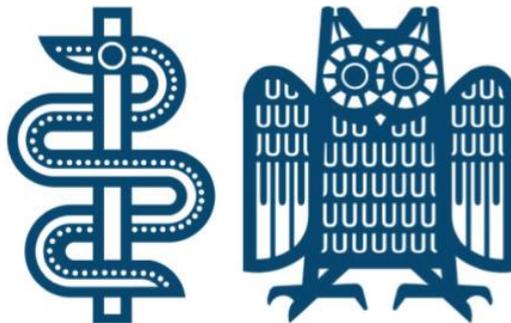


Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Etablierung eines personalisierten präklinischen *in-vivo* Modells des Nierenzellkarzinoms

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2023



vorgelegt von Carolina Berchem
geb. am 02.06.1994 in Datteln

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung.....	5
1.1 Nierenzellkarzinom.....	5
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	5
1.1.2 Klassifikation und Stadieneinteilung	7
1.1.3 (Histo)pathologische und tumorbiologische Charakteristika	9
1.1.4 Klinik, Diagnostik und Therapie.....	11
1.2 Mausmodelle.....	14
1.3 Vorarbeiten – orthotopes Xenograftmodell	15
2. Zielsetzung	16
3. Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte	17
3.1.2 Chemische Materialien.....	17
3.1.3 Antikörper	18
3.1.4 Primärzellkulturen	19
3.2 Methoden	21
3.2.1 OP-Verfahren.....	21
3.2.2 Versuchstiere.....	22
3.2.2.1 BALB/c-Nude Mäuse	23
3.2.2.2 CB17-SCID Mäuse	23
3.2.2.3 NOD SCID gamma Mäuse	23
3.2.2.4 Tierhaltung	24
3.2.3 Follow-up Methoden	24
3.2.3.1 Sonographie.....	24

3.2.3.2 Kontrastmittel-CT	25
3.2.3.3 MRT	26
3.2.3.4 Abbau.....	27
3.2.4 Immunhistochemie.....	27
3.2.5 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	28
3.2.6 HE-Färbung	29
4. Ergebnisse.....	30
4.1 Arbeitsprogramm und Zeitablauf	30
4.2 Auswahl und Charakterisierung der Primärzellkulturen.....	31
4.3 Aufbereitung und Implantation der Zellen bzw. Tumorstücke.....	33
4.3.1 Serie 1	34
4.3.1.1 OP.....	34
4.3.1.2 Follow-up.....	34
4.3.1.3 Abbau und Organexplantation	34
4.3.2 Serie 2	35
4.3.2.1 OP.....	35
4.3.2.2 Follow-up.....	35
4.3.2.3 Abbau, Organexplantation und Pathologie	36
4.3.3 Serie 3	38
4.3.3.1 OP.....	38
4.3.3.2 Follow-up.....	38
4.3.3.3 Abbau, Organexplantation und Pathologie	38
4.3.4 Serie 4	39
4.3.4.1 OP.....	39
4.3.4.2 Follow-up.....	40
4.3.4.3 Abbau, Organexplantation und Pathologie	41
4.3.5 Serie 5	42

4.3.5.1 OP	42
4.3.5.2 Follow-up.....	42
4.3.5.3 Abbau, Organexplantation und Pathologie	43
4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	45
5. Diskussion	46
5.1 Auswahl des Mausmodells und Ausmaß der Immundefizienz	46
5.1.1 Vor- und Nachteile der verschiedenen Mausmodelle	46
5.1.2 Immundefizienz der Mäuse	50
5.2 Chirurgisches Verfahren.....	53
5.3 Auswahl der Zelllinien.....	54
5.4 Follow-up Methoden bzw. bildgebende Verfahren	55
5.5. Immunhistochemische Aufarbeitung.....	56
5.6 Schlussfolgerung und Ausblick.....	58
Literaturverzeichnis.....	61
Abbildungsverzeichnis	65
Tabellenverzeichnis	67
Abkürzungsverzeichnis	68
Danksagung	69
Lebenslauf	70

Zusammenfassung

Ein großer Teil der Erkenntnisse aus der experimentellen Forschung zum Nierenzellkarzinom kann durch den Mangel an stabilen, repräsentativen in-vivo Modellen nicht auf den klinischen Alltag und die Patientenversorgung übertragen werden. Zeit- und kostenaufwändige Tumorgrafts stellen zwar realitätsnahe Mausmodelle dar, jedoch ist ein Anwachsen der Tumore nur selten erfolgreich und die Untersuchungsmöglichkeiten bezüglich Standardisierung und parallelen in-vitro Versuchen sind sehr eingeschränkt. Etablierte aus aggressiven Tumoren generierte Zelllinien, wie die hier verwendete Nierenzellkarzinomzelllinie CAKI-2, befinden sich bereits seit Jahrzehnten in Kultur, sodass mit diesen Zellen etablierte Xenograftmodelle ebenso wenig repräsentativ für die Komplexität und Heterogenität humaner Nierenzellkarzinome sind. Häufig verwendete Mausmodelle wie zum Beispiel subkutane Xenografts erscheinen aufgrund ihrer Einfachheit sowie Einschränkungen in Bezug auf Mikroumgebung, Metastasierungsverhalten und Tumorerheterogenität mit der damit fehlenden Translationsmöglichkeit auf den Menschen für patientennahe Nierenzellkarzinomforschung ebenfalls wenig geeignet.

Aus diesen Gründen sollte in dieser Arbeit durch Kombination zweier etablierter Techniken, zum einen Nierenzellkarzinom-Primärkulturen und zum anderen orthotope Nierenzellkarzinom-Xenograftmodelle, ein personalisiertes präklinisches in-vivo Modell des Nierenzellkarzinoms etabliert werden. Ziel hierbei war es, zu untersuchen, ob ein lokal-invasives Wachstum von Tumoren auf diesem Weg möglich ist, welches Metastasierungsverhalten diese gegebenenfalls aufweisen und ob die angewachsenen Tumore histologisch und immunhistochemisch mit den Originaltumoren vom Patienten übereinstimmen.

Hierzu wurden zunächst humane Nierenzellkarzinom-Primärkulturen renal subkapsulär in immundefiziente Mäuse implantiert. Im Verlauf wurden – soweit verfügbar - zusätzlich auch humane Tumorstücke unter die Nierenkapsel der Mäuse implantiert. Die Primärzellkulturen und Tumorstücke stammten aus synchron, metachron oder nicht-metastasierten Nierenzellkarzinomen. Zudem wurde eine aus einer Nebennieren-Metastase generierte Primärzellkultur verwendet. Zur Kontrolle der Methodik wurden zusätzlich die schon in Vorarbeiten verwendeten CAKI-2-Zellen eingesetzt. Alle Primärzellkulturen, die zur Implantation in Betracht kamen, wurden zunächst mittels Immunfluoreszenz-Doppel-färbung mit CK, PAX8 und CD90 charakterisiert. Anschließend erfolgte ein 10- bis 55-wöchiges Follow-up mittels etablierter bildgebender Verfahren für Kleintiere. Hierzu fanden die Kleintier-Sonographie, Kontrastmittel-verstärktes Mikro-CT und 9.4T MRT Verwendung. Die makroskopische Beurteilung der entstandenen Läsionen und Tumore erfolgte durch Abbau der Tiere und Explantation der operierten Nieren. Das Material wurde

weiterhin histologisch untersucht. Neben der HE-Färbung wurden immunhistochemische Färbungen der Präparate unter Verwendung von Antikörpern gegen Ki67, HUNU, Ku70, CAIX, CD90, PAX8, CK und Vimentin durchgeführt.

Insgesamt wurden über einen Zeitraum von zwei Jahren 48 Mäuse operiert. Um einzuschätzen, von welcher Relevanz das Ausmaß der Immundefizienz der Mäuse ist, wurden drei verschiedene Mausstämme (BALB/c Nude, CB17-SCID und NSG) verwendet. Es konnten 12 verschiedene Primärzellkulturen und vier Tumorstücke renal subkapsulär implantiert werden. Trotz Variation der Mausstämme und des implantierten Materials sowie methodischer Optimierung von Operationstechnik und bildgebenden Verfahren konnte lediglich ein Anwachsen der bereits etablierten Zelllinie CAKI-2 in drei Mäusen, sowie acht makroskopischer Läsionen und vier makroskopischer Tumore der Primärzellkulturen nachgewiesen werden. Nach histologischer und immunhistochemischer Aufarbeitung der Tumore konnten die für das Nierenzellkarzinom typischen histologischen Charakteristika und Markerexpressionsmuster annähernd wiedergespiegelt werden. Eine Metastasierung konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

Somit war die Etablierung eines individualisierten präklinischen in-vivo Modells nicht für jeden Patienten möglich. Das nur in wenigen Fällen erreichte lokal-invasive Tumorstadium bot bisher keine Möglichkeit zur Beurteilung des metastatischen Potenzials. Ein Vergleich histologischer und immunhistochemischer Kriterien in diesen Fällen konnte zwar vorgenommen werden, hat jedoch aufgrund des variablen Wachstums der verschiedenen Primärzellkulturen nur eine bedingte Aussagekraft. Dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit die Auswahl des Mausmodells und des Ausmaßes der Immundefizienz der Mäuse auf orthotope Xenograftmodelle mit zunächst möglichst immundefizienten Tieren wie NSG Mäusen eingegrenzt werden. Die Methodik, insbesondere die chirurgische Technik und die bildgebenden Verfahren, wurde optimiert. Zusätzlich konnten die Relevanz der genauen Charakterisierung der Primärzellkulturen, sowohl vor Implantation als auch nach Explantation der entstandenen Tumore, sowie einige mögliche Folgeversuche aufgezeigt werden.

Vorerst sollte die Entwicklung weniger, aber gut charakterisierter, repräsentativer orthotoper Xenograftmodelle im Vordergrund zukünftiger Bemühungen stehen. Diese kämen dann für die Beantwortung weiterer konkreter Fragestellungen in Betracht.

Summary

A large part of the findings from experimental research on renal cell carcinoma cannot be transferred to everyday clinical practice and patient care due to a lack of stable, representative in-vivo models. Time-consuming and expensive tumor grafts represent realistic mouse models, though the extent of tumor growth is limited, as are the possibilities for standardization and parallel in-vitro experiments. Established cell lines generated from aggressive tumors such as CAKI-2, which were used here, have been in culture for decades. Xenograft models developed with these cells cannot unrestrictedly represent the complexity of clinically proven renal cell carcinoma. Frequently used mouse models like subcutaneous xenografts can neither be used due to their simplicity and their limitations regarding the tumor microenvironment, metastatic potential and tumor heterogeneity. These limitations lead to a heavily impaired translation of experimental results to human renal cell carcinoma.

Therefore, the goal of this work was to develop a personalized preclinical in vivo model of renal cell carcinoma by combining two established techniques. The first technique is renal cell carcinoma primary cultures, the second one is orthotopic renal cell carcinoma xenograft models. The aim was to investigate if, by the combination of these two techniques, locally invasive tumor growth is possible, to what extent metastatic behavior of the human tumors can be reproduced and if histology and immunohistochemistry of the tumors grown in mice match those of the tumors that have grown in humans.

First, renal cell carcinoma primary cultures were implanted into the renal subcapsular space of immunodeficient mice. Additionally, intact pieces of tumor tissue were used for renal subcapsular implantation in some cases. The primary cell cultures and tumor pieces came from synchronous metastasized, metachronous metastasized or non-metastatic human tumors. Furthermore, a primary cell culture generated from an adrenal metastasis could be implanted. The CAKI-2 cells already used in the preliminary work were used as well as a control for the methodology. All primary cell cultures considered for implantation were first characterized by immunofluorescence double staining with CK, PAX8 and CD90. Afterwards, mice were examined in a 10 - 55-week follow-up using established imaging methods for small animals. Here, high-resolution 3D ultrasonography, contrast-enhanced micro-CT (μ CT) and 9.4T MRI were used. Macroscopic evaluation of the resulting lesions and tumors were made by explanting the operated kidneys. These were further analyzed by histology and immunohistochemistry. In addition to hematoxylin & eosin staining, the specimens were also stained by immunohistochemistry using antibodies against Ki67, HUNU, Ku70, CAIX, CD90, PAX8, CK and Vimentin.

