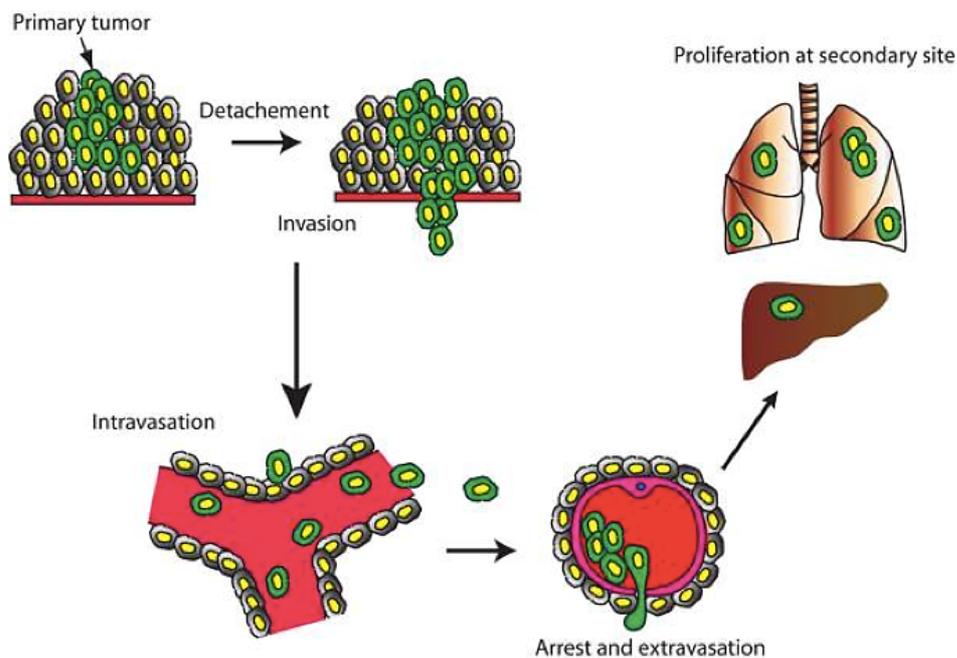
(Blom et al., 2009) und Adrenalectomie (Bekema et al., 2013). Für multimorbide Patienten und solche mit geringerer Lebenserwartung können auch nicht-invasive Ansätze wie die aktive Überwachung Anwendung finden. Allerdings gibt es laut aktueller Leitlinie „weder objektive Kriterien zur adäquaten Selektion von Patienten noch eine einheitliche Definition zur aktiven Überwachung“ („Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.2, 2017, AWMF Registernummer: 043/017OL“).

Um prognostische Aussagen über das NZK treffen zu können, wurden verschiedene „multifaktorielle Modelle“ entwickelt, die Parameter wie die Metastasierung und verschiedene Laborwerte enthalten. Welches der Modelle Anwendung findet, hängt dabei vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und dem Krankheits- bzw. Therapieverlauf ab („Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.2, 2017, AWMF Registernummer: 043/017OL“). Teil der erhobenen Parameter sind unter anderem Tumorgröße, das Vorhandensein von Tumornekrosen, mikrovaskulären Einbrüchen und eine sarkomatoide Differenzierung. Die einzelnen Tumorcharakteristika sind dabei mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Die Prognose-Scores scheinen insgesamt dennoch aussagekräftiger als einzelne Tumorcharakteristika zu sein (Cheville et al., 2001) (Klatte et al., 2007) (Sengupta et al., 2005) (Dall’Oglio et al., 2007) (Cangiano et al., 1999). Da die Metastasierungswahrscheinlichkeit aber gerade mit Zunahme der Tumorgröße steigt, ist eine frühzeitige Diagnosestellung wichtig (Thompson et al., 2009).

Für die systemische Therapie beim metastasierten klarzelligem NZK kommen weder die klassische Chemotherapie noch die Immuntherapie aufgrund zu geringen Ansprechens in Frage (Amato, 2000). In den aktuellen Leitlinien wird eine Erstlinientherapie mit Sunitinib, Pazopanib oder Bevacizumab und Interferon- $\alpha$  für das metastasierte klarzellige NZK mit niedrigem oder mittlerem Risiko empfohlen. Für Patienten mit ungünstigerem Risikoprofil wird hingegen die Therapie mit Temsirolimus empfohlen („Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.2, 2017, AWMF Registernummer: 043/017OL“).

### 2.1.6 Metastasierung

Die Metastasierung des Nierenzellkarzinoms erfolgt überwiegend hämatogen. Einen Überblick zum hämatogenen Metastasierungsweg zeigt Abbildung 3. Metastasen finden sich vor allem in Lunge (60%) (Cozzoli et al., 1995) (Flanigan et al., 2003), Knochen (Kollender et al., 2000), Leber, Nebenniere, kontralaterale Niere, Gehirn und Retroperitoneum (Flanigan et al., 2003).



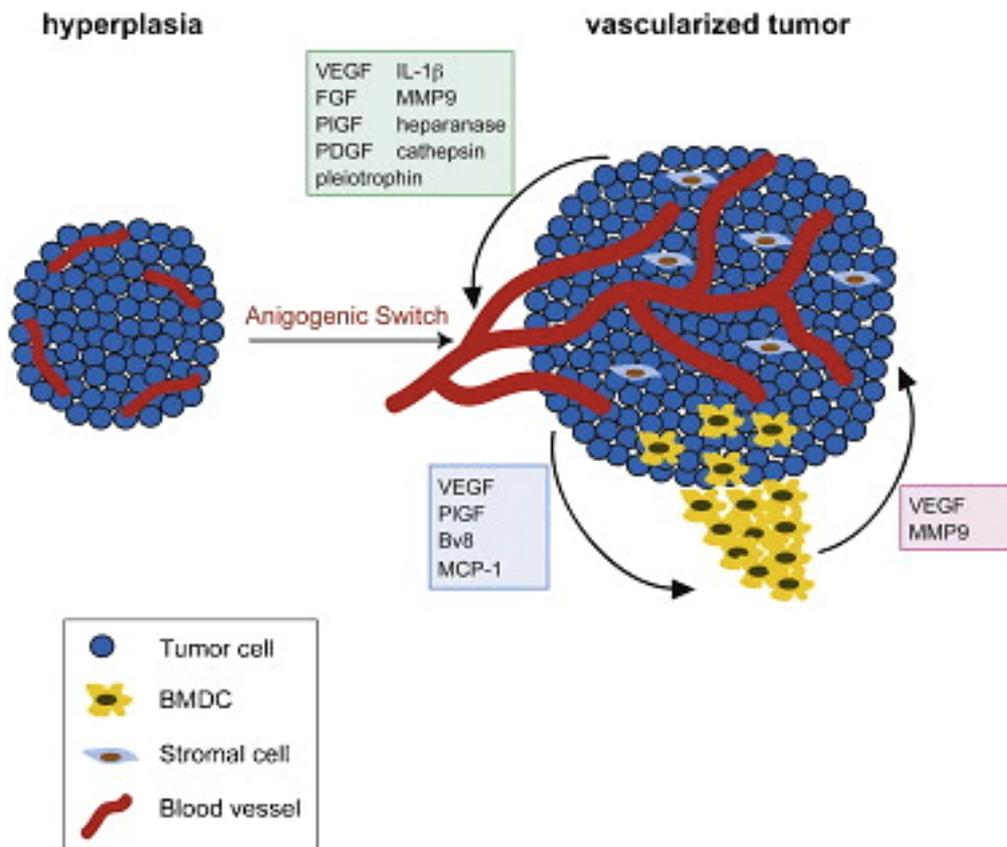
**Abbildung 3: Übersicht zur Fernmetastasierung von Tumoren (aus Hunter et al., 2008).**

Voraussetzung für die Metastasierung ist eine Proliferation und Ausbreitung des Primarius mit konsekutiver Durchbrechung der Basalmembran ins umliegende Gewebe bis der Tumor schließlich Blut- oder Lymphgefäße erreicht. Folglich kommt es zur Ausschwemmung einzelner Tumorzellen über das Blut- bzw. Lymphsystem in andere Organe.

Im Rahmen der Neoangiogenese erlangen die Tumorzellen durch tumoreigene Mediatoren Zugang zu neu sprießenden Gefäßen. Dadurch kommt es über die Nährstoffversorgung zu einer Größenprogredienz und schließlich über Extravasation ins umliegende Gewebe und eine Proliferation der Zellen zu neuer Metastasierung (Hunter et al., 2008). Die Tumorneoangiogenese wird im Folgenden nochmals näher beschrieben.

## 2.2 Grundlagen der Tumorneoangiogenese

Die Tumorneoangiogenese beschreibt den Vorgang der Gefäßneubildung in soliden Tumoren. Kleine Tumoren werden zunächst durch Diffusion versorgt. Mit zunehmender Größe wird eine eigene Gefäßversorgung benötigt. Diese Veränderung von Diffusion hin zur Gefäßneubildung wird in der Literatur als „angiogenic switch“, also angiogener Wechsel (siehe Abbildung 4) bezeichnet und von einer Reihe von molekularen Veränderungen begleitet (Baeriswyl and Christofori, 2009).



**Abbildung 4:** „Angiogenetischer Wechsel“ im Krebsmausmodell. (Baeriswyl and Christofori, 2009). **Grüne Box:** durch Tumorzellen ausgeschüttete pro-Angiogenese Faktoren und Proteasen; **rosa Box:** Zellen des Immunsystem, die zum Tumor rekrutiert werden; **blaue Box:** vom Tumor sezernierte Faktoren zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen.

Wie bereits erwähnt, ist zu Beginn der Tumor noch klein genug, um durch reine Diffusion versorgt zu werden. Im Verlauf weiteren Wachstums reicht die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie die Entsorgung der Stoffwechselprodukte durch Diffusion nicht mehr aus. Der Tumor schüttet daraufhin proangiogenetische Faktoren und Matrix-Metalloproteasen aus (vgl. Abbildung 4). Außerdem werden inflammatorische Mediatoren ausgeschüttet und pro-inflammatorische Zellen wie z.B. BMDCs akquiriert, die ihrerseits weitere proangiogenetische Faktoren und Matrix-Metalloproteasen ausschütten. In der Folge überwiegen Proangiogenesefaktoren, sodass es in der Folge zur Gefäßproliferation in den Tumor kommt (Baeriswyl and Christofori, 2009).

Es wird vermutet, dass CD31 (PECAM1) bei der Neoangiogenese eine wichtige Rolle für die Barrierefunktion von Gefäßen spielt (Ren et al., 2015). CD31 ist ein Protein, welches unter anderem an den Endothelzellgrenzen (Ferrero et al., 1995) exprimiert wird und damit in jedem Gefäß nachzuweisen ist (Xie and Muller, 1996).

## 2.3 Prostata-spezifisches Membran-Antigen PSMA

PSMA (Prostata-spezifisches Membran-Antigen, weitere Synonyme sind Glutamat-carboxypeptidase II, NAALADase I = N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamatpeptidase I, Folat- hydrolase I) ist ein Transmembranglykoprotein, welches nicht nur in gesundem Prostatagewebe vorkommt, sondern auch in Tumorentitäten wie dem Prostatakarzinom (Chang, 2004). Anders als der Name vermuten lässt, wird PSMA auch in anderen Tumorarten gefunden. Im Prostatakarzinom wird PSMA von den Tumorzellen selbst (Silver et al., 1997), im klarzelligen Nierenzellkarzinom hingegen von Endothelzellen exprimiert (Baccala et al., 2007). Außerdem kann es in den proximalen Tubuli des gesunden Nierengewebes nachgewiesen werden (Lopes et al., 1990). PSMA ist eine membranständige Folat-Hydrolase (Pinto et al., 1996), deren Funktion in den einzelnen Geweben noch wenig bekannt ist (siehe Abbildung 5). Vermutlich ist PSMA an unterschiedlichen Abläufen in der Zelle beteiligt. So ist es zum Beispiel an der Nährstoffaufnahme, Zellmigration und Signaltransduktion beteiligt und fungiert außerdem als Rezeptor (Rajasekaran et al., 2005). Für die Metastasendiagnostik des Prostatakarzinoms wird das PSMA als Marker für ein PET-CT bereits im klinischen Alltag angewendet (Rowe et al., 2016).

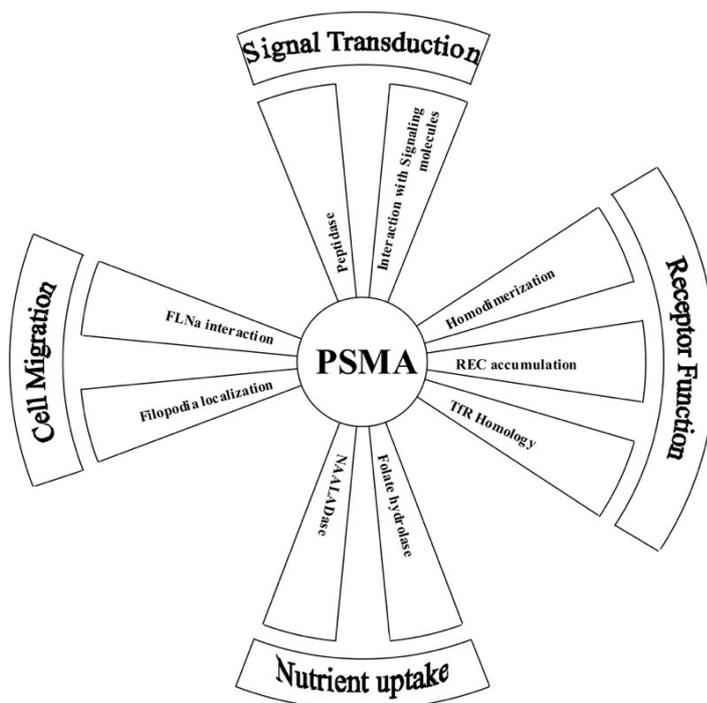


Abbildung 5: Diskutierte Funktionen des PSMA (aus Rajasekaran et al., 2005).

### 2.3.1 Klinische Bedeutung von PSMA in der Diagnostik und Therapie

#### 2.3.2 Prostatakarzinom

Für das Prostatakarzinom gibt es diagnostische und therapeutische Ansätze mit PSMA. Allerdings werden diese bis jetzt nur im Rahmen von Studien an kleinen Patientenkollektiven durchgeführt. Diagnostisch wird das PSMA-PET/CT für das nicht-invasive präoperative Staging und die Tumorcharakterisierung des Prostatakarzinoms genutzt sowie zur Therapiekontrolle beim metastasierten Prostatakarzinom (Rowe et al., 2016). Bei der Radionuklidtherapie wird PSMA als (177)Lu-PSMA-617-markiertes Radionuklid intravenös appliziert und dann von PSMA-positivem Gewebe aufgenommen, was bei der Mehrzahl der Patienten zu einer Reduktion des PSA-Gehalts und zur Tumorremission führt (Kratochwil et al., 2016) (Baum et al., 2016).

#### 2.3.3 Nierenzellkarzinom

Neben dem Einsatz beim Prostatakarzinom wird für PSMA auch ein Einsatz in der Diagnostik des NZK diskutiert. Erste Publikationen konnten zeigen, dass ein PSMA-PET/CT im Vergleich zum gewöhnlichen CT mehr Metastasen beim klarzelligen NZK erkennt (Gorin et al., 2017) (Rowe et al., 2015).