In a period of about two years, a total of 48 mice were operated. To evaluate the relevance of the extent immunodeficiency in mice, three different mouse strains (BALB/c nude, CB17 SCID and NSG) were used. 12 different primary cell cultures and four different tumor pieces were implanted under the renal capsule of the mice. Despite of variation of mouse strains and implanted materials as well as optimization of the surgical technique and imaging methods, we only detected tumor growth of the already established cell line CAKI 2 in three mice and eight macroscopic lesions and four macroscopic tumors in the mice with primary cell lines. After histological and immunohistochemical processing, the histological characteristics and marker expression patterns typical of renal cell carcinoma could nearly be reflected in our xenografts. In no case metastatic potential could be found.

Overall, it was not possible to establish an individualized preclinical in-vivo model for every patient. Invasive tumor growth in such few cases could not provide the possibility of evaluating the metastatic potential of this model. Histological and immunohistochemical staining of the grown tumors showed results matching well with the marker expression pattern of human renal cell carcinomas, however, these results are limited by the low number of successfully engrafted primary cell lines. Nevertheless, within this work, the selection of the appropriate mouse model and the extent of the immune deficiency of mice could be limited to orthotopic xenograft models with strongly immunodeficient animals such as NSG mice. Despite the variation of mouse strains and implanted materials, also optimization of the surgical techniques and imaging methods have been optimized. In addition, the importance of characterization of primary cell cultures before implantation and after explantation and possible follow-up experiments could be demonstrated.

For the moment, the development of several well-characterized, representative orthotopic xenograft models should be aimed at in future experiments. These could then be used for answering further specific questions.

1. Einleitung

1.1 Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

2-3% aller Tumorerkrankungen weltweit entfallen auf Nierenzellkarzinome (Ljungberg 2016). Mit ca. 15.000 Neuerkrankungen und ca. 5.000 Sterbefällen (Robert-Koch-Institut 2017) jährlich ist das Nierenzellkarzinom in Deutschland bei Frauen die häufigste, bei Männern die dritthäufigste, maligne, urologische Tumorerkrankung nach Prostata- und Harnblasenkarzinomen (Abb. 1). Die Rate der Neuerkrankungen liegt bei Männern etwa doppelt so hoch wie bei Frauen (Abb. 2). So lag die Anzahl der neu erkrankten Männer in Deutschland 2014 bei ca. 9.500, die der Frauen hingegen bei nur etwa 5.500 (Robert-Koch-Institut 2017). Hierbei konnte ein mittleres Erkrankungsalter von 67 (Männer) bzw. 72 (Frauen) Jahren im Jahr 2014 festgestellt werden (Robert-Koch-Institut 2017). Von den erkrankten Männern verstarben etwa 8% (Letalität). Die Sterberate der Frauen lag bei ca. 5%, bei einem mittleren Sterbealter von 75 (Männer) bzw. 79 (Frauen) Jahren (Robert-Koch-Institut 2017). Insgesamt konnte über die letzten Jahre eine dezente Abnahme der altersstandardisierten Sterberate beobachtet werden (Abb. 3a), wohingegen die altersstandardisierten absoluten Neuerkrankungszahlen stiegen (Abb. 3b).

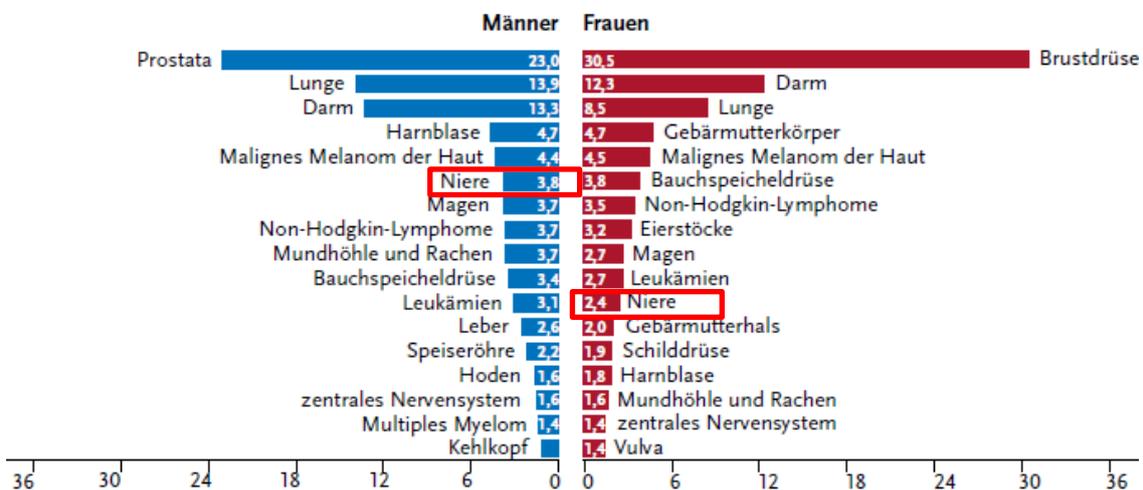


Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumor-Lokalisationen an allen Krebsfällen in Deutschland 2014. Nierentumore stehen an dritter Stelle der malignen urologischen Tumorerkrankungen nach Prostata Tumoren (11,3%) und Harnblasentumoren (3,2%) bei Männern sowie an erster Stelle der malignen urologischen Tumorerkrankungen bei Frauen vor Harnblasentumoren (1,8%). Insgesamt finden sich Nierentumore an 13. Stelle der häufigsten Tumorlokalisationen (Robert-Koch-Institut 2017).

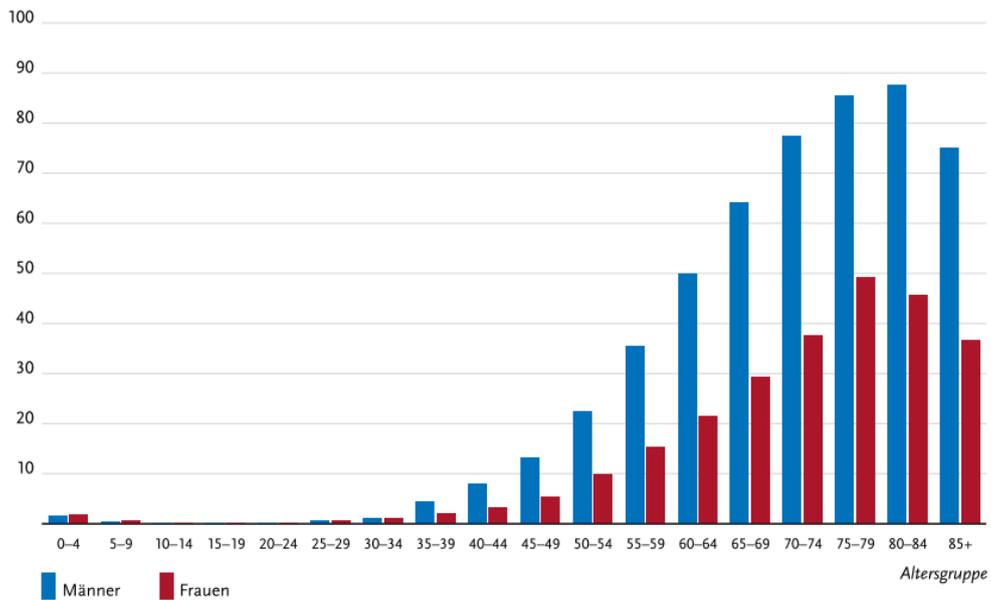
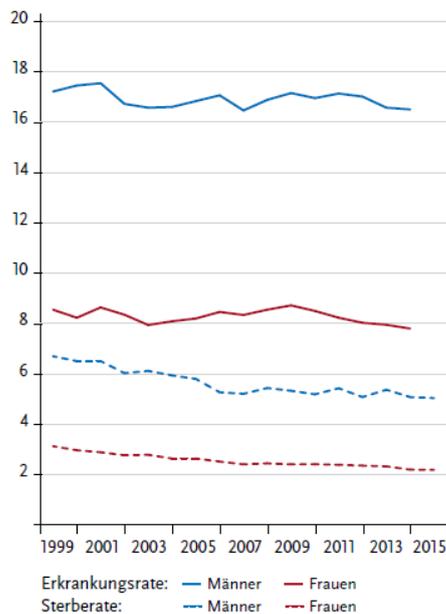


Abb. 2: Altersspezifische Erkrankungsrate nach Geschlecht, ICD 10 C64, Deutschland 2013-2014. Je 100.000 Einwohner. Die Erkrankungsrate der Männer zeigt sich in nahezu allen Altersklassen etwa doppelt so hoch wie die der Frauen (Robert-Koch-Institut 2017).

a.

[Fälle pro 100.000 Einwohner]



b.

[Fälle pro 100.000 Einwohner]

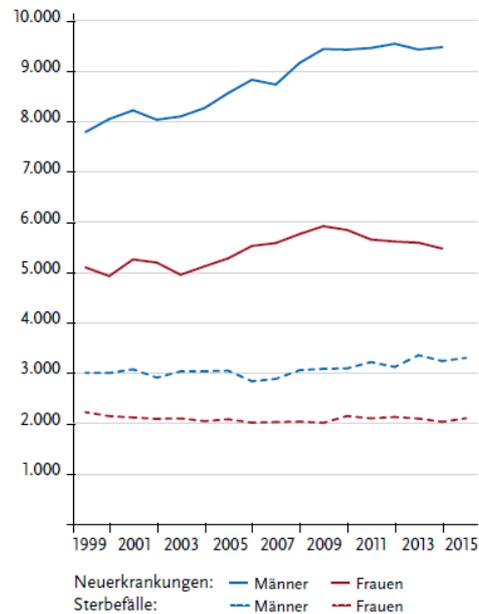


Abb. 3: a: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, ICD 10 C64, Deutschland 1999 – 2014/2015. b: Absolute Zahl der Neuerkrankungen- und Sterbefälle nach Geschlecht, ICD-10 C64, Deutschland 1999 – 2014/2015. Es zeigt sich ein dezenter Trend zur Abnahme der altersstandardisierten Sterberate seit 1999 (a). In absoluten Zahlen kann dieser Trend jedoch nicht wiedergegeben werden, diese zeigen sich weitestgehend stagnierend (b). Die altersstandardisierte Erkrankungsrate veränderte sich im aufgezeichneten Zeitraum von 16 Jahren kaum (a), in absoluten Zahlen konnte jedoch ein Anstieg der Neuerkrankungen von weniger als 8.000 Neuerkrankungen der Männer 1999 auf etwa 9.500 Neuerkrankungen 2015 verzeichnet werden (b). Auch bei den Frauen konnte ein Anstieg von etwa 500 Neuerkrankungen bis 2015 beobachtet werden (b) (Robert-Koch-Institut 2017).

Eine insgesamt relativ günstige Prognose des Nierenzellkarzinoms zeigt die 5-Jahres Überlebensrate, welche sowohl bei Männern als auch bei Frauen zuletzt stadienübergreifend bei 77% lag (2013-2014). Die 10-Jahres Überlebensrate im selben Jahr lag bei ca. 70% (Robert-Koch-Institut 2017). Diese stadienübergreifend günstige Prognose ist jedoch vor allem darauf zurückzuführen, dass Nierenzellkarzinome heutzutage aufgrund der weiten Verbreitung hochauflösender bildgebender Verfahren meist in frühen, organbegrenzten Stadien diagnostiziert werden. Bei Vorliegen von Metastasen ist das Nierenzellkarzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert (Albers, Lorch et al. 2017). Zu den bekannten Risikofaktoren für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms (RCC= renal cell carcinoma) zählen Nikotinkonsum, arterielle Hypertonie, Adipositas und mangelnde körperliche Aktivität. Die familiäre Disposition spielt bei ca. 4% der Nierenzellkarzinom-Neuerkrankungen im Rahmen verschiedener kongenitaler Syndrome eine Rolle (Robert-Koch-Institut 2017). Bei Vorliegen des von-Hippel-Lindau-Syndroms (VHL= von-Hippel-Lindau) erkranken ca. 70% der Betroffenen vor dem 60. Lebensjahr am klarzelligen Nierenzellkarzinom (ccRCC= clear cell renal cell carcinoma). Auch eine Assoziation mit dem Birt-Hogg-Dubé-Syndrom, der hereditären Leiomyomatose und dem hereditären papillären Nierenzellkarzinom ist bekannt. Der mit Abstand größte Teil der Nierentumore Erwachsener wird durch das Nierenzellkarzinom, in älteren Arbeiten auch als Hypernephrom oder Grawitz-Tumor bezeichnet, mit etwa 96% repräsentiert. Im Kindesalter hingegen finden sich vorwiegend Nephroblastome (Wilms-Tumore), jedoch mit deutlich geringerer Inzidenz und Prävalenz als die der Nierenzellkarzinome (Robert-Koch-Institut 2017).