### 3 Zielstellung

Die Prognose des NZK ist durch das Auftreten von Fernmetastasen bestimmt. Da die 5-Jahres-Überlebensrate des Nierenzellkarzinoms stark vom Tumorstadium abhängig ist (97 % Stadium I, 87 % Stadium II, 69 % Stadium III, 14 % im Stadium IV), ist eine frühzeitige Erkennung von Fernmetastasen wichtig. Zurzeit wird intensiv nach einem bildgebenden Verfahren gesucht, das sensitiver als das gängige CT/MRT ist. Um festzustellen, ob ein PSMA-PET-CT eine sinnvolle Untersuchung zur Detektion von Metastasen darstellen könnte, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob PSMA im klarzelligen NZK exprimiert wird.

Hierzu sollten folgende Aufgabenstellungen bearbeitet werden:

1. Etablierung einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung zur Analyse der PSMA-Expression in CD31 exprimierenden Endothelzellen.
2. Analyse der Expression von PSMA in Nierenzellkarzinomen und deren Metastasen anhand folgender Gesichtspunkte:
  - a. Wird PSMA in Endothelzellen des Nierenzellkarzinoms exprimiert?
  - b. Korreliert die Expression im Primärtumor mit klinisch-pathologischen Daten?
  - c. Unterscheidet sich die PSMA-Expression zwischen metastasierten und nicht metastasierten Tumoren?
  - d. Wird PSMA in Endothelzellen von Metastasen exprimiert?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben

**Tabelle 5: Charakterisierung der verwendeten Prostatakarzinome**

PatientenID	pT	Gleason-Score
P1	3a	3+4 (7)
P2	3b	4+3 (7)
P3	3a	3+3 (6)
P4	2c	4+3 (7)
P5	3a	3+4 (7)
P6	2a	3+4 (7)
P7	3b	4+5 (9)
P8	unbekannt	unbekannt
P9	3	3+4 (7)
P10	3a	4+5

**Tabelle 6: Charakterisierung der verwendeten kzNZK**

		Nicht-metastasiert	Metastasiert
<b>Alter in Jahren bei OP</b>	Minimum	49	41
	Maximum	83	80
	Median	62,00	69,50
<b>Geschlecht</b>	Männlich	17	24
	Weiblich	10	6
<b>Staging</b>	pT1	23	11
	pT2	1	2
	pT3	3	14
	pT4	0	3
	Gesamt	27	30
<b>Grading</b>	G1	0	2
	G2	20	20
	G3	1	7
	GX	6	1

**Tabelle 7: Charakterisierung der verwendeten Fernmetastasen**

<b>Primärtumor</b>	<b>Metastasen</b>	<b>Lokalisation</b>
N6	M6	Lunge
	M7	Lymphknoten Lunge
N8	M8	Nebenniere
	M9	Nebenniere
	M10	Lymphknoten Lunge
N15	M11	Lymphknoten
N16	M12	Lunge
	M13	Niere
N19	M14	Niere
	M15	Haut
N22	M16	unbekannt
N24	M17	Knochen
N26	M18	unbekannt

Alle Patientinnen und Patienten, deren Gewebeproben in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden im Universitätsklinikum des Saarlandes aufgrund eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms nephrektomiert und haben sich mit der Weiterverwendung ihrer Gewebeproben einverstanden erklärt. Die Einstufung der Tumoren erfolgte durch das pathologische Institut des Universitätsklinikums des Saarlandes anhand der histologischen Paraffinschnitte nach der WHO-Klassifikation der TNM-Klassifikation.

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 57 Primärtumore vom histologischen Subtyp kzNZK und 18 Metastasen untersucht, davon 13 gepaarte Metastasen, deren Primärtumore ebenfalls ausgewertet wurden. Für fünf der verwendeten Metastasen konnten die zugehörigen Primärtumoren nicht untersucht werden, da sie im pathologischen Institut nicht vorhanden waren. Für die Etablierung der Färbemethode wurden 10 Prostatakzinome verwendet. Die Beschreibung des Patientenkollektivs findet sich in den Tabellen 5-7.

## 4.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Zur Bestimmung von Tumor- und Normalanteil an den Gewebeproben wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die in Paraffin eingebetteten Nierenzellkarzinome 2 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger überführt. Anschließend erfolgte die Vorbereitung durch Entparaffinieren und Rehydratisieren (siehe Kapitel 3.3.1). Hiernach wurden die Gewebeschnitte für 10 min in Mayers's Hämatoxylin angefärbt (Färbung der Zellkerne), dann für einige Sekunden mit Leitungswasser gespült und in einer Lösung aus 70% Ethanol und 1% HCl für 5 s differenziert. Es

folgte ein dreiminütiger Spülschritt in lauwarmem Leitungswasser zum Bläuen der Kerne. Zur Färbung des Zellplasmas wurde mit Eosin gefärbt und ein weiteres Mal in Leitungswasser gespült. Zum Dehydratisieren der Gewebeschnitte wurden diese für jeweils einige Sekunden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (ddH<sub>2</sub>O, 70% Ethanol, 99% Ethanol) und abschließend für 3x5 min in Xylol inkubiert und mit VectaMount Einbettmedium eingebettet.

### 4.3 Lösungen und Materialien

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die in Tabelle 8 aufgelisteten Reagenzien verwendet.

**Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Reagenzien für die Immunfluoreszenzfärbung**

Lösungen	Zutaten	Endkonzentration
Fixierlösung		
Methanol	Methanol	100%
PFA	Paraformaldehyd	4% (m/v)
PBS	NaCl	137mM
	KCl	2,7mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2mM
Re- & Dehydratisierung		
Xylol	Xylol	100% (v/v)
Ethanol	Ethanol	>99% (v/v)
Demaskierungspuffer		
Tris/EDTA-Puffer	Tris	10mM
	EDTA	1mM
	Tween 20	0,05% (v/v)
Blocklösung		
	Tris	50mM
	BSA	3% (m/v)
	FKS	20% (v/v)

10x TBS-Tween	Tris	248mM
	NaCl	1,37M
	Tween 20	1% (v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	TBS-Tween	1x
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3%
AK-Verdünnungslösung	TBS-Tween	1x
	BSA	0,3% (m/v)
	Antibody Diluent (Dako; S0809)	
Einbettmedium	VectaMount (Vector Laboratories.; H-5000)	
	VectaSHIELD HardSet + DAPI (Vector Laboratories; H-1500)	
Eosin	2% Eosin in ddH <sub>2</sub> O, pH 4-6 mit Essigsäure eingestellt	

#### 4.4 Geräte und Hilfsmittel

- Wärmeschrank & Wasserbad
- Küvetten
- Feuchtkammer
- EnVision + Dual Link System-HRP (DAB+) (Dako; K4065)
- Dako Pen (Dako; S2002)
- Mikroskop

#### 4.5 Nachweis von PSMA und CD31 mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Um an den FFPE Gewebeschnitten die Expression von PSMA und CD31 mit spezifischen AK nachweisen zu können, wurden die Gewebe entparaffiniert und rehydratisiert, da die AK-Reaktion nur in wässriger Lösung stattfinden kann. Dafür wurden die Gewebeproben zunächst für 30 min im Wärmeschrank bei 65°C erwärmt, dann für 3x5 min in Xylol entparaffiniert und im Anschluss in einer

absteigenden Alkoholreihe wieder rehydratisiert (jeweils 2x1 min in 99%igem Ethanol, 70%igem Ethanol und doppelt destilliertem Wasser).

Zur Freilegung der durch die Formalinfixierung blockierten AK-Bindungsstellen erfolgte eine Antigen Demaskierung in einem auf 95°C vorgewärmten Demaskierungspuffer für 30 min. Die Schnitte wurden im Puffer auf 65°C abgekühlt und im Anschluss 5 min in TBS-Tween gewaschen. Zum Besetzen unspezifischer Bindungsstellen wurde mit Blocklösung bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit den zwei Primärantikörpern (Monoclonal Mouse, Anti-Human, Prostate-Specific Membrane Antigen, Clone 3E6 von Dako und Rabbit polyclonal to CD31, Anti-CD31 antibody ab28364 von abcam) in Antikörperverdünnungslösung (Verdünnung je 1:50) bei Raumtemperatur für 30 min. Es folgten drei Waschschrte mit TBS-Tween für jeweils 5 min, anschließend die Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG; Alexa Fluor 594-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG) in Verdünnungslösung (Verdünnung je 1:500) und zum Schluss nochmals 3 Waschschrte für je 5 min mit TBS-Tween. Zum Einbetten wurde das Einbettmedium VectaSHIELD verwendet, welches den Fluoreszenzfarbstoff DAPI enthält, um die in den Zellkernen enthaltene DNA zu färben.

## 4.6 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Daten wurde das Statistikprogramm SPSS in der Version 23 verwendet. Zur Erstellung der Abbildungen wurde Microsoft Power Point 2008 in der Version 12.0 (071130) verwendet. Folgender Score wurde zur Quantifizierung der PSMA-Expression in Bezug auf CD31-positive Endothelzellen in den einzelnen Immunfluoreszenzschnitten verwendet:

**Tabelle 9: Auswertungsscore zur Quantifizierung der PSMA- und CD31-Expression**

Score	1	2	3	4
<b>PSMA-Expression im Bezug auf CD31-positive Endothelzellen</b>	≤ 25%	26-50%	51-75%	> 75%

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Etablierung der Fluoreszenzdoppelfärbung

Die Etablierung der Doppelfärbung zum Nachweis von PSMA- und CD31-positiven Zellen wurde an Prostatakarzinomen durchgeführt, da PSMA hier bereits ein bekannter Epithelzellmarker ist. Hierzu wurden zunächst Einzelfärbungen an Prostatakarzinomgeweben durchgeführt, um Inkubationszeiten und Antikörperverdünnungen zu optimieren und im Anschluss das Protokoll für die Doppelfärbung festgelegt.

Für die Inkubation mit den Primärantikörpern anti-PSMA-IgG und anti-CD31-IgG wurde eine Verdünnung von 1:50 in Antikörperverdünnungslösung bei Raumtemperatur für 30 min gewählt, da die Färbung mit stärker verdünnter Primärantikörperlösung zu einer unzureichenden Färbung führte. Für die Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern ergab eine Verdünnung von je 1:500 eine optimale Färbung. Abbildung 6 zeigt ein Beispiel für die Immunfluoreszenzfärbung mit je einem Einzelbild zu den verschiedenen Färbungen und an unterster Stelle das überlagerte Bild, auf dem die PSMA/CD31-Expression zu erkennen ist. Außerdem wurde für jeden Tumor eine Färbung nur mit dem Sekundärantikörper durchgeführt.

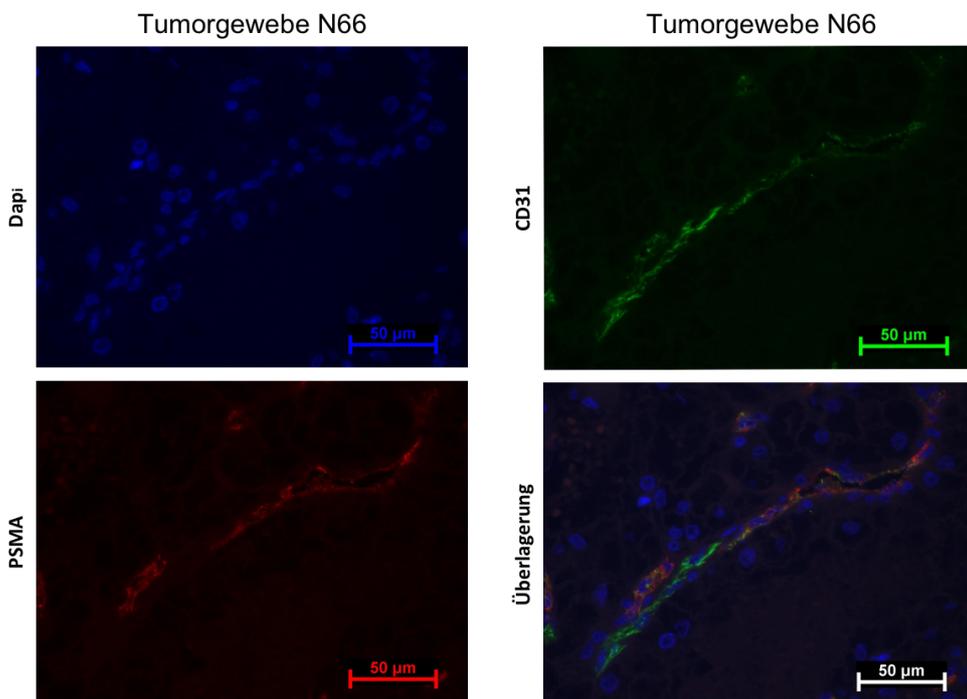


Abbildung 6: Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung (Zellkerne Dapi blau, PSMA rot, CD31 grün)

## 5.2 Expression von PSMA im Prostata- und Nierenzellkarzinom

### 5.2.1 PSMA-Expression im Prostatakarzinom

Abbildung 7 zeigt exemplarisch vier gefärbte Prostatakarzinome. Rot und damit PSMA-positiv sind die Epithelzellen in den Tumorarealen, in grün sichtbar die CD31-positiven Endothelzellen der Gefäße. In allen Prostatakarzinomen konnte PSMA und CD31 nachgewiesen werden.

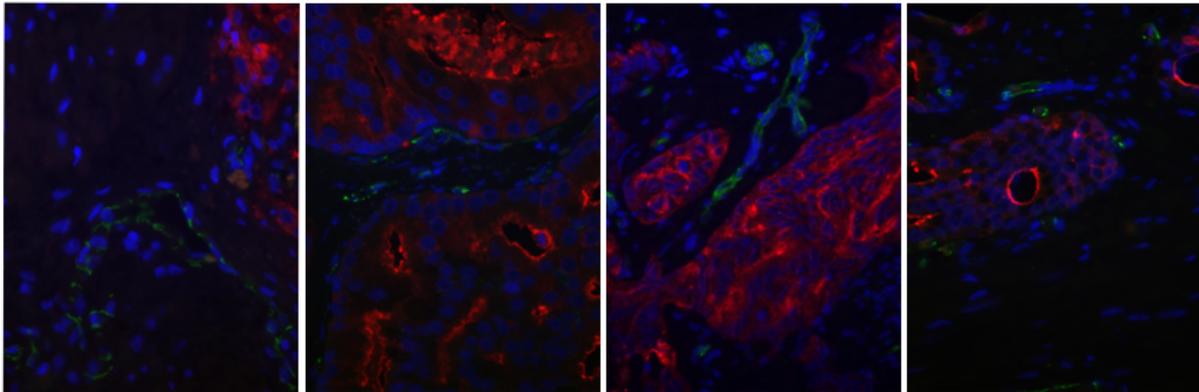
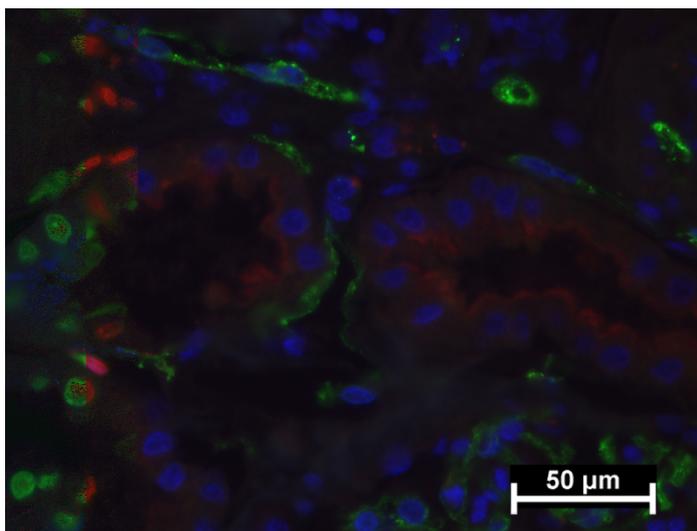


Abbildung 7: PSMA/CD31-Expression in Prostatakarzinomen

### 5.2.2 PSMA-Expression im gesunden Nierengewebe und im Nierenzellkarzinom

Im Anschluss wurden 57 kzNZK mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Im gesunden Nierengewebe zeigten sich die Gefäße sowie Glomeruli CD31-positiv. PSMA-positiv waren einige Tubuli. In

Abbildung 8 ist sowohl gesundes Nierengewebe mit PSMA-positiven Tubuli (rot) und CD31-positiven



Glomeruli und Gefäßen (grün) zu sehen. Eine Koexpression von PSMA und CD31 trat nicht auf. Im Tumorgewebe der kzNZK zeigte sich eine positive CD31-Färbung an den Endothelzellen.

Abbildung 8: Gesundes Nierengewebe mit zwei PSMA-positiven Tubuli und CD31-positiven Gefäßen

Im Tumorgewebe der kzNZK zeigte sich eine positive CD31-Färbung an den Endothelzellen der Gefäße. PSMA-positiv waren ebenfalls Gefäße des Tumors, jedoch nicht alle. Zur quantitativen Auswertung wurde im Verlauf ein Score verwendet, der angibt, wie viele CD31 positive Endothelzellen auch PSMA positiv waren. Eine Doppelfärbung mit PSMA und CD31 konnte in 50 von 57 Fällen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9). In Abbildung 10 ist das Ergebnis der Doppelfärbung an kzNZK zu sehen.

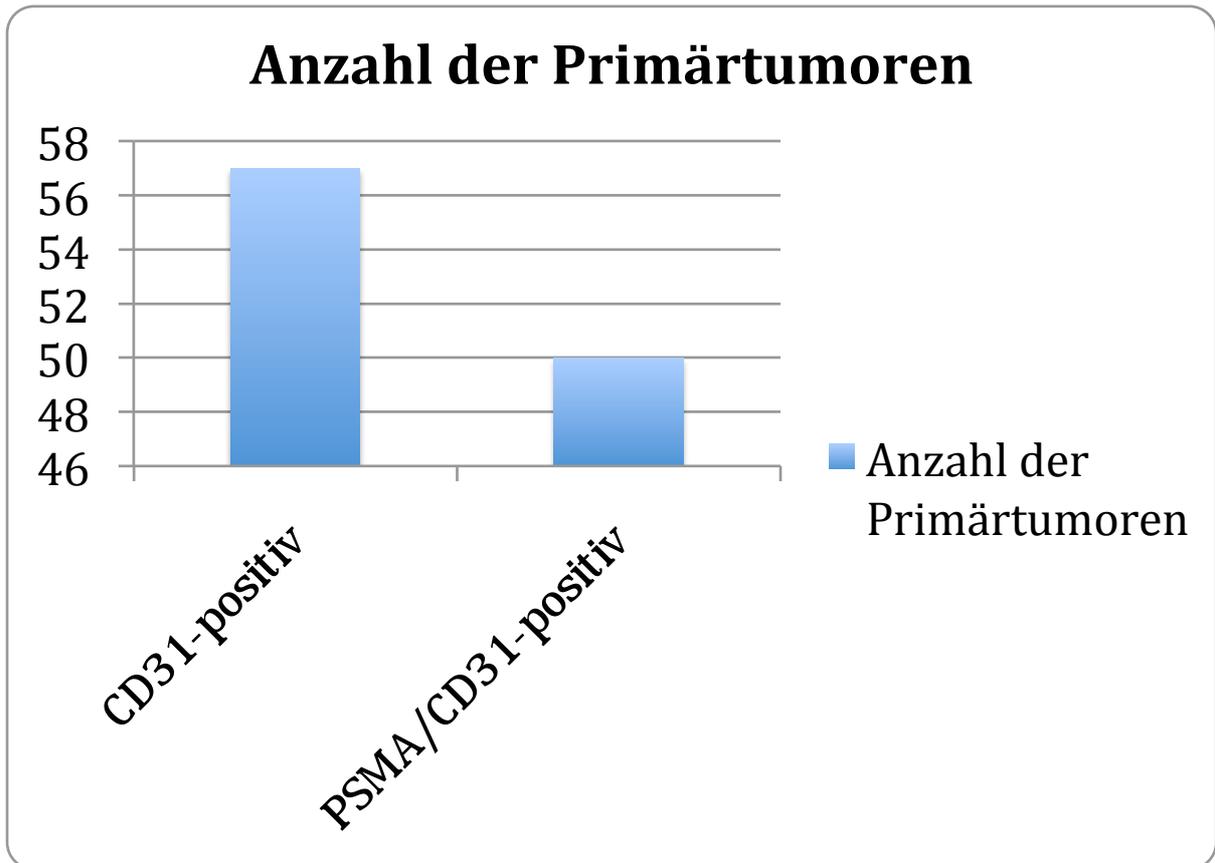


Abbildung 9: Anzahl der Primärtumoren mit CD31-positiven Zellen und mit Doppelsexpression (PSMA und CD31)

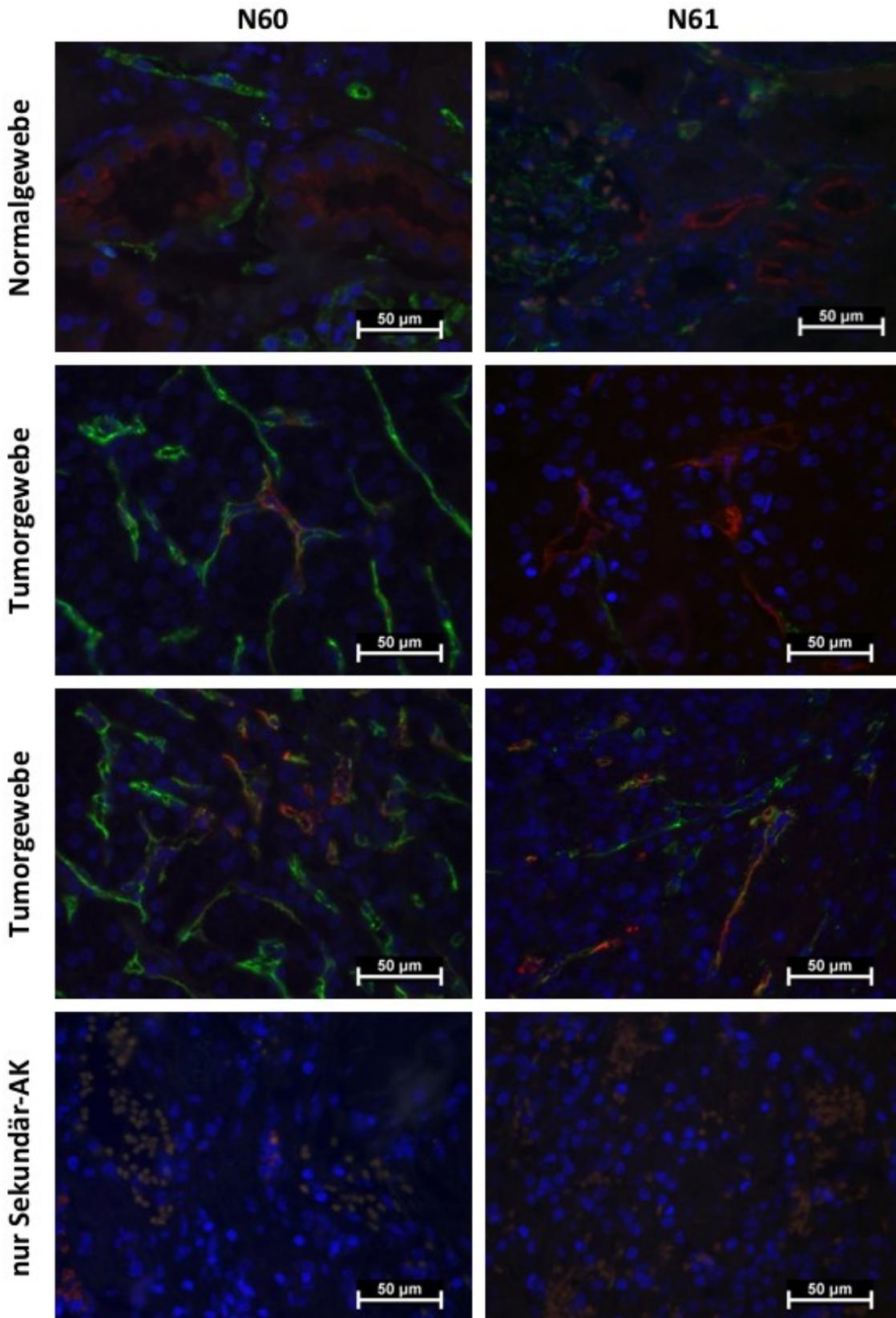
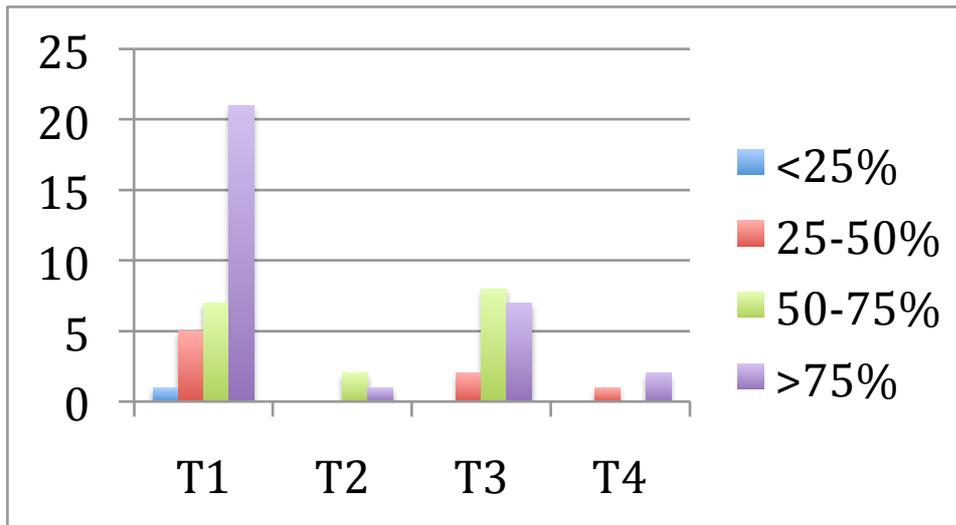


Abbildung 10: PSMA/CD31 Immunfluoreszenzdoppelfärbung im gesunden Anteil sowie im Tumorgewebe, an unterster Stelle Färbung mit Sekundär-AK (Autofluoreszenz)

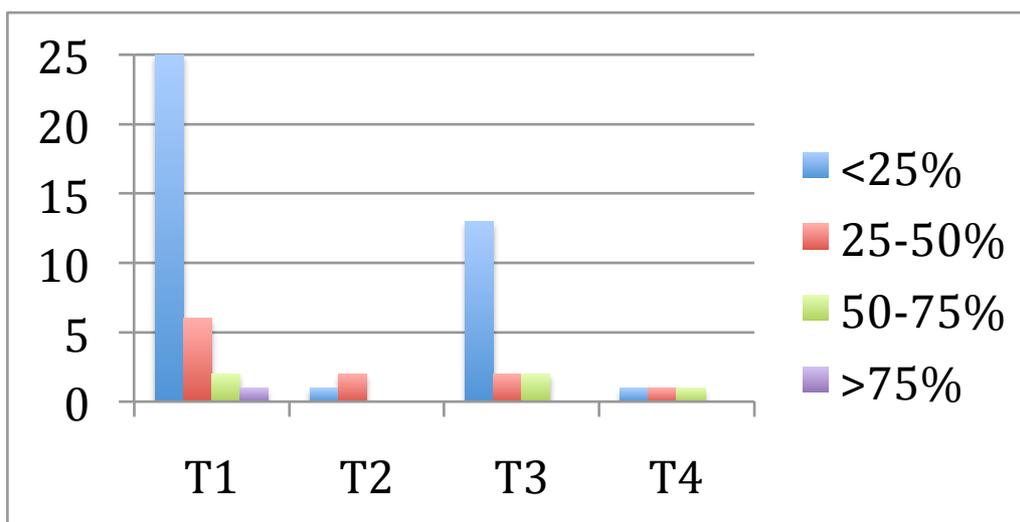
### 5.2.3 Korrelation von PSMA zu klinisch-pathologischen Parametern

Um zu untersuchen, ob PSMA in Abhängigkeit des Tumorstadiums oder des histologischen Grades exprimiert wird, wurden diese Parameter mit der PSMA/CD31-Expression in den jeweiligen Schnitten korreliert. Es wurde ein vierstufiger Score gewählt, anhand dessen die Auswertung jedes Schnittes erfolgte. Zunächst wurde der reine Anteil CD31 in den unterschiedlichen T-Kategorien untersucht (Abbildung 11). Dies ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen T-Stadium und Gefäßdichte (Exakter Fisher-Test = 0,43).



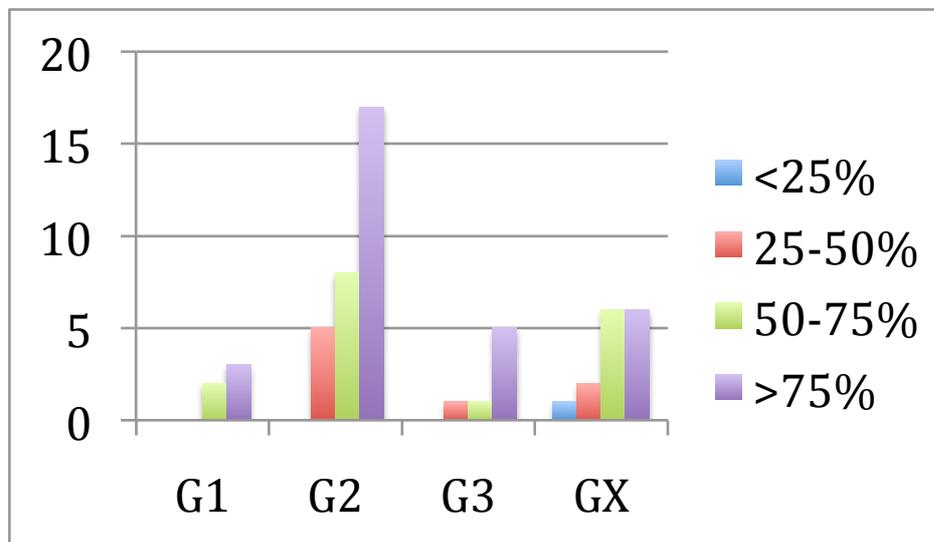
**Abbildung 11: Anteil CD31 in den Primärtumoren bezogen auf das T-Stadium**

Auch die Korrelation der PSMA/CD31-Expression zu den T-Kategorien ergab mit einem p-Wert von 0,19 im Exakten Fisher-Test kein signifikantes Ergebnis (Abbildung 12).