1.1.2 Klassifikation und Stadieneinteilung

Histopathologisch werden die Nierenzellkarzinome durch die World Health Organization (WHO) und die International Society of Urological Pathology (ISUP) in der Vancouver-Klassifikation eingeteilt (Warren 2018). Hauptvertreter sind das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC) mit etwa 70-90%, das papilläre Nierenzellkarzinom Typ 1 und 2 (pRCC=papillary renal cell carcinoma) mit 10-15% und das chromophobe Nierenzellkarzinom (chRCC=chromophobe renal cell carcinoma) mit 3-5% (Ljungberg 2016, Warren 2018, (DGHO) and (DGU) 2023). Zudem existieren weitere, seltenere (1-2%) Subtypen, wie z.B. das Ductus Bellini Karzinom oder mit bestimmten genetischen Aberrationen assoziierte Subtypen wie das Succinatdehydrogenase-defiziente RCC oder Translokations-Tumore. Die klinische Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms erfolgt anhand der TNM Klassifikation, diese wurde zuletzt 2012 überarbeitet (Albers, Lorch et al. 2017, (DGHO) and (DGU) 2023).

Tab. 1: TNM-Klassifikation des klarzelligem Nierenzellkarzinoms (nach 2009, mit Überarbeitung 2012) (Albers, Lorch et al. 2017)

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T1	Tumor begrenzt auf die Niere und ≤ 7 cm
• T1a	Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung
• T1b	Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor begrenzt auf die Niere und > 7 cm
• T2a	Tumor begrenzt auf die Niere und 7-10 cm
• T2b	Tumor begrenzt auf die Niere aber > 10 cm
T3	Tumor breitet sich bis in größere Venen aus oder infiltriert perirenales Gewebe, aber nicht die ipsilaterale Nebenniere und nicht über die Gerota´sche Faszie hinaus
• T3a	ausgeprägte Tumorausdehnung in die Nierenvene(n) oder deren segmentale (muskuläre) Äste, oder Tumor befällt perirenale und/oder renale Fettkapsel, aber nicht über die Gerota´sche Faszie hinaus
• T3b	ausgeprägte Tumorausdehnung in die V. cava inferior unterhalb des Zwerchfells
• T3c	ausgeprägte Tumorausdehnung in die V. cava inferior oberhalb des Zwerchfells oder Befall der Venenwand
T4	Tumorausdehnung über die Gerota´sche Faszie hinaus (einschließlich zusammenhängender Ausdehnung in die ipsilaterale Nebenniere)
N	Regionäre Lymphknoten
NX	regionäre Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	regionale Lymphknotenmetastasen
M	Fernmetastasen
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab. 2: Klinische Stadieneinteilung des klarzelligem Nierenzellkarzinoms (Albers, Lorch et al. 2017)

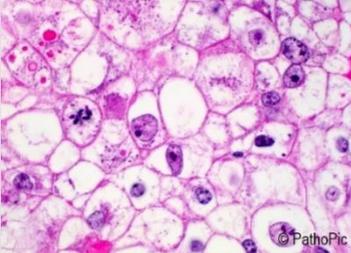
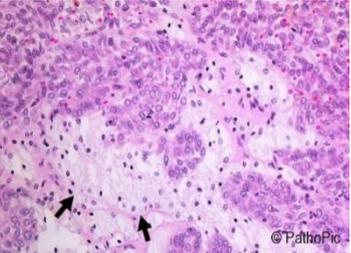
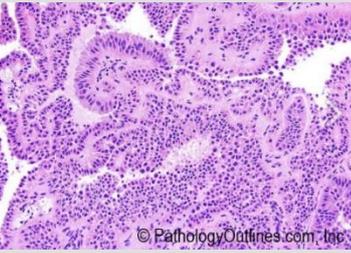
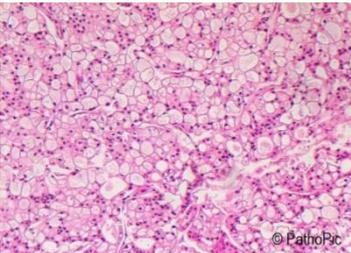
Stadium	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
IV	T4	jedes N	M0
	jedes T	jedes N	M1

1.1.3 (Histo)pathologische und tumorbiologische Charakteristika

Makroskopisch typisch für die häufigsten Formen des Nierenzellkarzinoms ist eine durch knotiges Wachstum inhomogene, gelb-bräunliche Schnittfläche mit hämorrhagischen und nekrotischen Arealen (Prasad, Humphrey et al. 2006). Wachstumsverhalten und Infiltrationsmuster können je nach Subtyp variieren.

Histologisch zeigen sich ebenfalls variable Charakteristika. Hier sind aus Gründen der Übersicht die drei häufigsten Typen des Nierenzellkarzinoms aufgeführt (Tab. 3).

Tab. 3: Histologische Charakteristika des Nierenzellkarzinoms (Prasad, Humphrey et al. 2006)

Typ	Bild in HE-Färbung	Charakteristika
ccRCC	 <p>(PathoPic 2002)</p>	klares Zytoplasma, prominente Zellmembran und Vaskularisierung, eosinophile und sarkomatoide Differenzierung selten möglich
pRCC Typ I	 <p>(PathoPic 2001)</p>	aus proximalem Tubulus hervorgehende, monozytäre Schicht basophiler Zellen, die entlang papillärer, fibrovaskulärer Septen wächst, geringe Vaskularisierung
pRCC Typ II	 <p>(Nicole K. Andeen 2017)</p>	pseudostratifizierte Schichten großer Zellen mit eosinophilem Zytoplasma, atypischen Nuklei mit prominenten Nukleoli, variable Nekrosen
chRCC	 <p>(PathoPic 2003)</p>	große, polygonale Zellen mit prominenter Zellmembran und perinukleären Lichthöfen

Auch die genetische und molekularbiologische Beurteilung der histologischen Subtypen trägt heutzutage wesentlich zur Charakterisierung, dem Verständnis von Therapieansätzen und zur Therapieplanung bei (Prasad, Humphrey et al. 2006). Eine tragende Rolle spielt hierbei zunehmend das Verständnis der Tumorbiologie des Nierenzellkarzinoms, wobei der VHL-Signalweg eine zentrale Position einnimmt. Bei etwa 52% der ccRCCs liegt eine Mutation des *VHL*-Gens vor (Choueiri and Motzer 2017). Hierdurch kommt es zur Kumulation des HIF α (HIF α = Hypoxie induzierter Faktor), was eine vermehrte Angiogenese durch Hochregulation des VEGF (VEGF=vascular endothelial growth factor), Wachstumsstimulation und Proliferation des Karzinoms zur Folge hat (Abb. 4) (Choueiri and Motzer 2017). Hier findet sich auch der zentrale Angriffspunkt der VEGF-Tyrosinkinaseinhibitoren (Abb. 5) wie Axitinib, Pazopanib, Sorafenib und Sunitinib (Choueiri and Motzer 2017).

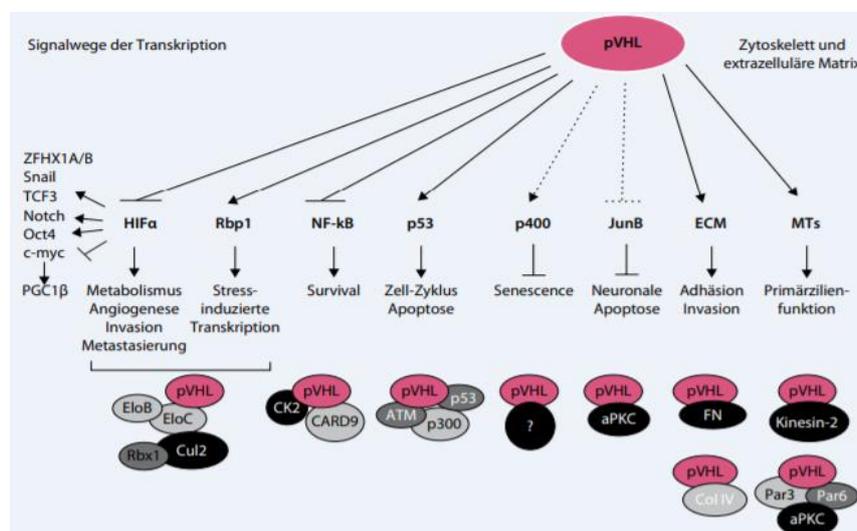


Abb. 4: Verschiedene Funktionen des pVHL (Moch 2008). pVHL als Protein, für welches das *VHL*-Gen codiert, hat multiple Funktionen in Bezug auf Inhibition und Aktivierung für die Zellen entscheidender Signale (u.a. HIF α). Beeinflusst werden neben dem Metabolismus, der Angiogenese, Invasion und Metastasierung auch Zell-Zyklus und Apoptose.

Aber auch andere Tyrosinkinasen spielen bei der zellulären Signaltransduktion der ccRCCs eine Rolle. Hierzu gehören c-MET, AXL und PDGFR, welche somit zusätzliche Angriffspunkte von neueren Tyrosinkinaseinhibitoren wie Cabozantinib darstellen (Choueiri and Motzer 2017).

Des Weiteren stellt die Aktivierung der mTOR-Signalkaskade (mTOR= mammalian target of rapamycin) im Nierenzellkarzinom einen wichtigen Signalweg bezüglich des Zellwachstums, der Zellproliferation und der Zellbeweglichkeit dar (Albers, Lorch et al. 2017), sodass sich auch hier ein zusätzlicher therapeutischer Angriffspunkt befindet (s. Abb. 5).

1.1.4 Klinik, Diagnostik und Therapie

Durch die weite Verbreitung von hochauflösender bildgebender Diagnostik wie Sonographie oder CT (CT= Computertomographie), ist bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten die Diagnosestellung in einem frühen, organbegrenzten und asymptomatischen Stadium möglich. Hier zeigen sich somit häufig keine Auffälligkeiten in der körperlichen Untersuchung (Ljungberg 2016). Im lokal fortgeschrittenen Stadium kann die in vielen Lehrbüchern beschriebene Symptomtrias aus Flankenschmerz, Makrohämaturie und palpablem abdominalem Tumor (6-10%) befundet werden (Ljungberg 2016). Von Metastasen vorrangig betroffen sind mit absteigender Häufigkeit Lunge, Weichteile (Lymphknoten, Muskeln), Knochen, Leber, ZNS und Haut (Albers, Lorch et al. 2017). Infolgedessen ergeben sich bei dem Vorliegen von Metastasen die entsprechenden Symptome wie Oberbauchschmerzen, Knochenschmerzen, pathologische Frakturen oder Hämoptysen (Ljungberg 2016).

Diagnostisch ist, wie oben angemerkt, die Schnittbildgebung federführend. Sonographisch, ggf. auch kontrastmittelgestützt, lassen sich größere Nierentumore und daraus resultierende Harnabflussstörungen leicht detektieren (Albers, Lorch et al. 2017).

Computertomographisch kann sowohl über Funktion, Morphologie, Lage und Vaskularisierung der Nieren als auch über Größe, Form, Position, Eigenschaften und Invasion eines Nierentumors sowie über den entsprechenden Lymphknotenstatus Aussagen getroffen werden (Albers, Lorch et al. 2017). Hierzu dient am ehesten ein 3-Phasen-CT, wobei im Vergleich der Kontrastmittelpphase zur Nativphase eine deutliche Kontrastmittelanreicherung von mehr als 15 Hounsfield-Einheiten (HU= Hounsfield-Einheiten) vor allem solider Tumoren zu erwarten ist (Albers, Lorch et al. 2017). Zur Unterscheidung von Nierenzysten und zystisch wachsenden Nierenzellkarzinomen wurde die sogenannte Bosniak-Klassifikation entwickelt. Einen genaueren Aufschluss über die Infiltration von Nachbargewebe und venösen Gefäßen, wie v.a. der V. renalis und der V. cava inferior, liefert die Magnetresonanztomographie (MRT= Magnetresonanztomographie) (Albers, Lorch et al. 2017). Selten kommt auch die Nierenfunktionsszintigraphie zur ausgiebigeren Diagnostik zum Einsatz (Ljungberg 2016).