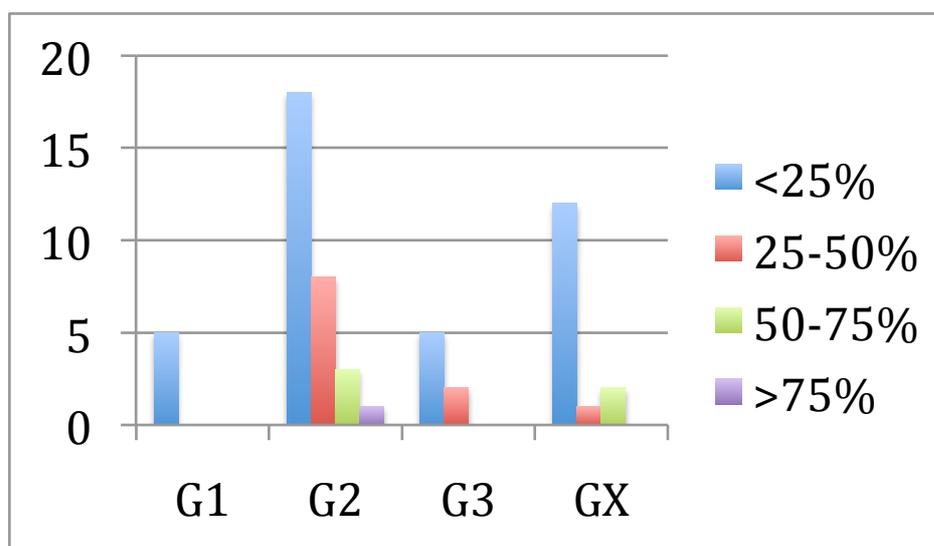
**Abbildung 12: Anteil von PSMA/CD31 in den Primärtumoren bezogen auf das Tumorstadium**

Im Anschluss wurde der reine Anteil CD31 mit den unterschiedlichen histologischen Graden korreliert. Dies ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen histologischem Grad und Gefäßdichte (Exakter-Fisher-Test= 1,0) (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: Anteil von CD31 in den Primärtumoren bezogen auf den histologischen Grad**

Auch die Korrelation der PSMA/CD31-Expression zu den histologischen Graden ergab mit einem p-Wert von 0,89 im Exakten Fisher-Test kein signifikantes Ergebnis (siehe Abbildung 14).

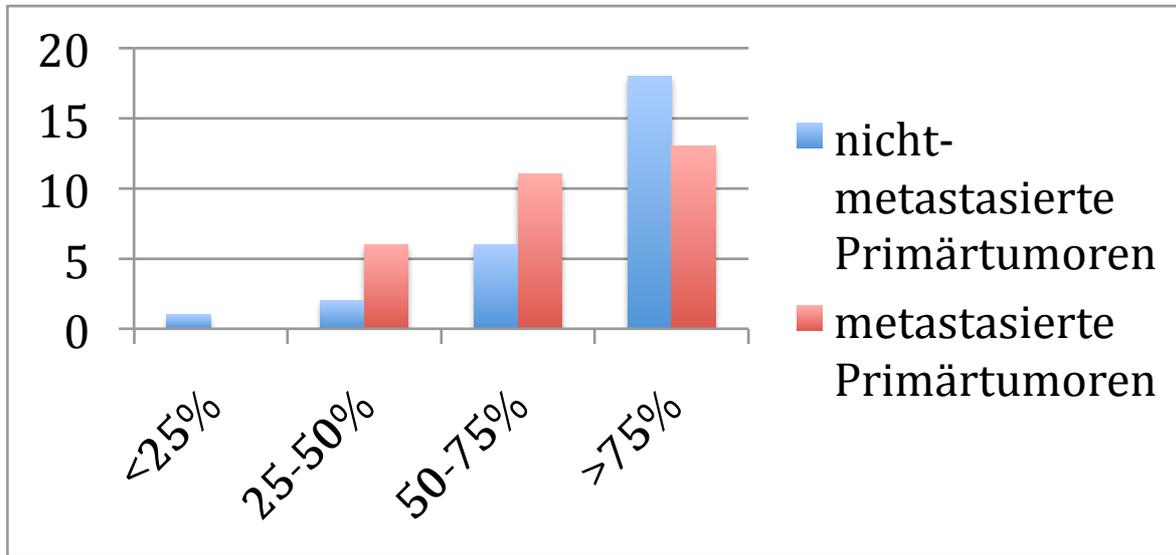


**Abbildung 14: Anteil von PSMA/CD31 in den Primärtumoren bezogen auf den histologischen Grad**

#### 5.2.4 PSMA-Expression im Vergleich zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren

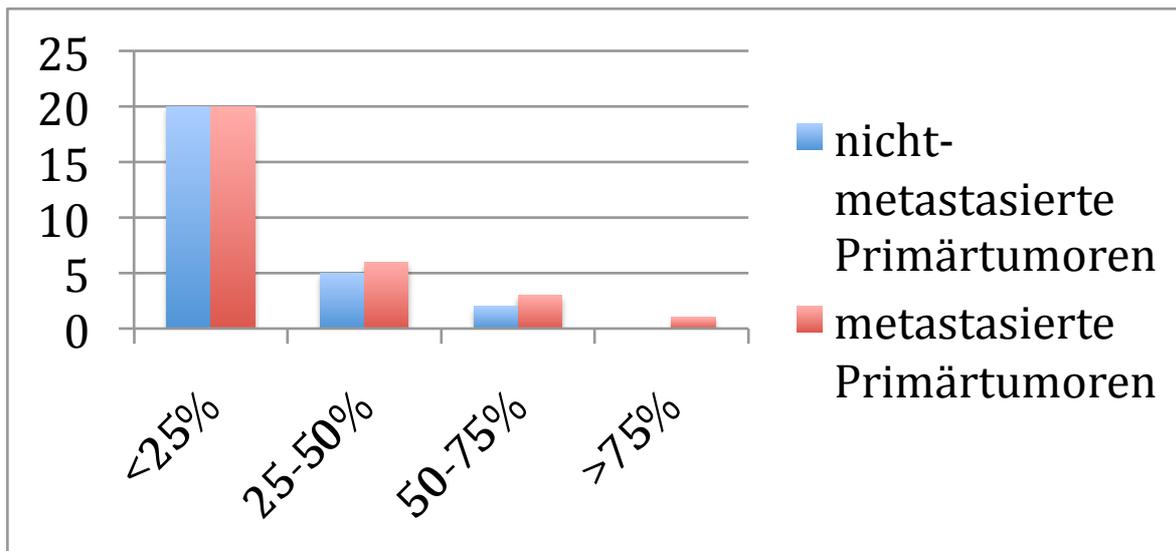
Um festzustellen, ob es Unterschiede in der PSMA- und CD31-Expression hinsichtlich des Metastasierungsverhaltens gibt, wurden 27 nicht-metastasierte mit 30 metastasierten Primärtumoren

verglichen. Hinsichtlich der Blutgefäßdichte (CD31-Expression) konnte zwischen nicht-metastasierten und metastasierten Tumoren kein Unterschied festgestellt werden (Exakter Test nach Fisher,  $p=0,71$ ). Insgesamt war die Blutgefäßdichte sowohl bei den nicht-metastasierten als auch bei den metastasierten kzNZK hoch (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15: CD31-Expression im Bezug auf den Metastasierungsstatus der Primärtumoren**

Beim Anteil PSMA-exprimierender Endothelzellen zeigte sich jedoch eine Zunahme bei metastasierten Tumoren. Der Anteil der Tumoren ohne Koexpression war bei den nicht-metastasierten Tumoren höher (26%) als bei den metastasierten Tumoren (3%). Allgemein nahm der Anteil der PSMA/CD31-Expression von den nicht-metastasierten zu den metastasierten Primärtumoren kaum zu (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16: PSMA/CD31-Expression in Bezug auf den Metastasierungsstatus in den Primärtumoren**

Zur besseren Veranschaulichung dieser Ergebnisse sind im nächsten Abschnitt beispielhafte Abbildungen von metastasierten und nicht-metastasierten kzNZK dargestellt. Die Abbildung 17-19 zeigen Immunfluoreszenzdoppelfärbungen an metastasierten und nicht-metastasierten Gewebeschnitten und den zugehörigen Anteilen mit gesundem Nierengewebe sowie die jeweiligen Kontrollfärbungen zur Darstellung der Autofluoreszenz. In den Gewebeproben mit Tumorgewebe ist die Doppelfärbung von PSMA und CD31 deutlich sichtbar, jedoch wird nicht an allen Endothelzellen auch PSMA exprimiert.

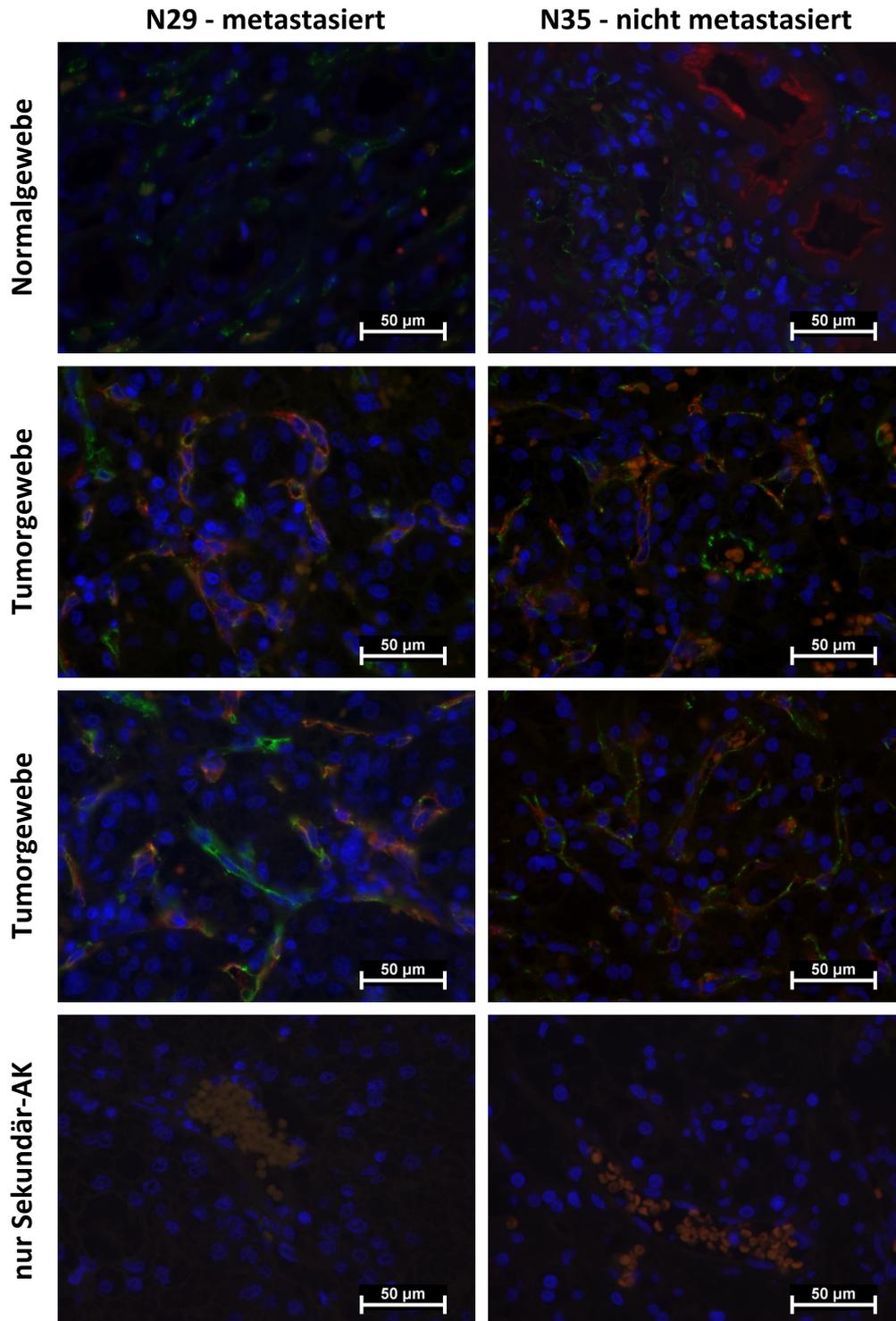


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung mit anti-PSMA- und anti-CD31-AK an einer metastasierten und einer nicht metastasierten Patientenprobe

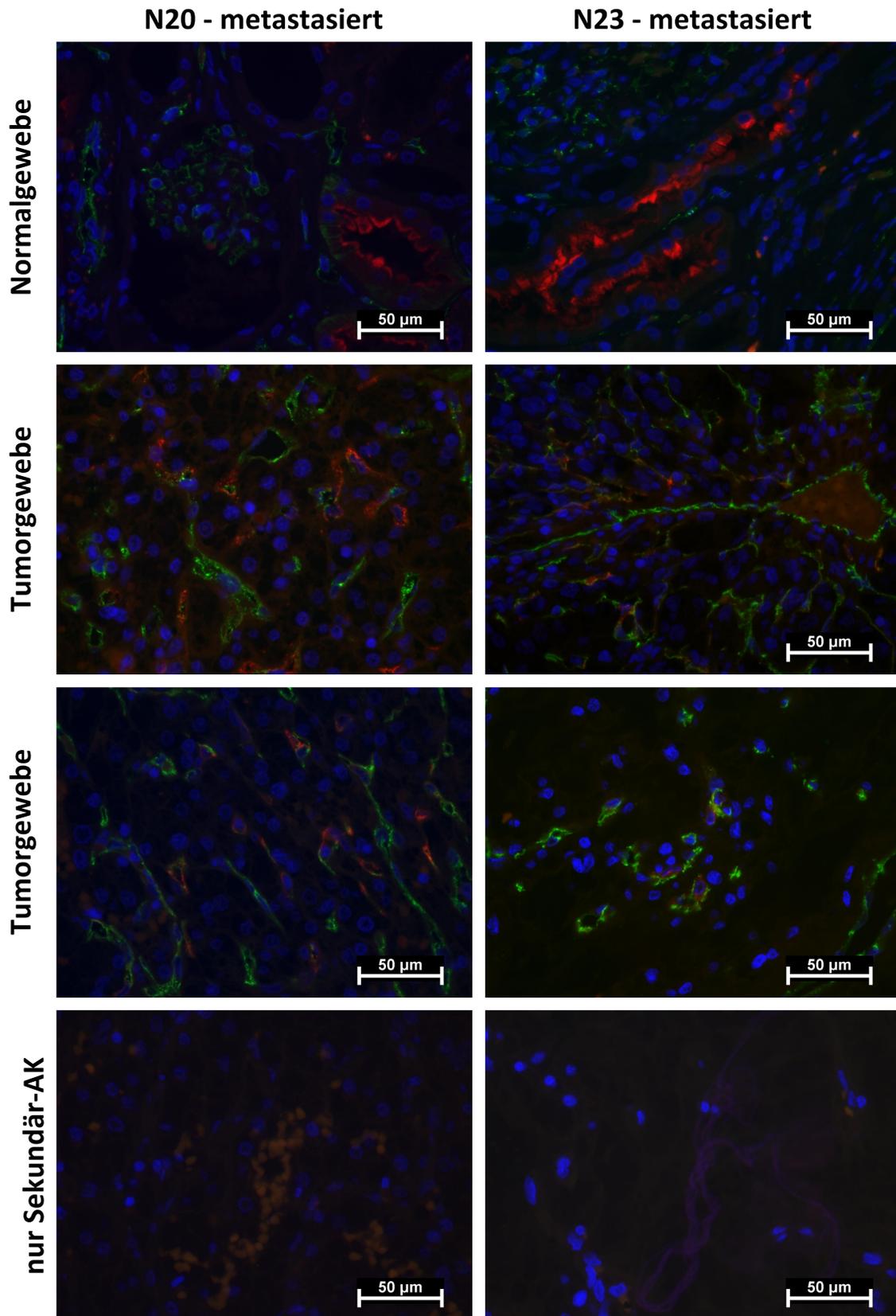


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung mit PSMA/CD31 an zwei metastasierten Nierenzellkarzinomen