Das Therapiekonzept des Nierenzellkarzinoms ist von oben genannten Faktoren, vor allem aber dem klinischen Stadium abhängig. Bei organbegrenzten Tumoren erfolgt in der Regel wenn möglich eine operative Therapie im Sinne einer Nierenteilresektion oder einer radikalen Tumornephrektomie. Kleinere Nierentumore und/oder Tumore bei sehr alten, komorbiden Patienten können alternativ aktiv überwacht oder mittels lokal-ablativen Therapieverfahren wie Radiofrequenzablation oder Kryoablation behandelt werden. Falls eine dieser Optionen in Betracht kommt, sollte vorher stets eine histologische Sicherung mittels Tumorbiopsie erfolgen, um einen gutartigen Befund (z.B. Onkozytom)

auszuschließen (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) 2020, (DGHO) and (DGU) 2023).

Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom werden zunächst anhand von klinischen und Laborparametern in verschiedene Prognosegruppen eingeteilt, hierzu werden entweder der MSKCC- oder der IMDC-Score verwendet (Motzer, Mazumdar et al. 1999, Motzer, Bacik et al. 2002, Heng, Xie et al. 2009). Die Einteilung erfolgt in eine günstige, eine mittlere und eine schlechte Prognosegruppe (Ljungberg 2016). Durch eine zytoreduktive Tumornephrektomie kann eine Linderung von lokalen, durch den Primärtumor bedingten Beschwerden wie Schmerzen oder Makrohämaturie erreicht werden. Diese sollte bei allen Patienten diskutiert werden, die solche Symptome präsentieren (Albers, Lorch et al. 2017).

Das ccRCC ist ein grundsätzlich immunogener Tumor, der einer Bekämpfung durch das körpereigene Immunsystem durchaus zugänglich ist. Dies lässt sich anhand der schon früher teils erfolgreichen Ansätze der unspezifischen Immuntherapie mit Interferon- α und IL-2 widerspiegeln. Auch bei der für lange Zeit, als Standard bei der Behandlung von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom durchgeführten zytoreduktiven Tumornephrektomie (Méjean, Ravaud et al. 2018) konnte teilweise durch die Induktion immunologischer Reaktionen eine spontane Regression der Metastasen beobachtet werden (Flanigan, Salmon et al. 2001, Mickisch, Garin et al. 2001). Der Stellenwert der zytoreduktiven Tumornephrektomie wird jedoch zunehmend kritisch beurteilt und die Behandlung mittlerweile nur noch auf bestimmte Patientengruppen begrenzt (Méjean, Ravaud et al. 2018). Zu den durch das Karzinom beeinflussten immunologischen Checkpoints gehören vor allem PD-1 (PD= programmed death protein), dessen Liganden PD-L1/PD-L2 (PD-L= programmed death ligand 1 bzw. 2) und CTLA-4 (CTLA-4= cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4). Hierdurch wird die T-zelluläre antitumorale Immunantwort reduziert und die Freisetzung von Zytokinen und zytotoxischen T-Zellen gehemmt (Choueiri and Motzer 2017), wobei hier der zentrale Angriffspunkt der Immuncheckpointinhibitoren wie Nivolumab (PD1/PD-L1-Inhibition) (Abb. 5) und Ipilimumab (CTLA-4-Inhibition) besteht (Ljungberg 2016).

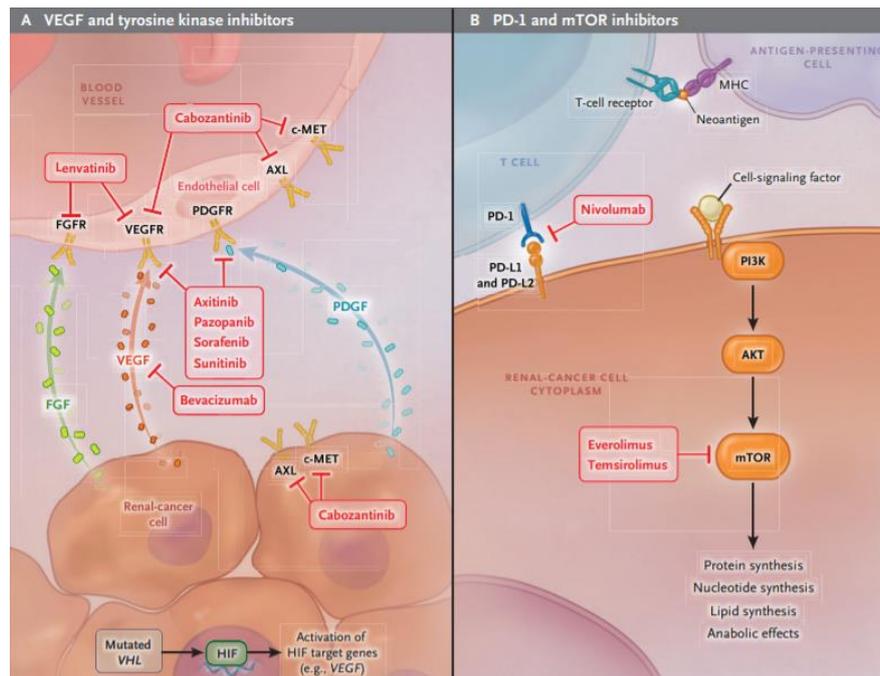


Abb. 5: A: Zentrale Angriffspunkte der VEGF- und Tyrosinkinaseinhibitoren: Neben den VEGF-Tyrosinkinaseinhibitoren wie Axitinib, Pazopanib, Sorafenib und Sunitinib mit Wirkmechanismus an den entsprechenden Rezeptoren, sind auch der VEGF-Antikörper Bevacizumab und die Tyrosinkinaseinhibitoren Lenvatinib und Cabozantinib mit ihrem jeweiligem Wirkmechanismus dargestellt.

B: Signalweg der Immuncheckpoint Inhibitoren (PD-1/PD-L1) und mTOR- Inhibitoren: Nivolumab (oben) inhibiert PD1/PD-L1/-2 und damit die Hemmung der T-Zell-Aktivierung. Everolimus und Temsirolimus (unten) als mTOR-Inhibitoren hemmen für die Zelle lebenswichtige Synthesemechanismen (Choueiri and Motzer 2017).

Zur Systemtherapie stehen somit im Wesentlichen folgende Substanzklassen zur Verfügung:

- VEGF-Tyrosinkinaseinhibitoren (Axitinib, Pazopanib, Sorafenib und Sunitinib)
- anti-VEGF Antikörper (Bevacizumab) + Interferon alpha
- weitere Tyrosinkinaseinhibitoren (Cabozantinib und Lenvatinib)
- Immuncheckpointinhibitoren (Nivolumab, Ipilimumab, Pembrolizumab, Avelumab)
- mTOR-Inhibitoren (Everolimus, Temsirolimus)

Standardmäßig wird heutzutage bei mittlerer oder schlechter Prognosegruppe eine Kombination aus zwei Immuncheckpointinhibitoren (Nivolumab und Ipilimumab) verwendet. Des Weiteren kann in allen Prognosegruppen eine Kombination aus einem Immuncheckpointinhibitor und einem (VEGF-)Tyrosinkinaseinhibitor (Pembrolizumab + Axitinib, Avelumab + Axitinib, Cabozantinib + Nivolumab) zum Einsatz kommen ((DGHO) and (DGU) 2023).

1.2 Mausmodelle

Insgesamt existieren fünf wesentliche Arten von präklinischen Mausmodellen: Syngeneic Models, GEMs (GEM= genetically engineered mouse models), Chemically-Induced Models und die Xenograftmodelle, welche wiederum in CDX (CDX= cell-derived xenografts) und PDX (PDX= patient-derived xenografts) unterschieden werden (Sobczuk, Brodziak et al. 2020). Das jeweilige Modell mit den entsprechenden Vor- und Nachteilen (siehe Kapitel 5.1.1, Tab. 8) muss je nach Fragestellung und Zielsetzung individuell gewählt werden. Im Folgenden werden im Überblick die grundlegenden Merkmale der verschiedenen Modelle aufgeführt.

In Syngeneic Models wird ein spontan wachsender Tumor in genetisch identisches Gewebe eines immunkompetenten Wirtstiers (allogen) transplantiert, wobei neben den orthotopen Syngeneic Models auch heterotope Transplantationen, z.B. subcutan oder intraperitoneal, genutzt werden können. In GEMs macht man sich die Veränderung des genetischen Materials, welches mit einer spezifischen Krankheit oder einem Karzinom assoziiert ist, zunutze. Unter der Annahme, dass die entsprechenden Gene transformiert wesentlich zur Malignität beitragen, werden hier Mutationen, Deletionen oder Erhöhungen der Expression durch verschiedene gentechnische Methoden in dem Zielgewebe vorgenommen, was dann zur spontanen Entwicklung von Tumoren in den Tieren führt. Die Chemically-Induced Models zeichnen sich i.d.R. durch einmalig injizierte karzinogene Chemikalien aus, welche dann zur Entwicklung der entsprechenden Karzinome (orthotop) führen. Xenograftmodelle basieren generell auf der Implantation von humanen (Tumor) Zellen oder humanem (Tumor) Gewebe in einen immundefizienten Wirt, vorrangig Mäuse. Werden hierzu etablierte Zelllinien verwendet, spricht man von cell-derived xenografts. In der Regel stammen die Zellen oder Gewebe jedoch aus Biopsien/ OP-Proben von primären oder metastasierten humanen Karzinomen. Ein solches Modell wird als patient-derived xenografts zeichnet (Sobczuk, Brodziak et al. 2020).

1.3 Vorarbeiten – orthotopes Xenograftmodell

In Vorversuchen wurden entsprechende Techniken der renal-subkapsulären Tumorzell-implantation und bildgebende Verfahren zur Nachbeobachtung des Tumorwachstums etabliert. Hierzu wurde in einem CDX eine etablierte humane RCC-Zelllinie (CAKI-2) unter die Nierenkapsel 16 immundefizienter Mäuse injiziert (CB17-SCID). Durch regelmäßige, nichtinvasive Verlaufskontrollen mittels bildgebender Verfahren (Sonographie: Visual Sonics Vevo 770, Kontrastmittel-CT: Bruker Skyscan 1176, 9.4T MRT: Bruker Biospec 94/20) konnte bei allen Tieren ein erfolgreiches Anwachsen und auch eine Metastasierung der Tumore beobachtet werden (Abb. 6) (Linxweiler, Korbelt et al. 2017).

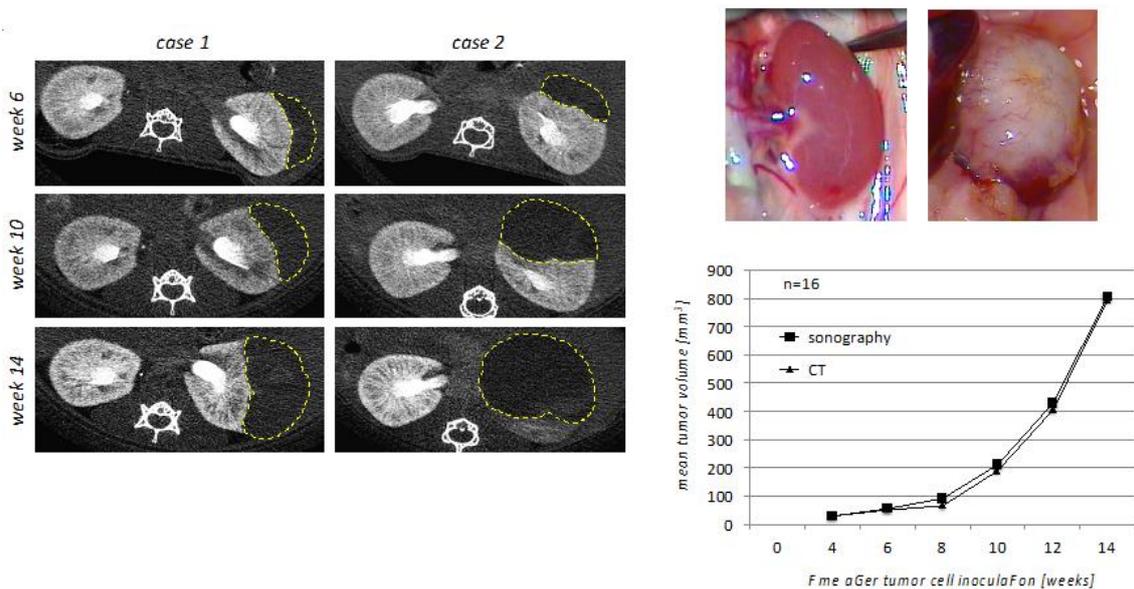


Abb. 6: Vorarbeiten zum orthotopen Xenograftmodell – Tumorwachstum nach renal subkapsulärer Implantation von 1×10^6 CAKI-2 Zellen. Links: CT-Bilder zweier Fälle 6, 10 und 14 Wochen nach Implantation. Die Tumore sind durch die gelb gestrichelte Linie markiert. **Rechts oben:** Makroskopische Bilder. Im linken Bild ist die gesunde, linke Niere einer 22 Wochen alten Maus zu sehen, rechts im Vergleich eine linke Niere einer 22 Wochen alten Maus mit Nierentumor. **Rechts unten:** Volumina der Tumore in der CT und in der Sonographie 4, 6, 8, 10, 12 und 14 Wochen nach orthotoper Implantation (Linxweiler, Korbelt et al. 2017).

2. Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Etablierung eines personalisierten präklinischen in-vivo Modells des Nierenzellkarzinoms in Form patientenabgeleiteter, orthotoper Xenografts in immundefizienten Mäusen. Hierbei sollte neben dem Anwachsen nicht metastasierter auch das unterschiedliche metastatische Potenzial synchron und metachron metastasierter Nierenzellkarzinome im Tiermodell reproduziert werden. Ein weiteres zentrales Ziel war es, einen Vergleich der Histologie der humanen Nierenzellkarzinome mit der Histologie der im Mausmodell angewachsenen Tumore anzustellen.

Die Kombination zweier etablierter Techniken, Nierenzellkarzinom-Primärkulturen zum einen und orthotopen Mausmodellen urologischer Tumoren zum anderen sollte zielführend sein. Auf diesem Weg sollte untersucht werden, ob ein Anwachsen der Primärkulturen unter der Nierenkapsel erfolgreich möglich ist, ob hierbei lokal-invasive Tumore entstehen und ob diese im Verlauf metastasieren.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Bruker Biospin GmbH, Ettlingen	Biospec Avance III 94/20 Kleintier-MRT
Bruker Biospin GmbH, Ettlingen	linear polarisierte Spule für MRT, 38mm
Bruker Corporation, Billerica USA	Bruker Skyscan 1176 MikroCT
Bruker Corporation, Billerica USA	MRT Software ParaVision 5.1
Bruker Corporation, Billerica, USA	CT An Software
Bruker Corporation, Billerica, USA	NRecon Rekonstruktionssoftware
Dako, Glostrup, Dänemark	REAL™ Detection System Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse (LSAB-Detektionssystem für IHC)
Ethicon, Summerville, USA	5/0 VICRYL RAPID Naht
FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Canada	Visual Sonics Vevo 2100 Kleintier-Sonographiegerät
Hamilton Company, Reno, USA	Glaspipette 10µl
Indus Instruments, Houston, USA	Temperatur- und Herzfrequenzkontrolle
Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz	Stereomikroskop Leica (M651)
SA Instruments, Inc., Stony Brook, USA	PC-SAM32
Smiths Medical, Dublin, USA	Graseby-Säuglingsatmungssensor Kontrollsystem für Mäuse (THM100)

3.1.2 Chemische Materialien

B. Braun, Melsungen	Aqua destillata
	BSA-Granulat
Dako, Glostrup Dänemark	Target Retrieval Solution (S1699)
Dako, Glostrup, Dänemark	Antibody Diluent
GE Healthcare, Chalfont St. Giles UK	Accupaque 300, iodhaltiges Kontrastmittel
Mephisto, Frankfurt am Main	Hämatoxylin nach Böhmer
Merck, Darmstadt	Entellan Eindeckmedium
Merck, Darmstadt	Formaldehyd

Merck, Darmstadt	Methanol
Merck, Darmstadt	Natriumchlorid
Merck, Darmstadt	Tris(hydroxyethyl)-aminomethan
Sigma-Aldrich, Steinheim	Mayers Hämatoxylin Solution
Sigma-Aldrich, Steinheim	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, niedriger Glucosegehalt)
Sigma-Aldrich, Steinheim	Phosphat-Puffer-Tabs (100TAB)
Sigma-Aldrich, Steinheim	Tween-20
VectorLaboratories, Burlingame, California USA	VectaSHIELD Hard Set + DAPI
Zentrales Chemikalienlager UKS, Homburg	Ethanol 99,9%
Zentrales Chemikalienlager UKS, Homburg	Xylol, Isomergemisch reinst

3.1.3 Antikörper

Tab. 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper. IHC = Immunhistochemie, IF = Immunfluoreszenz

Name	Herkunft	Herstellungsart	Spezies	Verdünnung IHC/IF
Anti-KU70	Abcam, Cambridge (USA)	polyklonal	Kaninchen	1:200
Anti-Pan-CK	Dako, Glostrup (Dänemark)	monoklonal	Maus	1:100
Anti-Vimentin	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main	monoklonal	Kaninchen	1:100
Anti-Ki67	Dako, Glostrup (Dänemark)	monoklonal	Maus	1:200
Anti-HUNU	Merck, Darmstadt	monoklonal	Maus	1:100
Anti-Human CD90	dianova GmbH, Hamburg	monoklonal	Maus	1:200
Anti-PAX8	ProteinTech Group, Chicago (USA)	polyklonal	Kaninchen	1:50
Anti-CAIX	Abcam, Cambridge (USA)	polyklonal	Kaninchen	1:100
Anti-Kaninchen- /Maus-IgG, biotiny- liert (Sekundäranti- körper)	Dako, Glostrup (Dänemark)	polyklonal	Ziege	gebrauchsfertige Lösung (Bestandteil des Dako REAL™ De- tection Kit)

3.1.4 Primärzellkulturen

Die verwendeten Primärzellkulturen stammen von Nierenteilresektions-, Tumornephrektomie- oder Metastasenresektionspräparaten aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Zustimmung der Ethikkommission Nr. 141/14). Unmittelbar nach Resektion der Tumore bzw. Metastasen (Abb. 7) wurde eine Frischgewebeprobe entnommen, diese in DMEM Medium überführt und in das Forschungslabor der Klinik gebracht. Nach mechanischer Zerkleinerung der Gewebeprobe wurden diese in Zellkulturflaschen überführt und jeweils mit einem Tropfen DMEM Medium beschichtet. Diese Tumorstücke wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkultur-Brutschrank kultiviert bis es zum Auswachsen adhärenter, epithelialer Zellen kam.

Die Tumorstücke wurden entfernt und die Zellen weiter subkultiviert. Die Passagierung erfolgte bei einer maximalen Konfluenz von 80-90%. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit PBS (Sigma Aldrich GmbH) gewaschen. Zur Ablösung der Zellen erfolgte die Inkubation im Brutschrank nach Zugabe von Trypsin/EDTA (Sigma Aldrich GmbH). Anschließend wurden die Zellen in einem Zentrifugenröhrchen mit Medium bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstands konnte das Zellpellet im gewünschten Volumen der Zellkulturflasche (Abb. 7) überführt werden.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben mittels Trypsin/EDTA abgelöst. Es folgte die Zentrifugation, Abnahme des Überstands und Resuspension der Zellen in 2 ml DMEM mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich GmbH) und 30% FKS. In 2 ml Kryoröhrchen wurde die Suspension dann bei -80°C eingefroren. Zur Langzeitlagerung mussten die Kryoröhrchen in den Stickstofftank gebracht werden.

Nach schonendem Auftauen der Zellen (auf Eis) wurden diese in 5 ml Medium resuspendiert und erneut bei 300 g für 3 min im Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde wieder resuspendiert und in Zellkulturflaschen gebracht. Kultiviert wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Anschließend erfolgte die Charakterisierung mittels Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 7; 3.2.5).

Für diese Arbeit wurden bereits etablierte und kryokonservierte Primärkulturen sowohl nicht metastasierter als auch metachron und synchron metastasierter Tumore, aber auch aus u.a. Nebennierenmetastasen generierte Primärkulturen verwendet.

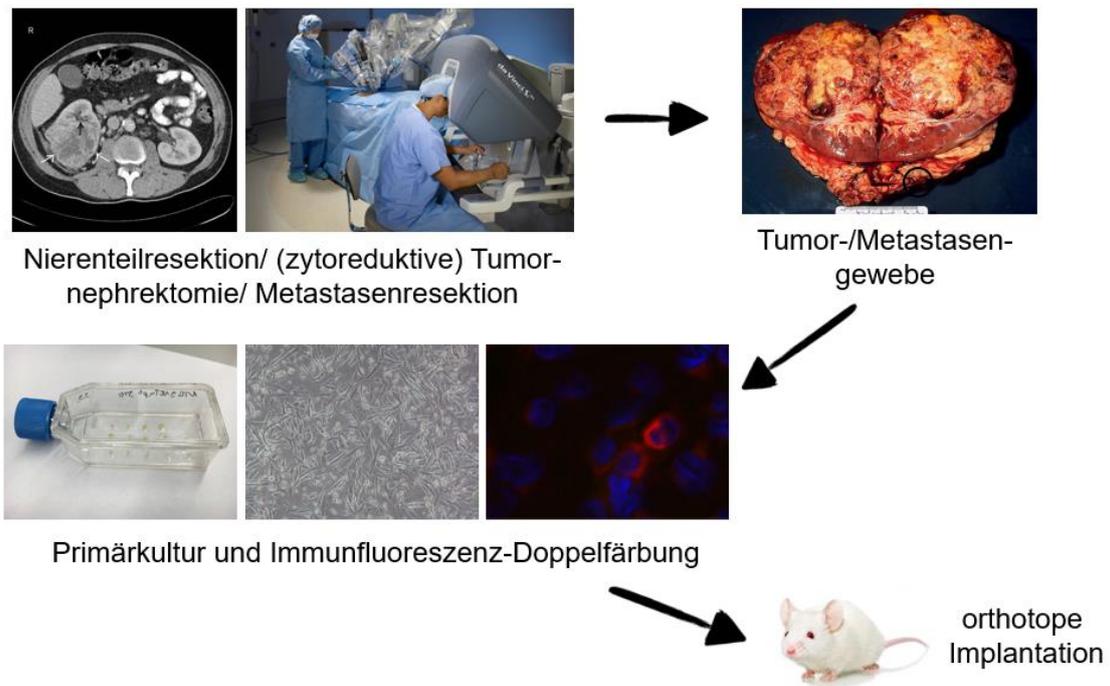


Abb. 7: Weg der Generierung und Charakterisierung der RCC-Primärzellkulturen, sowie deren Einsatz im PDX-Mausmodell. Nach Tumornephrektomie/Nierenteilresektion oder Metastasenresektion erfolgt die Generierung der Primärzellkulturen und deren Mikroskopie. Weiter wird die Kultivierung von Zellen eines RCC mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung bestätigt, sodass diese schließlich für die Implantation in die Maus und somit für die Generierung von PDX-Modellen zur Verfügung stehen.

3.2 Methoden

3.2.1 OP-Verfahren

Die Injektionen der RCC-Primärzellkulturen unter die Nierenkapsel der Mäuse wurden im Kleintier-OP des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (IKEC) durchgeführt. Nach Wiegen der Maus wurden 75 mg/kg Körpergewicht (KG= Körpergewicht) Ketamin und 15 mg/kg KG Xylazin intraperitoneal injiziert (Injektionsnarkose). Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde die Maus in Rechtsseitenlage fixiert. Die gesamte OP fand mit Sicht durch ein Stereomikroskop (Leica M651; Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) bei 10- bis 25-facher Vergrößerung statt. Zunächst wurde ein 5-7 mm langer Hautschnitt unterhalb der linken Flanke, parallel zum Rippenbogen, durchgeführt (Abb. 9 A). Nachfolgend wurde die Muskelschicht der Rumpfwand durchtrennt (Abb. 9 B), die Niere mittels seitlichen Drucks der Finger nach außen mobilisiert (Abb. 9 C) und durch eine Pinzette fixiert (Abb. 9 D). Die zu injizierende Zellsuspension (in einer Matrigel:Medium Mischung) wurde vor jeder Injektion erneut suspendiert und anschließend 10 µl pro Maus in eine gekühlte 10 µl Hamilton Pipette aufgezogen. Die Pipette wurde zwischen jeder Injektion mit 0,9% NaCl-Lösung gespült. Im Rahmen der renal-subkapsulären Injektion wurde die Nierenkapsel zunächst mittels eines Tupfers mit 0,9% NaCl-Lösung befeuchtet, bevor mit der Hamilton Pipette die Nierenkapsel angestochen (Abb. 9 E) und vorsichtig ein Injektionskanal unterhalb dieser in kaudo-kranialer Richtung präpariert wurde (Abb. 9 F). Die Nadel wurde während der Injektion an der Einstichstelle durch einen Tupfer fixiert und so der Injektionskanal zugedrückt (Abb. 9 G), um ein größeres Recoil zu verhindern. Der Assistent betätigte den Stempel zur Injektion. Nach erfolgreichem Entfernen der Pipette, wurde für ca. eine Minute Druck auf den Injektionskanal ausgeübt (Abb. 9 H), bis das Matrigel sichtbar verhärtet war (Abb. 9 I). Die Niere wurde daraufhin wieder nach intraperitoneal verlagert (Abb. 9 J) und sowohl Muscularis (Abb. 9 K) als auch Cutis (Abb. 9 L) mittels Einzelknopfnäht unter Verwendung synthetischen resorbierbaren Nahtmaterials (5/0 VICRYL RAPID Naht (Ethicon, Somerville, USA)) vernäht. Während des gesamten Narkosezeitraums wurden die Vitalparameter der Maus unter Sichtkontrolle der Atemfrequenz überprüft und bei Bedarf eine Wärmelampe zur Stabilisierung der Körpertemperatur verwendet.