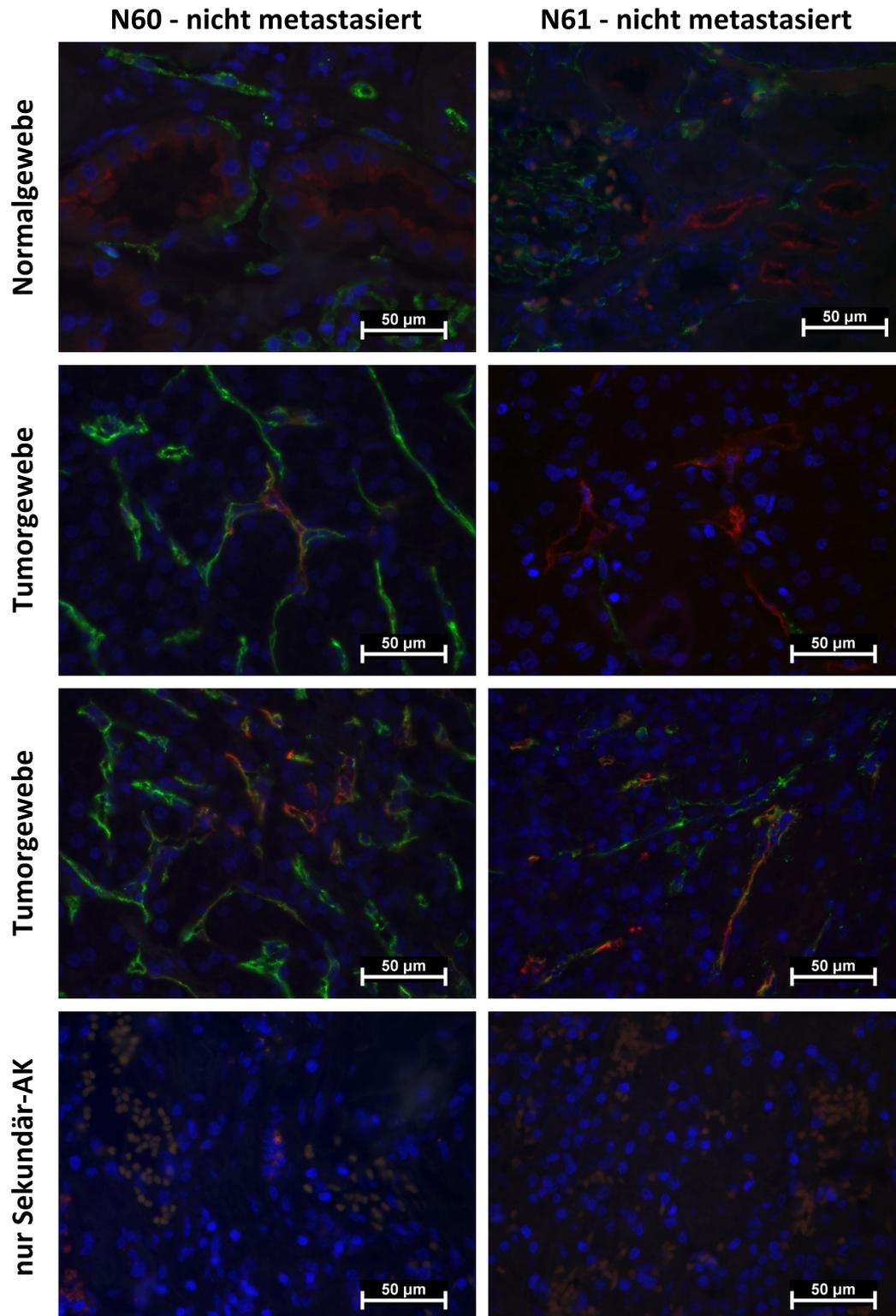


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung mit PSMA/CD31 an zwei nicht-metastasierten Nierenzellkarzinomen

### 5.2.5 PSMA-Expression in Metastasen

Als letzter Teilaspekt wurde untersucht, ob PSMA von Endothelzellen in Metastasengewebe von kzNZK exprimiert wird. In 16 von 18 untersuchten Metastasen fand sich eine Doppelfärbung von PSMA und CD31 (siehe Abbildung 20). 8 von 18 Metastasen hatten eine PSMA/CD31-Expression <25%, 6 von 18 eine Expression >75%. 3 Metastasen hatten eine PSMA/CD31-Expression dazwischen, folglich ist keine Aussage darüber zu treffen, ob Metastasen generell viel oder wenig PSMA exprimieren. In den Abbildungen 21-23 ist die Doppelfärbung in den gepaarten Metastasen und jeweils zugehörigen kzNZK dargestellt. Eine Expression von PSMA und CD31 konnte sowohl in den Tumor- als auch Metastasengewebeschnitten nachgewiesen werden, immer im Bereich von Endothelzellen. Abbildung 21 zeigt die Primärtumoren mit jeweils einer Metastase. In Abbildung 22 ist eine deutliche PSMA-Expression in allen zugehörigen Metastasen des Primärtumors N8 zu erkennen, im Falle N6 nur eine geringfügige. Zwei weitere Primärtumoren mit jeweils zwei zugehörigen Fernmetastasen sind in Abbildung 23 abgebildet, eine geringfügige Expression von PSMA ist auch hier zu erkennen.

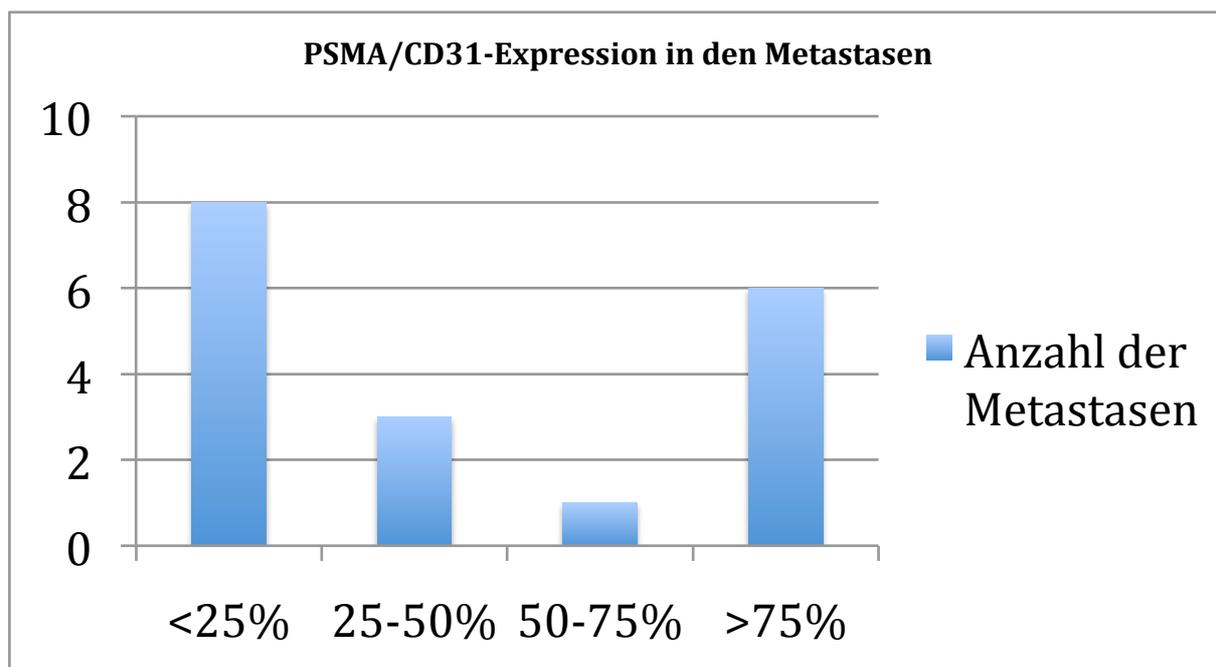


Abbildung 20: PSMA/CD31-Expression in den Metastasen

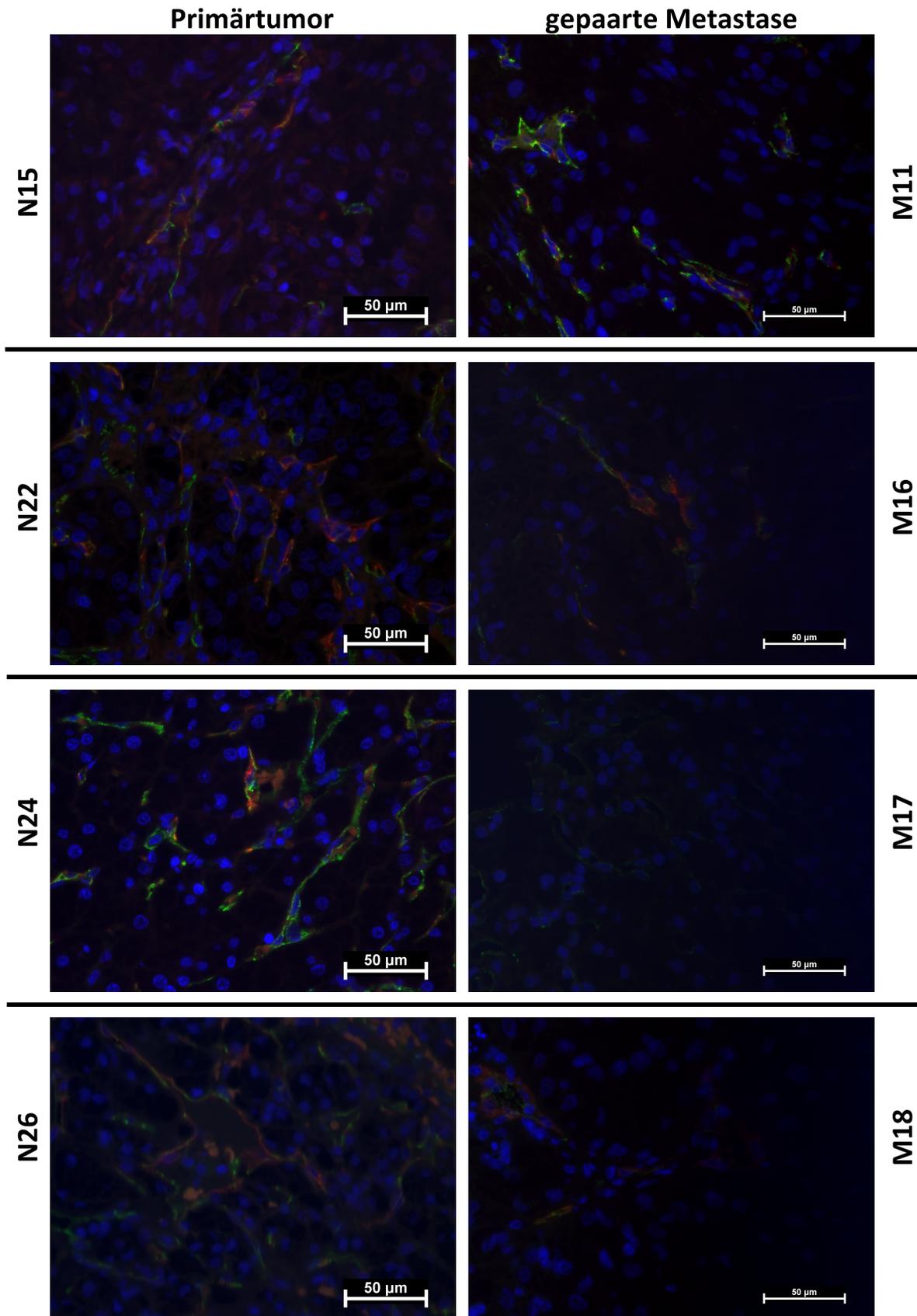


Abbildung 21: Primärtumoren, die jeweils eine Fernmetastase gebildet haben (geringfügige (M11, M16, M18) bzw. keine (M17) PSMA/CD31-Expression)

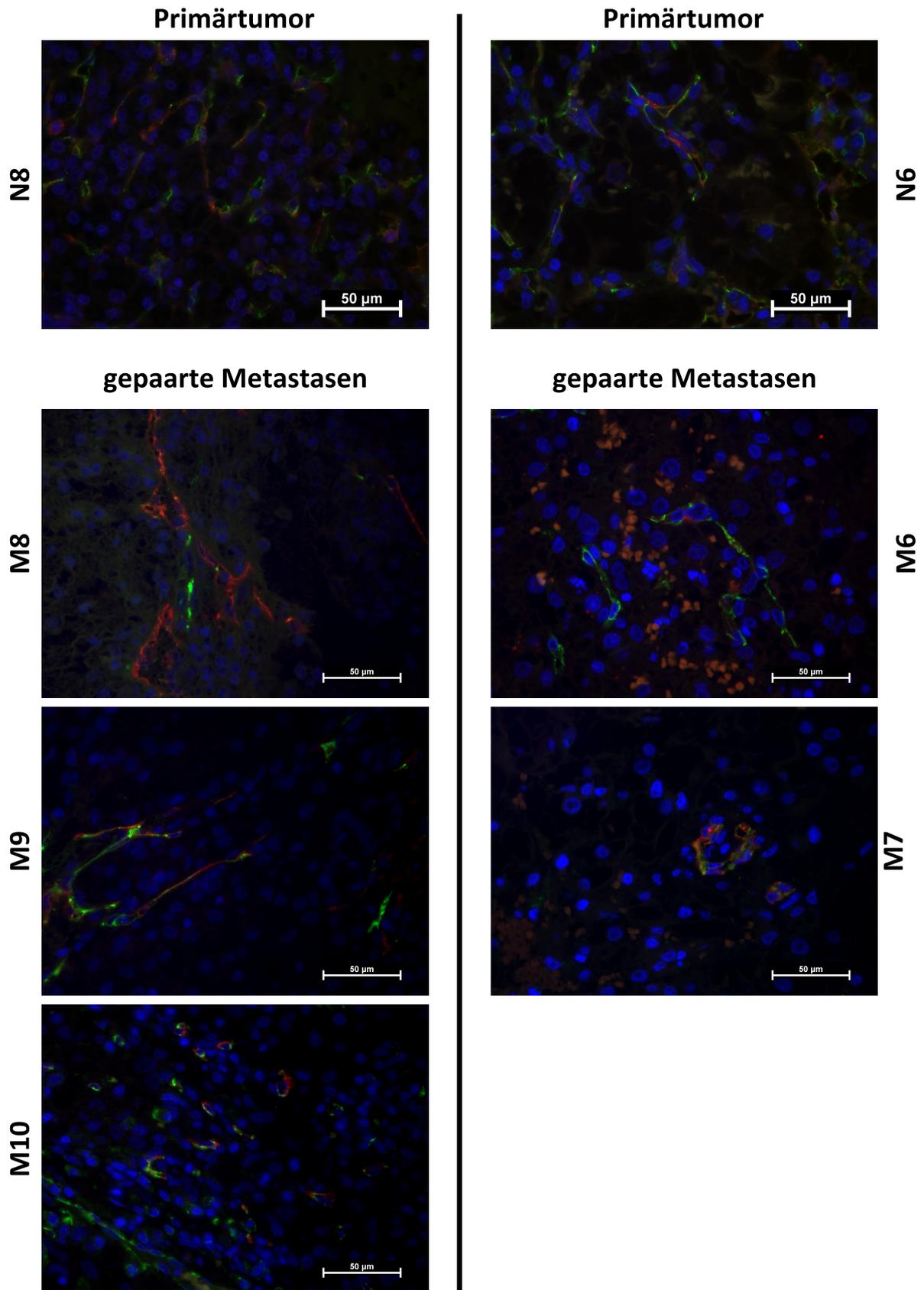


Abbildung 22: Ein Primärtumor mit drei Fernmetastasen und ein Primärtumor mit zwei Fernmetastasen

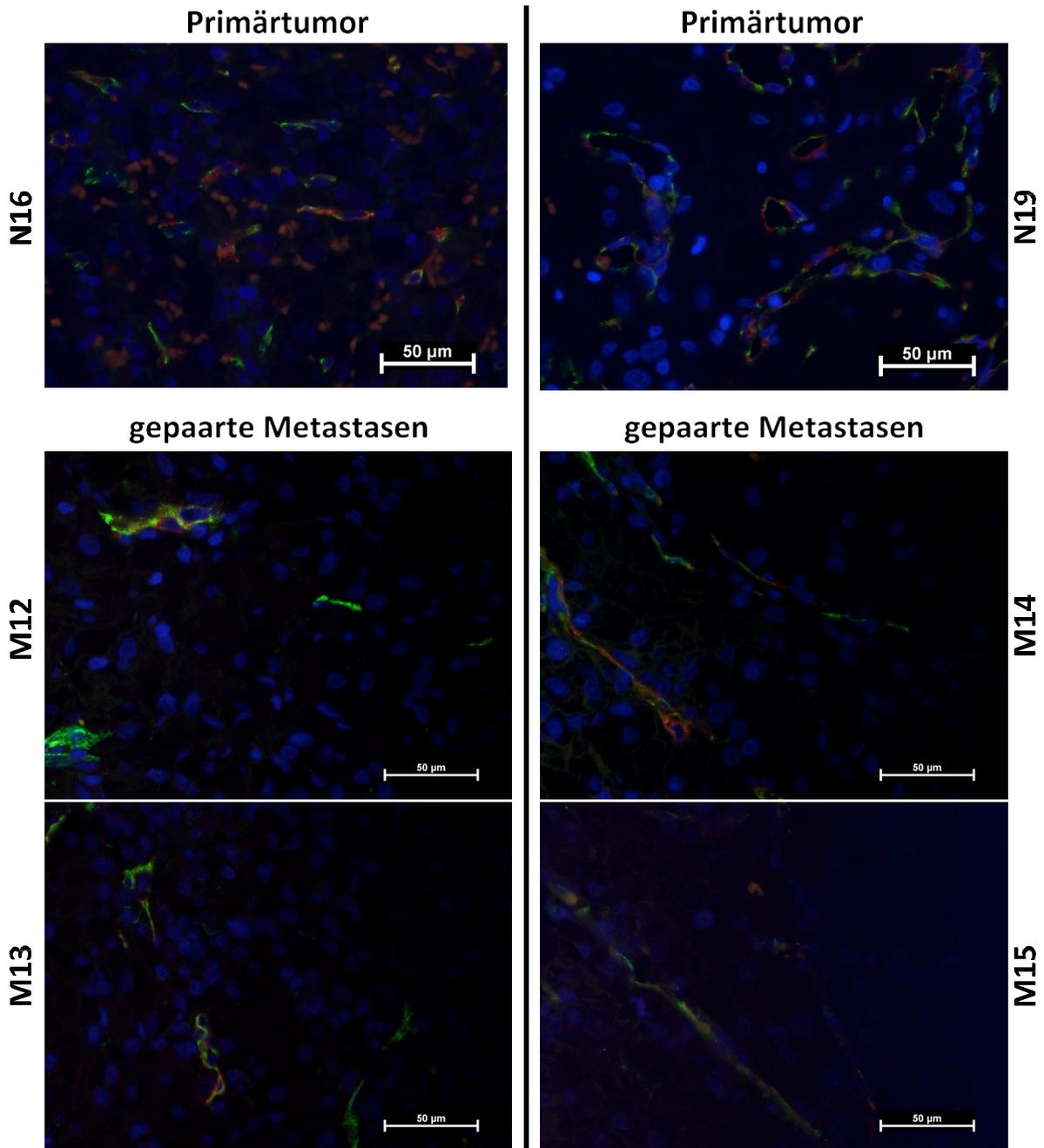


Abbildung 23: Zwei Primärtumore mit jeweils zwei Fernmetastasen

**Tabelle 10: Expression PSMA/CD31 in den Metastasen mit jeweils gepaartem Primärtumor. <sup>1</sup> (- = keine Metastase vorhanden, grün = PSMA/CD31-Expressionen im Primärtumor und der Metastase entsprechen sich, rot = PSMA/CD31-Expressionen im Primärtumor und der Metastase entsprechen sich nicht)**

PatientenID	Primärtumor	Metastase 1	Metastase 2	Metastase 3
6	<25%	25-50%	>75%	-
8	<25%	<25%	>75%	50-75%
15	<25%	<25%	-	-
16	<25%	25-50%	25-50%	-
19	25-50%	<25%	<25%	-
22	<25%	<25%	-	-
24	<25%	0%	-	-
26	<25%	<25%	-	-

Insgesamt wird PSMA in >90% der Metastasen an Gefäßen exprimiert. Tabelle 10 zeigt, dass der Anteil der PSMA/CD31-positiven Endothelzellen im Primärtumor nicht immer mit der PSMA/CD31-Expression in den zugehörigen Metastasen übereinstimmt.

## 6 Diskussion

Das NZK stellt die achthäufigste Krebsneuerkrankung des Mannes und die zehnthäufigste der Frau dar (Ljungberg *et al.*, 2011). Eine frühzeitige Erkennung von Metastasen ist essentiell für das Überleben des Patienten. Hierfür sind sensitive Verfahren für die Diagnose von Metastasen nötig. Beim Prostatakarzinom hat sich der Marker PSMA bereits in der molekularen Bildgebung (PSMA-PET/CT) (Rowe *et al.*, 2016) etabliert und wird zunehmend auch therapeutisch genutzt (Ahmadzadehfar *et al.*, 2015), (Rahbar *et al.*, 2017), (Baum *et al.*, 2016), (Bühler *et al.*, 2009). Anders als der Name vermuten lässt, ist das prostataspezifische Membranantigen allerdings nicht spezifisch für Prostatagewebe, sondern wird auch in vielen anderen Tumoren und auch in gesundem Gewebe anderer Organe exprimiert. Die Rolle von PSMA in der Diagnostik und Therapie des kzNZK ist Gegenstand der aktuellen Forschung und auch dieser Arbeit. Zielsetzung dieser Dissertation war es zunächst zu untersuchen, ob und wo PSMA im kzNZK und in dessen Metastasen exprimiert wird und schließlich, ob die PSMA-Expression mit klinisch-pathologischen Daten (Tumorstadium und histologischer Grad) sowie der Metastasierung korreliert. Dazu wird im Folgenden die PSMA-Expression in Tumorzellen und Endothelzellen des Prostatakarzinoms, kzNZK und dessen Metastasen diskutiert und die Bedeutung für die Diagnostik und Therapie erörtert.

PSMA wird erwartungsgemäß in den Tumorzellen des Prostatakarzinoms exprimiert wie in der Literatur bereits gezeigt (Chang, 2004). Im Gegensatz dazu exprimierten die Tumorzellen der hier untersuchten kzNZK selbst kein PSMA. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch in den Endothelzellen der Gefäße PSMA in 50 von 57 untersuchten kzNZK nachgewiesen werden, in allen 57 Fällen wurde auch CD31 nachgewiesen, im Prostatakarzinom dagegen fanden Silver *et al.* keine Koexpression von CD31 und PSMA (Silver *et al.*, 1997). Für einzelne Fälle ist jedoch bekannt, dass PSMA auch in den Endothelzellen der Gefäße des Prostatakarzinoms exprimiert wird, ein positives Ergebnis ergab sich bei Chang *et al.* in 2 von 22 Fällen (Chang *et al.*, 2001). Die überwiegend nicht vorhandene PSMA-Expression in Gefäßen des Prostatakarzinoms wird von dieser Arbeitsgruppe dadurch erklärt, dass die Tumorzellen selbst die PSMA-Expression durch eine Art negative Feedback Schleife inhibieren (Chang *et al.*, 2001). Auch für diagnostische Zwecke wird die PSMA Expression im Prostatakarzinom erfolgreich eingesetzt: Oliveira *et al.* fassen in ihrem Review zusammen, dass das  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA PET/CT dem  $^{18}\text{F}$ -choline-based-PET/CT und konventionellem CT für den Nachweis von Metastasen, Lymphknoten und rezidivierendem Prostatakrebs überlegen ist (Oliveira *et al.*, 2017).

Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression an CD31-exprimierenden Endothelzellen und dem Tumorstadium und histologischen Grad der kzNZK untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde weder eine Korrelation zwischen höherem Tumorstadium und PSMA/CD31-Expression noch zwischen einem höheren histologischen Grad und PSMA/CD31-

Expression festgestellt. Dies entspricht nicht den Ergebnissen von Spatz *et al.*, die in ihrer Arbeit eine signifikante Korrelation zwischen höherem Tumorstadium und histologischem Grad und einer vermehrten PSMA/CD31-Expression gefunden haben (Spatz *et al.*, 2017). Allerdings basiert dieses Ergebnis von Spatz *et al.* auf deutlich höheren Zahlen der untersuchten Tumoren (228) sowie auf jeweils 2+2 Gewebeschnitten, 2 pro Tumor und 2 aus benachbartem Normalgewebe.

Neben Prostata- und Nierenzellkarzinomen konnte eine PSMA-Expression auch in anderen Tumoren nachgewiesen werden. Im Magen- und kolorektalen Karzinom sowie in Mamma-, Lungen-, (Haffner *et al.*, 2009), (Liu *et al.*, 1997), (Silver *et al.*, 1997), Blasen- und Pankreaskarzinom und im malignen Melanom (Chang, Reuter, *et al.*, 1999) wurde PSMA immer an den Endothelzellen der tumorversorgenden Gefäße, also analog zum kzNZK detektiert. Auch im Gehirn konnte PSMA nachgewiesen werden. Hirnversorgende Gefäße Gesunder waren PSMA-negativ, jedoch gelang der Nachweis von PSMA in Gliomen sowie in Hirnmetastasen des Mammakarzinoms (Nomura *et al.*, 2014). Auffällig war hierbei die insgesamt verminderte Intensität der Färbung in den Metastasen der Mammakarzinome im Gegensatz zum Primärtumor, was auch in der vorliegenden Arbeit für das kzNZK und dessen Metastasen festgestellt wurde. Besonders hohe PSMA-Level wiesen Grad 4 Gliome auf. Nomura *et al.* formulieren dazu ebenfalls die Vermutung, dass eine vermehrte PSMA-Expression mit einer höheren Gefäßdichte einhergeht.

Analog zum Prostatakarzinom konnte auch eine PSMA-Expression durch die Tumorzellen selbst für weitere Tumore nachgewiesen werden. Nimmagadda *et al.* untersuchten Zelllinien und Xenografts des Melanoms und kleinzelligen Lungenkarzinoms und wiesen eine Expression von PSMA durch Epithelzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach, jedoch in geringerer Intensität als im Prostatakarzinom (Nimmagadda *et al.*, 2018).

Die Neoangiogenese spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und beim Wachstum von soliden Tumoren. Eine erhöhte Vaskularisierung ist im kzNZK mit einer besseren Prognose assoziiert (Sandlund *et al.*, 2007). Laut Literatur ist CD31 ein Marker für alle Endothelzellen, wohingegen es spezifischere Endothelzellmarker wie CD105 gibt, die proliferierende Endothelzellen markieren. Eine vermehrte CD105-Expression und damit das Vorhandensein von vielen proliferierenden Endothelzellen war mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Bauman *et al.*, 2016). In anderen Tumorentitäten wie im Mammakarzinom und im kolorektalen Karzinom war eine höhere CD31-Expression ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Uzzan *et al.*, 2004), (Des Guetz *et al.*, 2006). In dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv konnte kein Zusammenhang hinsichtlich der Gefäßdichte und der Metastasierung nachgewiesen werden, die Gefäßdichte war in der

Mehrzahl<sup>2</sup> der Karzinome hoch. Yao *et al.* beschreiben CD31 als Endothelzellmarker für undifferenzierte Endothelzellen und kommen zu dem Schluss, dass höhere CD31-Anteile im kzNZK mit kürzeren Überlebenszeiten und höheren Tumorstadien korrelieren (Yao *et al.*, 2007). Die spannende Frage in diesem Zusammenhang ist, inwiefern PSMA mit der Angiogenese zusammenhängt und welche spezifische Rolle dieses Enzym übernimmt. Conway und Mitarbeiter zeigen in ihrer Publikation, dass es durch PSMA-knockout in Mäusen zur konsekutiven Verminderung der Endothelzellinvasion kommt und somit die Angiogenese außer Kraft gesetzt wird. Sie schließen daraus, dass PSMA die intra- und extrazellulären Signalwege während der Angiogenese verbindet (Conway *et al.*, 2006).

Durch die Arbeitsgruppe um Chang *et al.* wurde unter anderem nachgewiesen, dass PSMA nicht nur in Karzinomen vorkommt, sondern auch in gesundem Gewebe. Dieses Bild zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit: Im gesunden Gewebe exprimierten Tubuluszellen PSMA. Auch in der Literatur wird eine PSMA-Expression im gesunden Nierengewebe für die proximalen Tubuli beschrieben (Silver *et al.*, 1997), (Chang, O’Keefe, *et al.*, 1999), folglich könnte es sich bei den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Tubuli ebenfalls um Zellen der proximalen Tubuli handeln, es konnte jedoch keine eindeutige Zuordnung zu den entsprechenden Tubulusabschnitten vorgenommen werden.