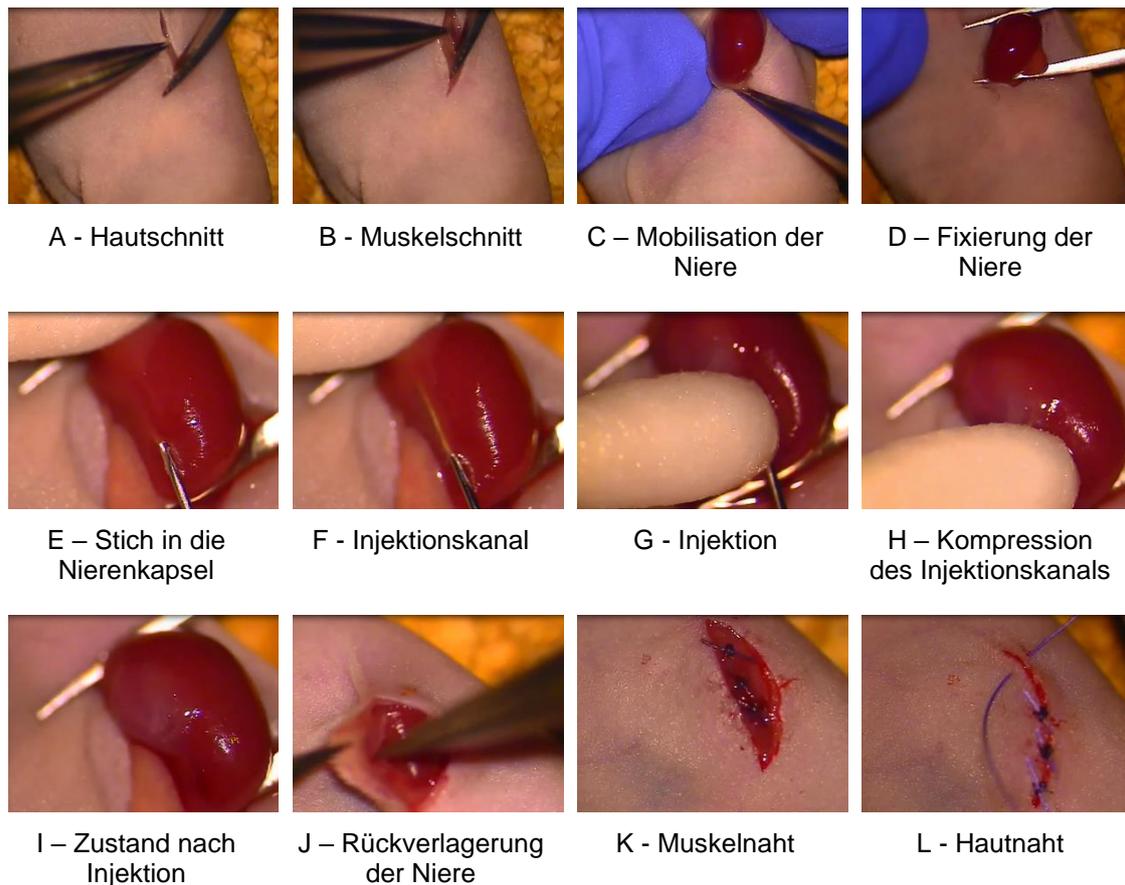


Abb. 8: Arbeitsschritte des OP-Verfahrens. Die Abbildung zeigt die Schritte (A-L) zur renalen subkapsulären Injektion.

Zur Implantation der Tumorstücke wurde bis zur Freilegung und Mobilisation der Niere verfahren wie bei der Injektion der kultivierten Zellen. Daraufhin wurde die Nierenkapsel eröffnet und stumpf eine subkapsuläre Implantationstasche präpariert. Das Tumorstück (ca. 2-3 mm³) wurde unter der Nierenkapsel vorgeschoben und war so fixiert. Nach Implantation des Tumorstücks wurde die Operation wie oben beschrieben beendet.

3.2.2 Versuchstiere

Voraussetzung für eine erfolgreiche Xenotransplantation von humanen Primärtumorgeben und etablierten, humanen Zellkulturen auf einen murinen Hintergrund ist eine spezifische Immundefizienz des Wirtsorganismus. Hierbei handelt es sich um eine vor allem die T-Zellen betreffende Immundefizienz. Die folgend aufgeführten Mausstämme wurden durch die Versuchsleiter bereits mehrfach in vorherigen Versuchsvorhaben eingesetzt. Zur besseren gemeinsamen Käfighaltung wurden weibliche Tiere verwendet. Das stabilste Anwachsen des implantierten, humanen Materials konnte in Vorversuchen im Alter von 6-8 Wochen beobachtet werden, da die Niere zu diesem Zeitpunkt die entsprechende Größe zur subkapsulären Implantation besitzt und die Nierenkapsel, im Gegensatz zu der älterer Tiere, die notwendige Stabilität aufweist.

3.2.2.1 BALB/c-Nude Mäuse

Es wurden weibliche BALB/c-Nude Mäuse (CAnN.Cg-FOXn1^{nu}/Crl), 6-8 Wochen alt, der Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH in Sulzfeld (Deutschland) verwendet. Diese zeichnen sich durch einen fehlenden Thymus und somit Abwesenheit thymusabhängiger T-Lymphozyten aus. B-Zellen und NK-Zellen sind in Anzahl und Funktion nicht beeinträchtigt. Das Gewicht der Mäuse liegt zwischen 12 g und 20 g pro Maus, welche in vorliegender, homozygoter Form nackt und unpigmentiert sind (Charles River Laboratories 2017).

3.2.2.2 CB17-SCID Mäuse

Die weiblichen homozygoten SCID Mäuse (SCID= severe combined immunodeficiency) (CB17(Icr-Prkdc^{scid}/IcrlcoCrl)), albino, 6-8 Wochen alt, der Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH in Sulzfeld (Deutschland), weisen ein Defizit der Entwicklung lymphatischer Organe auf, wodurch funktionslose B- und T-Zellen, eine Lymphopenie und Hypoimmunglobulinämie vorliegen. Das Gewicht der Tiere liegt bei 14 g - 20 g pro Maus (Charles River Laboratories 2017).

3.2.2.3 NOD SCID gamma Mäuse

Die weiblichen NOD SCID gamma (NOD= non-obese diabetic; NSG= NOD SCID gamma) Mäuse (NOD.Cg-Prkdc^{scid1}/2rg^{tm1Wj}/Sz), 6-8 Wochen alt, der Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH in Sulzfeld (Deutschland), weisen eine maximale Immundefizienz durch fehlenden IL-2 Rezeptor und *scid* Mutation im *PRKDC* Gen auf (The Jackson Laboratory 2018). Infolgedessen sind weder funktionelle B-, T-, noch NK-Zellen vorhanden. Das Gewicht der Tiere beträgt zwischen 18 g und 24 g pro Maus (Charles River Laboratories 2017).

Tab. 5: Für die in-vivo Versuche verwendete Mausstämme. NK-Zellen = natürliche Killerzellen (Charles River Laboratories 2017, The Jackson Laboratory 2018)

	BALB/c-Nude	CB17 SCID	NOD SCID gamma
Haare	-	+	+
T-Zellen	-	-	-
B-Zellen	+	-	-
NK-Zellen	+	+	-

3.2.2.4 Tierhaltung

Die Tiere wurden im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes als „spezifiziert pathogenfrei“ (SPF= spezifisch pathogenfrei) in isoliert belüfteten Käfigen (IVC= isolated, ventilated cages) mit 60-70 Luftwechseln/h gehalten. Weitere Unterbringungsbedingungen waren unbegrenzte Verfügbarkeit von Wasser und Futter, ein geregelter Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h/12 h bei 60-400 lx Beleuchtung im Tagrhythmus, eine Temperatur von 20-24 °C, Luftfeuchte von 55% \pm 10, Lautstärke von 50-85 dB und tägliche Kontrollen des Gesundheitszustandes. Alle experimentellen Vorhaben wurden durch die Tierschutzkommission des Saarlandes genehmigt (Antrag Nr. 28/2014).

3.2.3 Follow-up Methoden

3.2.3.1 Sonographie

Unter Inhalationsnarkose mit Isofluran wurde die hochauflösende 3D Kleintiersonographie mittels des Visual Sonics Vevo 2100 Kleintier-Sonographiegerätes (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Canada) durchgeführt (Abb. 10). Zur Einleitung wurden 2 l O₂/min mit 4% Isofluran, erhaltend 2 l Raumluft/min mit 2% Isofluran verwendet. Unter regelmäßiger Kontrolle der Körpertemperatur und der Vitalfunktionen (Temperatur- und Herzfrequenzkontrollsystem für Mäuse THM-100; Indus Instruments, Houston, USA) wurden die in Rechtsseitenlage fixierten Tiere sonographiert. Im 3D-acquisition mode fuhr durch einen motorisierten Mechanismus der Ultraschallkopf linear über den zu sonographierenden Bereich und übertrug axial/ transversal 2D-Bilder in 100 μ m Intervallen mit einer Frequenz von 30 MHz.

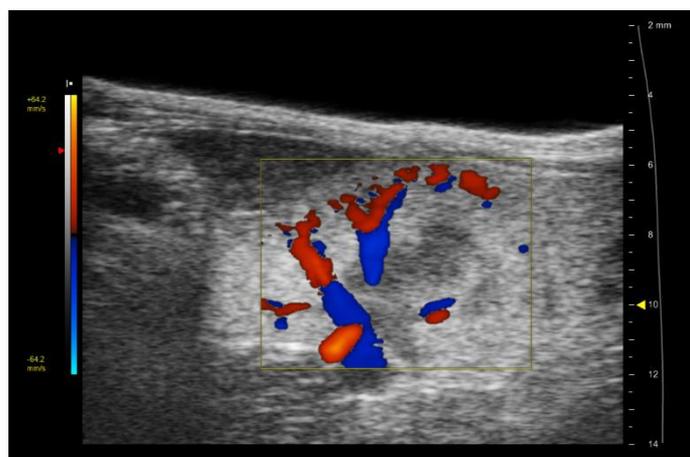


Abb. 9: links: Visual Sonics Vevo 2100 Kleintier-Sonographiegerät (FUJIFILM VisualSonics 2020) Rechts: Beispielbild einer Doppler-Sonographie der linken Niere einer Maus (Aufnahme vom 22.05.2017).