Spatz *et al.* zeigen in ihrer Arbeit, dass die PSMA-Expression vom nicht-metastasierten zum metastasierten kzNZK zunimmt (Spatz *et al.*, 2017), was mit der Untersuchung in der vorliegenden Arbeit übereinstimmt, jedoch waren die Ergebnisse hierbei weder bei Spatz *et al.* noch in der vorliegenden Arbeit signifikant. Diese Zunahme liegt daran, dass metastasierte Tumoren eine dichtere Gefäßversorgung aufweisen und somit über mehr Endothelzellen verfügen, an denen PSMA exprimiert wird. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Metastasen der kzNZK erwiesen sich 16/18 Metastasen als PSMA-positiv, übereinstimmend mit dem Ergebnis in der Literatur (Chang *et al.*, 2001), (Baccala *et al.*, 2007). In metastasierten Prostatakarzinomen gelang der Nachweis einer Expression von PSMA in Endothelzellen nur selten (Chang *et al.*, 2001). Genauere Gründe dafür werden noch erforscht (Chang, O’Keefe, *et al.*, 1999), (Chang *et al.*, 2001). Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass PSMA nur bei der Neubildung von Gefäßen in den Metastasen exprimiert wird, dessen Expression somit im Verlauf der Tumorentwicklung wieder abnimmt und deshalb nur in seltenen Fällen nachzuweisen ist. Wie bereits erwähnt vermuten Chang *et al.*, dass in den Metastasen des Prostatakarzinoms eine negative Feedback-Schleife dafür sorgt, dass die

---

<sup>2</sup> Metastasiert: 13/30 >75% der untersuchten Fläche, 11/30 zwischen 50 und 75%, 6/30 zwischen 25 und 50% - Nicht Metastasiert: 18/27 >75% der untersuchten Fläche, 6/27 zwischen 50 und 75%, 2/27 zwischen 25 und 50%, 1/27 unter 25%, vgl. auch Tabelle 10

Tumorzellen selbst PSMA deaktivieren. Genauere Gründe für diese Hypothese werden allerdings nicht genannt.

Die Voraussetzung für den Einsatz von PSMA-basierter Bildgebung und Therapie des metastasierten kzNZK ist, dass PSMA in ausreichender Menge im kzNZK exprimiert wird. Metastasen des kzNZK werden bisher mit CT, MRT und Knochenszintigraphie, abhängig von der Lokalisation, nachgewiesen (Griffin *et al.*, 2007). Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte bestätigt werden, dass PSMA generell in den Metastasen des kzNZK exprimiert wird und somit ein PSMA-PET/CT ein sinnvolles diagnostisches Hilfsmittel darstellen könnte, um Metastasen frühzeitig zu detektieren. In der Arbeit von Rhee, Blazak, *et al.* konnten die Metastasen von NZK mithilfe des  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-HBED-CC-PET/CT schon ab einer Größe von 6 mm nachgewiesen werden. Gorin *et al.* zeigen, dass das PSMA-targeted- $^{18}\text{F}$ -DCFPyL PET/CT dem konventionellen KM-CT bei der Diagnostik von Metastasen des kzNZK überlegen ist: 54 von 55 im KM-CT entdeckten Metastasen konnten auch im  $^{18}\text{F}$ -DCFPyL PET/CT nachgewiesen werden, wobei sich die eine nicht detektierte Metastase als nekrotischer Lymphknoten ohne Karzinomaktivität herausstellte. Jedoch konnten im  $^{18}\text{F}$ -DCFPyL PET/CT zusätzlich 12 weitere Metastasen nachgewiesen werden (Gorin *et al.*, 2017). Rhee, Ng, *et al.* verwendeten dagegen das  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-HBED-CC-PET/CT im Vergleich zum konventionellen Kontrastmittel-CT bei einem Patienten mit metastasiertem NZK. Hierbei konnte die Äquivalenz der Antikörper-basierten Kontrastmittel-Methode gezeigt werden: Alle im klassischen Kontrastmittel-CT erkannten Metastasen wurden auch im  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-HBED-CC-PET/CT nachgewiesen (Rhee, Ng, *et al.*, 2016). Ein weiterer Case Report zeigte, dass das  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-PET/CT Vorteile gegenüber dem  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT beim Staging eines kzNZK aufweist (Demirci *et al.*, 2014). Diese Ergebnisse bestätigen, dass ein PSMA-PET/CT eine Alternative zu konventionellen bildgebenden Verfahren in der Diagnostik des metastasierten kzNZK ist. Dies gilt allerdings nicht für NZK die nicht vom klarzelligen Typ sind. Hier zeigten nur 10 Tumorareale und Metastasen eine ausreichende Aufnahme des radioaktiv markierten PSMA-Tracers, wohingegen im konventionellen CT 73 Tumorareale und Metastasen nachgewiesen werden konnten (Yin *et al.*, 2018).

Eine weitere wichtige Frage im Bereich der PSMA-Forschung ist, inwieweit sich PSMA für die Therapie des kzNZK eignen könnte. Bis dato gibt es dazu keine Publikationen. Jedoch hat sich die PSMA-basierte Therapie bereits für das Prostatakarzinom etabliert. Bei austherapierten metastasierten Prostatakarzinomen kann, je nach PSMA-Expressionsmuster, eine Radioligandtherapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DKFZ-617 PSMA (Lu-PSMA) durchgeführt werden. Hier konnte bei 79% der 22 Patienten eine Reduktion des PSA-Levels nach dem ersten Zyklus der Lu-PSMA-Therapie nachgewiesen werden. Die Therapie wurde insgesamt gut vertragen (3 Fälle von Anämie Grad 3) (Ahmadzadehfar *et al.*, 2016).

Die Limitationen bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit waren vorrangig die Subjektivität der Bewertung der Immunfluoreszenzbilder. Objektiver wäre die Auswertung über eine Analysesoftware, mit der die PSMA- und CD31-Expression im jeweiligen Gewebeschnitt quantifiziert werden kann, idealerweise durch Auszählung der Zellen. Die Fallzahl der Tumoren und gepaarten Metastasen war relativ gering. Hierzu sollte die Fallzahl in weiterführenden Arbeiten vergrößert werden. Um die Heterogenität innerhalb der Tumore und Metastasen zu berücksichtigen, sollten mehrere Teilschnitte aus verschiedenen Bereichen der Gewebe (mittig, Randbereiche) untersucht werden.

Eine Stärke der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass zu den Primärtumoren gepaarte Metastasen untersucht wurden und somit Aussagen über den Zusammenhang zwischen PSMA-Expression im Primärtumor und in den zugehörigen Metastasen getroffen werden konnten.

Schlussfolgernd ist zu sagen, dass durch die Expression von PSMA im kzNZK und dessen Metastasen die grundlegende Voraussetzung für einen neuen Ansatz in der Diagnostik und Therapie vorhanden ist. Für andere Tumoren wie das Prostatakarzinom hat sich das PSMA-PET/CT zur Diagnostik und zum prä-operativen Staging bereits bewährt, in einzelnen Fällen auch für das kzNZK. Der Einsatz des PSMA-PET/CT zur Diagnostik und zum prä-operativen Staging sollte sich also auch für das NZK etablieren. Dazu sollten weitere Studien mit höheren Fallzahlen und anderen histologischen Subtypen des NZK durchgeführt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- AHMADZADEHFAR H, EPPARD E, KÜRPIG S, FIMMERS R, YORDANOVA A, SCHLENKHOFF CD, GÄRTNER F, ROGENHOFER S and ESSLER M (2016) Therapeutic response and side effects of repeated radioligand therapy with <sup>177</sup>Lu-PSMA-DKFZ-617 of castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Oncotarget* 7(11), 12477–12488.
- AHMADZADEHFAR H, RAHBAR K, KÜRPIG S, BÖGEMANN M, CLAESENER M, EPPARD E, GÄRTNER F, ROGENHOFER S, SCHÄFERS M and ESSLER M (2015) Early side effects and first results of radioligand therapy with <sup>177</sup>Lu-DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. *EJNMMI Research* 5.
- AMATO RJ (2000) Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Seminars in Oncology* 27(2), 177–186.
- BACCALA A, SERCIA L, LI J, HESTON W and ZHOU M (2007a) Expression of prostate-specific membrane antigen in tumor-associated neovasculature of renal neoplasms. *Urology* 70(2), 385–390.
- BACCALA A, SERCIA L, LI J, HESTON W and ZHOU M (2007b) Expression of prostate-specific membrane antigen in tumor-associated neovasculature of renal neoplasms. *Urology* 70(2), 385–390.
- BAERISWYL V and CHRISTOFORI G (2009) The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 19(5), 329–337.
- BALDEWIJNS MML, VAN VLODROP IJH, SCHOUTEN LJ, SOETEKOUW PMMB, DE BRUÏNE AP and VAN ENGELAND M (2008) Genetics and epigenetics of renal cell cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1785(2), 133–155.
- BAUM RP, KULKARNI HR, SCHUCHARDT C, SINGH A, WIRTZ M, WIESSALLA S, SCHOTTELIUS M, MUELLER D, KLETTE I and WESTER H-J (2016) <sup>177</sup>Lu-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 57(7), 1006–1013.
- BAUMAN TM, HUANG W, LEE MH and ABEL EJ (2016) Neovascularity as a prognostic marker in renal cell carcinoma. *Human Pathology* 57, 98–105. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0046817716301460>

- BEKEMA HJ, MACLENNAN S, IMAMURA M, LAM TBL, STEWART F, SCOTT N, MACLENNAN G, MCCLINTON S, GRIFFITHS TRL, SKOLARIKOS A, MACLENNAN SJ, SYLVESTER R, LJUNGBERG B and N'DOW J (2013) Systematic review of adrenalectomy and lymph node dissection in locally advanced renal cell carcinoma. *European Urology* 64(5), 799–810.
- BLOM JHM, VAN POPPEL H, MARÉCHAL JM, JACQMIN D, SCHRÖDER FH, DE PRIJCK L, SYLVESTER R and EORTC GENITOURINARY TRACT CANCER GROUP (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. *European Urology* 55(1), 28–34.
- BÜHLER P, WOLF P and ELSÄSSER-BEILE U (2009) Targeting the prostate-specific membrane antigen for prostate cancer therapy. *Immunotherapy* 1(3), 471–481.
- CANGIANO T, LIAO J, NAITOH J, DOREY F, FIGLIN R and BELLDEGRUN A (1999) Sarcomatoid renal cell carcinoma: biologic behavior, prognosis, and response to combined surgical resection and immunotherapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 17(2), 523–528.
- CAPITANIO U and MONTORSI F (2016) Renal cancer. *Lancet (London, England)* 387(10021), 894–906.
- CHANG SS (2004) Overview of Prostate-Specific Membrane Antigen. *Reviews in Urology* 6(Suppl 10), S13–S18.
- CHANG SS, O'KEEFE DS, BACICH DJ, REUTER VE, HESTON WD and GAUDIN PB (1999) Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 5(10), 2674–2681.
- CHANG SS, REUTER VE, HESTON WD, BANDER NH, GRAUER LS and GAUDIN PB (1999) Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Research* 59(13), 3192–3198.
- CHANG SS, REUTER VE, HESTON WDW and GAUDIN PB (2001) Metastatic renal cell carcinoma neovasculature expresses prostate-specific membrane antigen. *Urology* 57(4), 801–805.

- CHEVILLE JC, BLUTE ML, ZINCKE H, LOHSE CM and WEAVER AL (2001) Stage pT1 conventional (clear cell) renal cell carcinoma: pathological features associated with cancer specific survival. *The Journal of Urology* 166(2), 453–456.
- CONWAY RE, PETROVIC N, LI Z, HESTON W, WU D and SHAPIRO LH (2006) Prostate-Specific Membrane Antigen Regulates Angiogenesis by Modulating Integrin Signal Transduction. *Molecular and Cellular Biology* 26(14), 5310–5324.
- COZZOLI A, MILANO S, CANCARINI G, ZANOTELLI T and COSCIANI CUNICO S (1995) Surgery of lung metastases in renal cell carcinoma. *British Journal of Urology* 75(4), 445–447.
- DALL’OGLIO MF, ANTUNES AA, SARKIS AS, CRIPPA A, LEITE KR, LUCON AM and SROUGI M (2007) Microvascular tumour invasion in renal cell carcinoma: the most important prognostic factor. *BJU international* 100(3), 552–555.
- DECKER H (2006) Von Hippel-Lindau-Syndrom. *medgen.* 18, 355-361
- DEMIRCI E, OCAK M, KABASAKAL L, DECRISTOFORO C, TALAT Z, HALAÇ M and KANMAZ B (2014) (68)Ga-PSMA PET/CT imaging of metastatic clear cell renal cell carcinoma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 41(7), 1461–1462.
- DES GUETZ G, UZZAN B, NICOLAS P, CUCHERAT M, MORERE J-F, BENAMOUZIG R, BREAU J-L and PERRET G-Y (2006) Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *British Journal of Cancer* 94(12), 1823–1832.
- FERRERO E, FERRERO ME, PARDI R and ZOCCHI MR (1995) The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. *FEBS Letters* 374(3), 323–326.
- FLANIGAN RC, CAMPBELL SC, CLARK JI and PICKEN MM (2003) Metastatic renal cell carcinoma. *Current Treatment Options in Oncology* 4(5), 385–390.
- GIANNARINI G, PETRALIA G and THOENY HC (2012) Potential and limitations of diffusion-weighted magnetic resonance imaging in kidney, prostate, and bladder cancer including pelvic lymph node staging: a critical analysis of the literature. *European Urology* 61(2), 326–340.

- GORIN MA, ROWE SP, HOOPER JE, KATES M, HAMMERS H-J, SZABO Z, POMPER MG and ALLAF ME (2017) PSMA-Targeted 18F-DCFPyL PET/CT Imaging of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Results from a Rapid Autopsy. *European Urology* 71(1), 145–146.
- GRIFFIN N, GORE ME and SOHAIB SA (2007) Imaging in metastatic renal cell carcinoma. *AJR. American journal of roentgenology* 189(2), 360–370.
- HAFFNER MC, KRONBERGER IE, ROSS JS, SHEEHAN CE, ZITT M, MÜHLMANN G, ÖFNER D, ZELGER B, ENSINGER C, YANG XJ, GELEY S, MARGREITER R and BANDER NH (2009) Prostate-specific membrane antigen expression in the neovasculature of gastric and colorectal cancers. *Human Pathology* 40(12), 1754–1761.
- HUNT JD, VAN DER HEL OL, MCMILLAN GP, BOFFETTA P and BRENNAN P (2005) Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *International Journal of Cancer* 114(1), 101–108.
- HUNTER KW, CRAWFORD NP and ALSARRAJ J (2008) Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Research : BCR* 10(Suppl 1), S2.
- KLATTE T, PATARD J-J, GOEL RH, KLEID MD, GUILLE F, LOBEL B, ABBOU C-C, DE LA TAILLE A, TOSTAIN J, CINDOLO L, ALTIERI V, FICARRA V, ARTIBANI W, PRAYER-GALETTI T, ALLHOFF EP, SCHIPS L, ZIGEUNER R, FIGLIN RA, KABBINAVAR FF, PANTUCK AJ, BELLDEGRUN AS and LAM JS (2007) Prognostic impact of tumor size on pT2 renal cell carcinoma: an international multicenter experience. *The Journal of Urology* 178(1), 35–40; discussion 40.
- KOGA S, TSUDA S, NISHIKIDO M, OGAWA Y, HAYASHI K, HAYASHI T and KANETAKE H (2001) The diagnostic value of bone scan in patients with renal cell carcinoma. *The Journal of Urology* 166(6), 2126–2128.
- KOLLENDER Y, BICKELS J, PRICE WM, KELLAR KL, CHEN J, MERIMSKY O, MELLER I and MALAWER MM (2000) Metastatic renal cell carcinoma of bone: indications and technique of surgical intervention. *The Journal of Urology* 164(5), 1505–1508.
- KRATOCHWIL C, GIESEL FL, STEFANOVA M, BENEŠOVÁ M, BRONZEL M, AFSHAR-OROMIEH A, MIER W, EDER M, KOPKA K and HABERKORN U (2016) PSMA-Targeted Radionuclide Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with 177Lu-Labeled PSMA-617. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 57(8), 1170–1176.