3.2.3.2 Kontrastmittel-CT

Die CT Kontrollen wurden nach etablierter Methode nach Linxweiler et al. mittels des Bruker Skyscan 1176 in-vivo micro CT Gerätes (Bruker Corporation, Billerica, USA) durchgeführt (Linxweiler, Korbelt et al. 2017). Die CT-Bildgebungen fanden unter Inhalationsnarkose mit Isofluran statt. Zur Einleitung wurden 2l O₂/min mit 4% Isofluran, erhaltend 2 l Raumluft/ min mit 2% Isofluran verwendet. Iodhaltiges Kontrastmittel (200 µl pro Maus; Accupaque 300, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) wurde als Bolus unmittelbar vor Beginn der Aufnahme retro-orbital intravenös appliziert. Nach Fixierung der Tiere in Rückenlage auf einem Untersuchungstisch aus Kohlefaser wurde eine Übersichtsaufnahme zur Eingrenzung des abzubildenden Bereichs angefertigt. Um sowohl Primärtumor als auch ggf. pulmonale oder ossäre Metastasen darzustellen, wurden neben dem Abdomen auch Thorax und Becken einbezogen. Die finale Bildgebung wurde mit folgenden Einstellungen vorgenommen: 0,5 mm Aluminium Filter, Averaging 2, 180° Scan mit 0,7 ° Schritten, Bildauflösung von 18 µm, Aufnahmezeit 220 ms/Bild (mit 304 Bildern/ Scan), 497 µA Stromstärke und Spannung von 50 kV. Die Rekonstruktion der Röntgenbilder zu einem CT-Bildset erfolgte mittels der Rekonstruktionssoftware *NRecon* (Bruker Corporation, Billerica, USA), die Berechnung der Tumervolumina mittels der *CT An* Software (Bruker Corporation, Billerica, USA). Beide Programme wurden nach etablierten Protokollen und Bedienungsanleitung verwendet (Linxweiler, Korbelt et al. 2017).

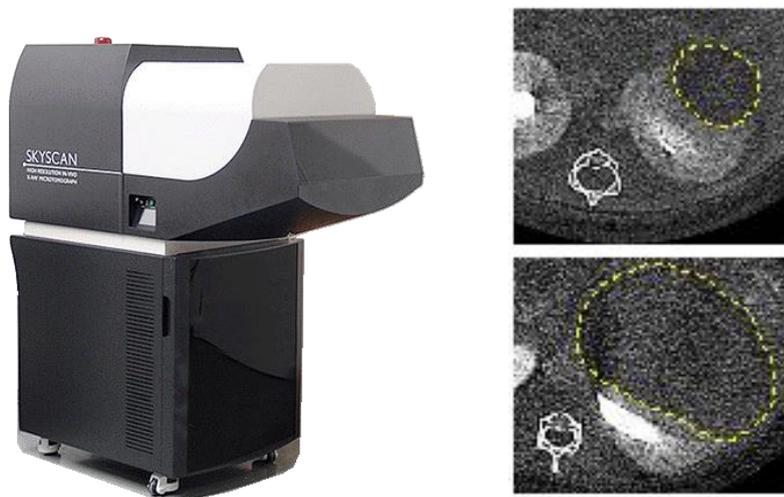


Abb. 10: links: Bruker Skyscan 1176 Kleintier-CT (Bruker Corporation, Billerica, USA); Rechts: beispielhafte CT Bilder des RCC der Maus, der Tumor ist mit einer gestrichelten gelben Linie markiert (Linxweiler, Korbelt et al. 2017) .

3.2.3.3 MRT

Auch die MRT erfolgte nach etablierter Methode nach Linxweiler et al. Hier kam ein 9,4 T Kleintier-MRT Gerät (Biospec Avance III 94/20; Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Deutschland) mit BGA12S Gradientensystem zum Einsatz. Als MRT-Software wurde ParaVision 5.1 (Bruker Corporation, Billerica USA) verwendet (Linxweiler, Korbelt et al. 2017). Die maximale Feldstärke betrug 675mT m⁻¹, die linear induktive Anstiegszeit 130 µs und die maximale Anstiegsgeschwindigkeit 4673 mT/m/s. Die Durchführung erfolgte unter Verwendung einer linear polarisierten Spule, die mit einem Innendurchmesser von 38 mm für die Abbildung des Abdomens der Maus entwickelt wurde (Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Deutschland). Zur MRT-Kontrolle wurden die Tiere in Inhalationsnarkose mit Isofluran gebracht. Zunächst erfolgte die Einleitung mit 2 l O₂/min mit 4% Isofluran, die Narkoseerhaltung mit 2 l Raumluft/min mit 2% Isofluran. Nach zentraler Positionierung der Tiere mittels 3D-Lokalisation folgte die Anbringung eines pneumatischen Kissens (Graseby-Säuglingsatmungssensor; Smiths Medical, Dublin USA) zur Überwachung der Atmung als Vitalparameter. Die Aufzeichnung dieser gelang mittels Software zur Überwachung kleiner Tiere (PC-SAM32; SA Instruments, Inc., Stony Brook USA). Die T1- und T2-gewichteten Bildgebungen wurden mit einer 2D-Multi-Gradienten-Echo-Sequenz (MGE= Multi-Gradienten-Echo-Sequenz) und mit einem Flipwinkel von 30° durchgeführt. Für die T2-gewichtete Bildgebung wurde ein RARE-Protokoll (RARE = Rapid Acquisition Relaxation Enhanced) mit einem RARE-Faktor von 8, einem Flip-Back-Puls und einer Fettsättigung verwendet. Zur Berechnung der diffusionsgewichteten Bildgebung (DWI= diffusion weighted imaging) kam der ADC (ADC= apparent diffusion coefficient) mit einer EPI-Sequenz (EPI = Echo Planar Imaging) mit der Fettsättigung als Diffusionsspur zum Einsatz (Linxweiler, Korbelt et al. 2017).

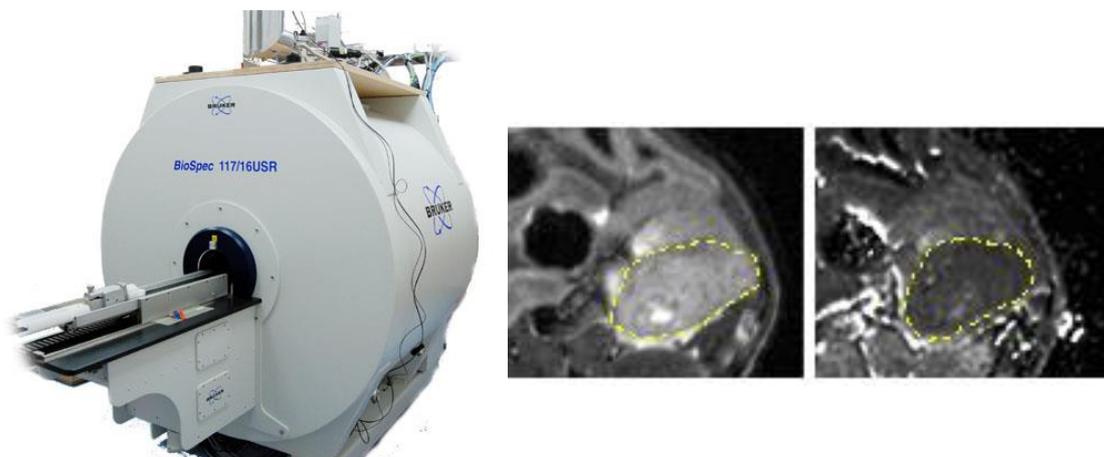


Abb. 11: links: Biospec Avance III 94/20 Kleintier-MRT (Bruker Biospin GmbH, Ettlingen); Mitte: T2 gewichtete Aufnahme; rechts: ADC Aufnahme (Linxweiler, Korbelt et al. 2017)

3.2.3.4 Abbau

Der Abbau der Versuchstiere fand im Kleintier-OP des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (IKEC) statt. Nach Wiegen der Maus wurden zur Einleitung der Injektionsnarkose 75 mg/kg KG Ketamin und 15 mg/kg KG Xylazin intraperitoneal injiziert. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde die Maus in Rückenlage fixiert. Die gesamte OP fand mit Sicht durch ein Stereomikroskop (Leica M651; Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) bei 10- bis 25-facher Vergrößerung statt. Zunächst wurde mittels medianer Laparotomie und Querschnitt kreuzförmig der Situs eröffnet. Ein Großteil des Intestinums wurde zum Erlangen eines Sichtfeldes auf die Vena cava inferior nach extracorporal verlagert um anschließend mittels 27 G-Kanüle bis zu 1 ml Blut aus der V. cava inferior zu entnehmen. Hierbei verstarben die Versuchstiere in der Regel. Die operierte, linke Niere wurde freigelegt und nach Durchtrennung des Ureters und der Gefäße reseziert und in Formalin konserviert. Weiterhin wurden das gesamte Abdomen und der Thorax nach Metastasen untersucht, auffällige Gewebe wurden zur pathologischen Untersuchung asserviert. Zuletzt wurden die Tiere zur absoluten Sicherstellung ihres Todes zervikal disloziert.

3.2.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten nach dem LSAB (LSAB= labelled Streptavidin Biotin) Verfahren unter Verwendung des Dako REAL Detection Kits (Dako, Glostrup, Dänemark). Vorbereitend wurden 3-4 µm dicke Paraffinschnitte der FFPE-Blöcke mittels eines Rotationsmikrotoms (Leica RM2125 RT) angefertigt. Diese wurden bei 37 °C über Nacht im Brutschrank angeschmolzen und anschließend durch 3 mal 15 Minuten Xylolbad entparaffiniert. Zur Rehydrierung wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe, je 3x5 min in 100% Alkohol, 70% Alkohol und Aqua destillata, geführt. Die Epitopdemaskierung erfolgte mittels Hitzebehandlung in Target Retrieval Solution (Dako, S1699). Die Präparate wurden in der bereits auf 95 °C erwärmten Retrieval Puffer Lösung weiter auf 96 °C erhitzt und Mauspräparate 10 min, humane Präparate 25 min unter Temperaturkontrolle gekocht. Daraufhin wurden die Präparate auf <50 °C bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach zweimaligem, je 3-minütigem Spülen der Präparate in PBS-Waschpuffer (Phosphat-Puffer-Tabs, Sigma, P4417-100TAB) wurden diese zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen entsprechend der Größe des Präparates mit 30-100 µl 3% BSA/FCS/PBS-Puffer für 40 Minuten beschichtet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 30-100 µl des ausgewählten, in 1% BSA-PBS-Lösung verdünnten Primärantikörpers für 60 min bei 37 °C (s. obige Liste der Antikörper). Danach wurden die Präparate vier Mal in PBS-Waschpuffer, je 3 min, gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 30-100 µl Sekundärantikörper (Dako Real Detection System,

Alkaline Phosphatase/Red, Rabbit/Mouse, Dako K5005) für 30 min bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Spülen, je 3 min, wurden die Präparate mit 30-100 µl Streptavidin/Alkaline Phosphatase (Dako Real Detection System, Alkaline Phosphatase/Red, Rabbit/Mouse, Dako K5005) für 30 min inkubiert. Die Präparate wurden erneut drei Mal, je 3 min, gespült und mit 30-100 µl Fast Red-Chromogenlösung (Dako Real Detection System, Alkaline Phosphatase/Red, Rabbit/Mouse, Dako K5005) beschichtet und diese für 15 min belassen. Anschließend wurden die Präparate dreifach je drei Minuten mit Aqua destillata gespült, mit Hämatoxylin 5-6 min gegengefärbt und unter fließendem Wasser 6 min gebläut. Nach dem Dehydrieren der Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe (3x 70% Ethanol, 3x 100% Ethanol, 3x Xylol) wurden die Präparate mit Entellan eingedeckt.

Blockierlösung (pH=7,6)		PBS Lösung (pH=7,4)	
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	50 mM	NaCl	137 mM
FKS	20% (v/v)	KCl	2,7 mM
BSA	3%	Na ₂ HPO ₄	8 mM
		KH ₂ PO ₄	2 mM

3.2.5 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Die folgenden Schritte fanden bei Raumtemperatur statt. Am Vortag der eigentlichen Färbung wurden 15.000 Zellen der jeweiligen Zelllinie in 200 µl Medium auf Kammer-Objektträger (4 well chamber slides; BD Falcon) aufgebracht. Am Folgetag erfolgte zunächst ein dreimaliges, je zweiminütiges Waschen mit TBS-Tween-Lösung (TBST= TBS-Tween). Anschließend erfolgte das Fixieren der Zellen auf dem Objektträger durch 30-minütige Inkubation mit Paraformaldehyd. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit je 200 µl Blockierlösung beschichtet und diese 30 min belassen. Nach diesem und jedem weiteren Schritt wurden die Präparate dreimalig für je 2 min mit TBST gewaschen. Die Präparate wurden nachfolgend mit jeweils 70 µl/Kammer des Primärantikörpers PAN-Zytokeratin oder CD90 und des Sekundärantikörpers Anti-Maus (Alexa 594), verdünnt in Antibody Diluent (Dako, S0809) entsprechend der Materialliste, für 60 min inkubiert und schließlich mit VectaSHIELD und DAPI eingedeckt. Ausgenommen war hier der CD90-Primärantikörper, welcher im Gegensatz zum Panzytokeratin-Primärantikörper bereits fluoreszenzmarkiert ist. Somit bestand keine Notwendigkeit eines Sekundärantikörpers.