- KRISTIANSEN G, DELAHUNT B, SRIGLEY JR, LÜDERS C, LUNKENHEIMER J-M, GEVENSLEBEN H, THIESLER T, MONTIRONI R and EGEVAD L (2015) Vancouver-Klassifikation von Nierentumoren.
- LANGER C (2010) Klassifikation des Nierenzellkarzinoms. (17), Available at: [www.kup.at/urologie](http://www.kup.at/urologie).
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.2, 2017, AWMF Registernummer: 043/017OL.
- LIM DJ and CARTER MF (1993) Computerized tomography in the preoperative staging for pulmonary metastases in patients with renal cell carcinoma. *The Journal of Urology* 150(4), 1112–1114.
- LIU H, MOY P, KIM S, XIA Y, RAJASEKARAN A, NAVARRO V, KNUDSEN B and BANDER NH (1997) Monoclonal Antibodies to the Extracellular Domain of Prostate-specific Membrane Antigen Also React with Tumor Vascular Endothelium. *Cancer Research* 57(17), 3629–3634.
- LJUNGBERG B, CAMPBELL SC, CHO HY, JACQMIN D, LEE JE, WEIKERT S and KIEMENEY LA (2011) The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *European Urology* 60(4), 615–621.
- LOPES AD, DAVIS WL, ROSENSTRAUS MJ, UVEGES AJ and GILMAN SC (1990) Immunohistochemical and pharmacokinetic characterization of the site-specific immunoconjugate CYT-356 derived from antiprostata monoclonal antibody 7E11-C5. *Cancer Research* 50(19), 6423–6429.
- LOPEZ-BELTRAN A, SCARPELLI M, MONTIRONI R and KIRKALI Z (2006) 2004 WHO Classification of the Renal Tumors of the Adults. *European Urology* 49(5), 798–805.
- MACLENNAN S, IMAMURA M, LAPITAN MC, OMAR MI, LAM TBL, HILVANO-CABUNGCAL AM, ROYLE P, STEWART F, MACLENNAN G, MACLENNAN SJ, DAHM P, CANFIELD SE, MCCLINTON S, GRIFFITHS TRL, LJUNGBERG B, N'DOW J, UCAN SYSTEMATIC REVIEW REFERENCE GROUP and EAU RENAL CANCER GUIDELINE PANEL (2012) Systematic review of perioperative and quality-of-life outcomes following surgical management of localised renal cancer. *European Urology* 62(6), 1097–1117.

- MOCH H (2016) WHO-Klassifikation von 2016 und erste S3-Leitlinie zum Nierenzellkarzinom. *Der Pathologe* 37(2), 127–133.
- NIMMAGADDA S, PULLAMBHATLA M, CHEN Y, PARSANA P, LISOK A, CHATTERJEE S, MEASE R, ROWE SP, LUPOLD S, PIENTA KJ and POMPER MG (2018) Low-Level Endogenous PSMA Expression in Nonprostatic Tumor Xenografts Is Sufficient for In Vivo Tumor Targeting and Imaging. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 59(3), 486–493.
- NOMURA N, PASTORINO S, JIANG P, LAMBERT G, CRAWFORD JR, GYMNOPOULOS M, PICCIONI D, JUAREZ T, PINGLE SC, MAKALE M and KESARI S (2014) Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in primary gliomas and breast cancer brain metastases. *Cancer Cell International* 14, 26.
- OLIVEIRA JM, GOMES C, FARIA DB, VIEIRA TS, SILVA FA, VALE J and PIMENTEL FL (2017) 68 Ga-prostate-specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography/Computed Tomography for Prostate Cancer Imaging: A Narrative Literature Review. *World Journal of Nuclear Medicine* 16(1), 3–7.
- PARK JW, JO MK and LEE HM (2009) Significance of 18F-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography/computed tomography for the postoperative surveillance of advanced renal cell carcinoma. *BJU international* 103(5), 615–619.
- PAVLOVICH CP, WALTHER MM, EYLER RA, HEWITT SM, ZBAR B, LINEHAN WM and MERINO MJ (2002) Renal tumors in the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *The American Journal of Surgical Pathology* 26(12), 1542–1552.
- PINTO JT, SUFFOLETTO BP, BERZIN TM, QIAO CH, LIN S, TONG WP, MAY F, MUKHERJEE B and HESTON WD (1996) Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 2(9), 1445–1451.
- PORT FK, RAGHEB NE, SCHWARTZ AG and HAWTHORNE VM (1989) Neoplasms in dialysis patients: a population-based study. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation* 14(2), 119–123.
- RAHBAR K, AHMADZADEHFAR H, KRATOCHWIL C, HABERKORN U, SCHÄFERS M, ESSLER M, BAUM RP, KULKARNI HR, SCHMIDT M, DRZEZGA A, BARTENSTEIN P, PFESTROFF A, LUSTER M, LÜTZEN U, MARX M, PRASAD V, BRENNER W,

- HEINZEL A, MOTTAGHY FM, RUF J, MEYER PT, HEUSCHKEL M, EVESLAGE M, BÖGEMANN M, FENDLER WP and KRAUSE BJ (2017) German Multicenter Study Investigating <sup>177</sup>Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 58(1), 85–90.
- RAJASEKARAN AK, ANILKUMAR G and CHRISTIANSEN JJ (2005) Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein? *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 288(5), C975–C981.
- REN Q, REN L, REN C, LIU X, DONG C and ZHANG X (2015) Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) plays a critical role in the maintenance of human vascular endothelial barrier function. *Cell Biochemistry and Function* 33(8), 560–565.
- RENEHAN AG, TYSON M, EGGER M, HELLER RF and ZWAHLEN M (2008) Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet (London, England)* 371(9612), 569–578.
- RHEE H, BLAZAK J, THAM CM, NG KL, SHEPHERD B, LAWSON M, PRESTON J, VELA I, THOMAS P and WOOD S (2016) Pilot study: use of gallium-68 PSMA PET for detection of metastatic lesions in patients with renal tumour. *EJNMMI Research* 6.
- RHEE H, NG KL, TSE BW-C, YEH M-C, RUSSELL PJ, NELSON C, THOMAS P, SAMARATUNGA H, VELA I, GOBE G and WOOD S (2016) Using prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in clear cell renal cell carcinoma for imaging advanced disease. *Pathology* 48(6), 613–616.
- ROBERT KOCH INSTITUT, GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. (2015) Krebs in Deutschland 2011/12. (10. Ausgabe).
- ROWE SP, GORIN MA, ALLAF ME, PIENTA KJ, TRAN PT, POMPER MG, ROSS AE and CHO SY (2016) PET imaging of prostate-specific membrane antigen in prostate cancer: current state of the art and future challenges. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 19(3), 223–230.
- ROWE SP, GORIN MA, HAMMERS HJ, SOM JAVADI M, HAWASLI H, SZABO Z, CHO SY, POMPER MG and ALLAF ME (2015) Imaging of metastatic clear cell renal cell carcinoma with PSMA-targeted <sup>18</sup>F-DCFPyL PET/CT. *Annals of Nuclear Medicine* 29(10), 877–882.
- SANDLUND J, HEDBERG Y, BERGH A, GRANKVIST K, LJUNGBERG B and RASMUSON T (2007) Evaluation of CD31 (PECAM-1) expression using tissue microarray in patients with

- renal cell carcinoma. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 28(3), 158–164.
- SENGUPTA S, LOHSE CM, LEIBOVICH BC, FRANK I, THOMPSON RH, WEBSTER WS, ZINCKE H, BLUTE ML, CHEVILLE JC and KWON ED (2005) Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer* 104(3), 511–520.
- SHUCH B, AMIN A, ARMSTRONG AJ, EBLE JN, FICARRA V, LOPEZ-BELTRAN A, MARTIGNONI G, RINI BI and KUTIKOV A (2015) Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. *European Urology* 67(1), 85–97.
- SILVER DA, PELLICER I, FAIR WR, HESTON WD and CORDON-CARDO C (1997a) Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 3(1), 81–85.
- SILVER DA, PELLICER I, FAIR WR, HESTON WD and CORDON-CARDO C (1997b) Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 3(1), 81–85.
- SPATZ S, TOLKACH Y, JUNG K, STEPHAN C, BUSCH J, RALLA B, RABIEN A, FELDMANN G, BROSSART P, BUNDSCHUH RA, AHMADZADEHFAR H, ESSLER M, TOMA M, MÜLLER SC, ELLINGER J, HAUSER S and KRISTIENSEN G (2017) Comprehensive Evaluation of Prostate-Specific Membrane Antigen Expression in the Vasculature of Renal Tumors: Implications for Imaging Studies and Prognostic Role. *The Journal of Urology*.
- THOMPSON RH, HILL JR, BABAYEV Y, CRONIN A, KAAG M, KUNDU S, BERNSTEIN M, COLEMAN J, DALBAGNI G, TOUIJER K and RUSSO P (2009) Metastatic renal cell carcinoma risk according to tumor size. *The Journal of Urology* 182(1), 41–45.
- UZZAN B, NICOLAS P, CUCHERAT M and PERRET G-Y (2004) Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Research* 64(9), 2941–2955.
- VATTEN LJ, TRICHOPOULOS D, HOLMEN J and NILSEN TIL (2007) Blood pressure and renal cancer risk: the HUNT Study in Norway. *British Journal of Cancer* 97(1), 112–114.

- XIE Y and MULLER WA (1996) Fluorescence in situ hybridization mapping of the mouse platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) to mouse chromosome 6, region F3-G1. *Genomics* 37(2), 226–228.
- YAO X, QIAN C-N, ZHANG Z-F, TAN M-H, KORT EJ, YANG XJ, RESAU JH and TEH BT (2007) Two Distinct Types of Blood Vessels in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Have Contrasting Prognostic Implications. *Clinical Cancer Research* 13(1), 161–169.
- YIN Y, CAMPBELL SP, MARKOWSKI MC, PIERORAZIO PM, POMPER MG, ALLAF ME, ROWE SP and GORIN MA (2018) Inconsistent Detection of Sites of Metastatic Non-Clear Cell Renal Cell Carcinoma with PSMA-Targeted [18F]DCFPyL PET/CT. *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging*.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität des Nierenzellkarzinoms bei Männern und Frauen in Europa (aus (Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015).....	4
Abbildung 2: Ursprungsorte und Histopathologie der verschiedenen Subtypen des Nierenzellkarzinoms (aus Baldewijns et al., 2008). ....	7
Abbildung 3: Übersicht zur Fernmetastasierung von Tumoren (aus Hunter et al., 2008).....	13
Abbildung 4: „Angiogenetischer Wechsel“ im Krebsmausmodell. (Baeriswyl and Christofori, 2009). .....	14
Abbildung 5: Diskutierte Funktionen des PSMA (aus Rajasekaran et al., 2005).....	15
Abbildung 6: Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung .....	23
Abbildung 7: PSMA/CD31-Expression in Prostatakarcinomen.....	24
Abbildung 8: Gesundes Nierengewebe mit zwei PSMA-positiven Tubuli und CD31-positiven Gefäßen .....	24
Abbildung 9: Anzahl der Primärtumoren mit CD31-positiven Zellen und mit Doppelexpression (PSMA und CD31) .....	25
Abbildung 10: PSMA/CD31 Immunfluoreszenzdoppelfärbung im gesunden Anteil sowie im Tumorgewebe .....	26
Abbildung 11: Anteil CD31 in den Primärtumoren bezogen auf das T-Stadium.....	27
Abbildung 12: Anteil von PSMA/CD31 in den Primärtumoren bezogen auf das Tumorstadium .....	27
Abbildung 13: Anteil von CD31 in den Primärtumoren bezogen auf den histologischen Grad .....	28
Abbildung 14: Anteil von PSMA/CD31 in den Primärtumoren bezogen auf den histologischen Grad	28
Abbildung 15: CD31-Expression im Bezug auf den Metastasierungszustand der Primärtumoren.....	29
Abbildung 16: PSMA/CD31-Expression im Bezug auf den Metastasierungszustand in den Primärtumoren .....	29
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung mit anti-PSMA- und anti-CD31-AK an einer metastasierten und einer nicht metastasierten Patientenprobe.....	31
Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung mit PSMA/CD31 an zwei metastasierten Nierenzellkarzinomen .....	32

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung mit PSMA/CD31 an zwei nicht-metastasierten Nierenzellkarzinomen .....	33
Abbildung 20: PSMA/CD31-Expression in den Metastasen.....	34
Abbildung 21: Primärtumoren, die jeweils eine Fernmetastase gebildet haben (geringfügige (M18) bzw. keine (M17) PSMA/CD31-Expression) .....	35
Abbildung 22: Ein Primärtumor mit drei Fernmetastasen und ein Primärtumor mit zwei Fernmetastasen.....	36
Abbildung 23: Zwei Primärtumore mit jeweils zwei Fernmetastasen.....	37

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die häufigsten Subtypen des Nierenzellkarzinoms (Shuch et al., 2015).....	5
Tabelle 2: Übersicht zur histologischen Klassifikation der Nierentumoren (aus Moch et al., 2016).....	7
Tabelle 3: Vancouver-Klassifikation von Nierentumoren (nach Kristiansen et al., 2015) .....	10
Tabelle 4: TNM-Klassifikation für das Nierenzellkarzinom nach UICC 2010 (Langer, 2010).....	11
Tabelle 5: Charakterisierung der verwendeten Prostatakzinome .....	18
Tabelle 6: Charakterisierung der verwendeten kzNZK.....	18
Tabelle 7: Charakterisierung der verwendeten Fernmetastasen .....	19
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Reagenzien für die Immunfluoreszenzfärbung .....	20
Tabelle 9: Auswertungsscore zur Quantifizierung der PSMA- und CD31-Expression .....	22
Tabelle 10: Expression PSMA/CD31 in den Metastasen mit jeweils gepaartem Primärtumor. ....	38

## 10 Lebenslauf

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

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Kerstin Junker für die freundliche Überlassung meines Themas und die ausdauernde Hilfe bedanken.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. rer. nat. Sebastian Hölters bedanken, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand und viele wertvolle Hilfestellungen geben konnte.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mich immer ermutigt und unterstützt haben und mir mein Studium ermöglichten.