Blockierlösung (pH=7,6)		TBS-Tween (pH=7,6)	
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	50 mM	Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	248 mM
FKS	20% (v/v)	NaCl	1,37 M
BSA	3%	Tween-20	1% (v/v)

3.2.6 HE-Färbung

Zur HE-Färbung wurden Paraffinschnitte wie in 3.2.4 beschrieben durch Xylol und absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert und anschließend für 20 min in Hämatoxylin nach Böhmer eingestellt. Die Präparate wurden mit Aqua destillata (Aqua dest. = Aqua destillata) gründlich gewaschen und zweimalig in 1% HCl-Alkohol-Lösung inkubiert, um eine Differenzierung und deutlichere Darstellung der Chromatinstruktur durch die Entfernung überschüssigen Hämatoxylins zu erreichen. Daraufhin wurden die Präparate 10 min unter kalt laufendem Leitungswasser gespült. Nach erneutem Waschen in Aqua dest. wurden die Präparate für 2 Minuten in mit Essigsäure angesäuertem Eosin eingestellt und abschließend mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylol dehydriert. Zuletzt konnte dann mit Entellan eingedeckt werden.

4. Ergebnisse

4.1 Arbeitsprogramm und Zeitablauf

Der zu Beginn der Arbeit vorgesehene Arbeitsablauf und Zeitplan ist in Abb. 13 dargestellt. Zunächst konnte der Plan wie vorgesehen verfolgt werden. Im Laufe der Experimente wurden jedoch basierend auf den bisherigen Resultaten Modifizierungen vorgenommen. Hieraus resultierte eine Abweichung zum ursprünglich festgelegten Arbeitsprogramm.

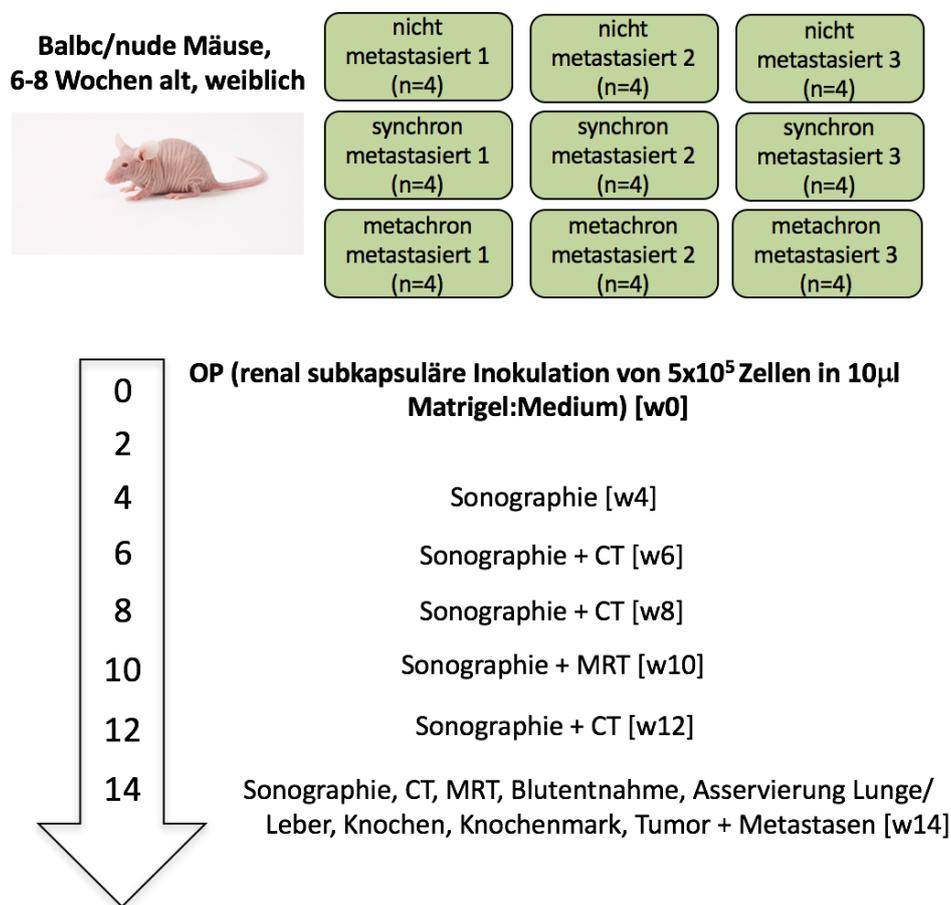


Abb. 12: Zeitplan zu Beginn der Versuchsphase. Der Arbeitsablauf war mit drei Serien à 12 Mäusen vorgesehen. Bei jeder Serie sollten in je vier Tiere Primärzellkulturen nicht metastasierter, synchron metastasierter und metachron metastasierter Nierenzellkarzinome injiziert werden. Die Nachbeobachtungszeit war auf 14 Wochen festgelegt. Nach 4 Wochen sollte die erste sonographische, nach 2 bzw. 6 weiteren Wochen auch CT- und MRT-Kontrollen erfolgen. Nach Ablauf der Nachbeobachtungszeit war eine finale Blutentnahme, die Asservierung von Tumor, Metastasen und ggf. weiterer Organe vorgesehen.

4.2 Auswahl und Charakterisierung der Primärzellkulturen

Die Charakterisierung der Primärzellkulturen erfolgte wie oben beschrieben mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung (s. 3.2.5, s. Abb. 14 + 15). Eine Implantation in die Maus erfolgte ausschließlich bei Primärzellkulturen von klarzelligen Nierenzellkarzinomen, welche die charakteristische Expression der Nierenzellkarzinom-typischen Marker aufwies. Von den insgesamt 17 so charakterisierten Primärzellkulturen wurden 5 aufgrund geringen Nachweises von CK und/oder PAX8 (NTB 366, NTB 340, NTB 547, NTB 635, NTB 755) nicht weiterverwendet (s. Tab. 6).

Tab. 6: Übersicht zur Auswahl der verwendeten Zelllinien: Neben dem Metastasierungsgrad sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien aufgeführt. Hieraus resultierte die Entscheidung, welche der Primärzellkulturen in die Maus implantiert wurden (in die Maus; **Zelllinie fett**).

Zelllinie	Metastasierung	CK	Pax8	CD90	in die Maus
CAK12	etablierte Zelllinie	+		-	+
NTB 265	nicht metastasiert	+		-	+
NTB 366	nicht metastasiert	-	-	+	-
NTB 621	synchron metastasiert	+		-	+
NTB 368	synchron metastasiert	+	+	-	+
NTB 486	synchron metastasiert	+	+	-	+
NTB 327	synchron metastasiert	+	-	-	+
NTB 543	synchron metastasiert	+	+	-	+
NTB 1093	synchron metastasiert	+		-	+
NTB 340	metachron metastasiert	-	-	+	-
NTB 347	metachron metastasiert	+	+	-	+
NTB 498	metachron metastasiert	+		-	+
NTB 1102	metachron metastasiert	+		-	+
NTB 547	Lebermetastase	+	-	-	-
NTB 635	Knochenmetastase	-	-	schwach	-
NTB 755	Nebennierenmetastase	-	-	schwach	-
NTB 993	Nebennierenmetastase	+	-	-	+

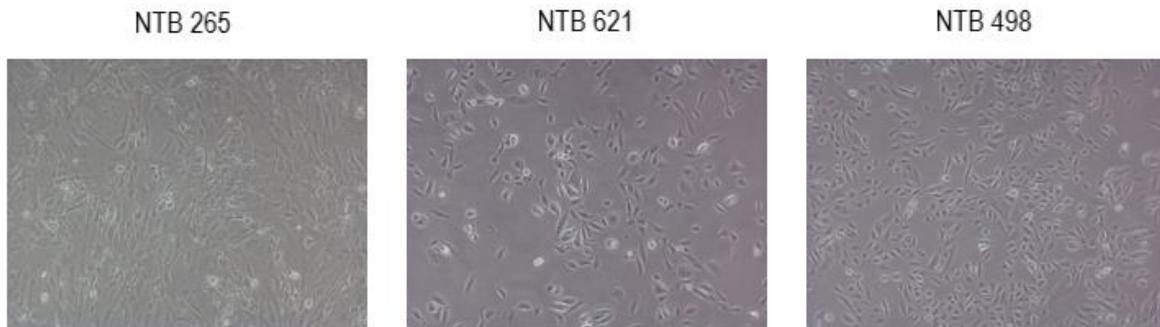


Abb. 13: Beispielbilder der Mikroskopie nativ der Primärzellkulturen NTB 265, NTB 621 und NTB 498. (Vergrößerung 100x)

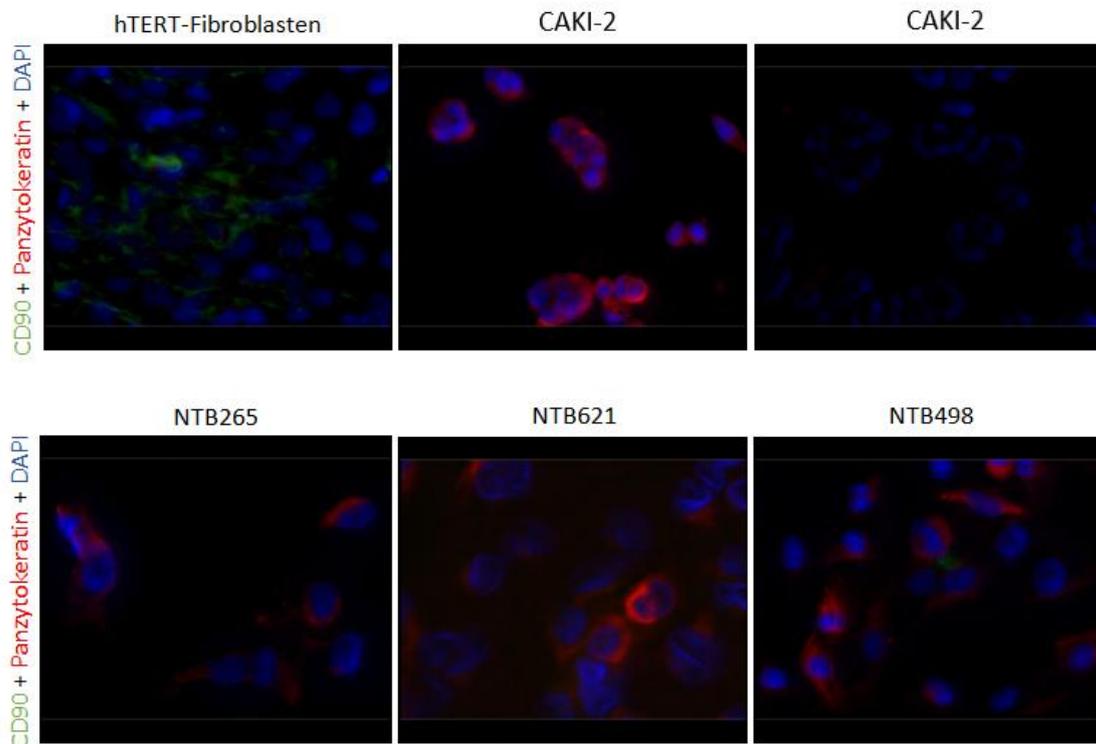


Abb. 14: Beispielhafte Charakterisierung dreier RCC-Primärzellkulturen (NTB265, NTB621, NTB498) mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung. Oben im Vergleich Fibroblasten (CD90 positiv; Pan-CK negativ), CAKI-2 als immortalisierte Zelllinie des RCC (CD90 negativ, Pan-CK positiv) und als Negativkontrolle CAKI-2 nach Inkubation nur mit Sekundär- aber nicht mit Primärantikörper. Unten drei RCC-Primärzellkulturen, welche weiter zur orthotopen Implantation in die Maus verwendet wurden (NTB265, NTB621, NTB498; alle CD90 negativ, Pan-CK positiv).

4.3 Aufbereitung und Implantation der Zellen bzw. Tumorstücke

Nach Aufbereitung der Zellen wie in 3.1.4 beschrieben wurden die entsprechenden Zellen bzw. Tumorstücke in die ausgewählten Mausstämme operativ (s. 3.2.2) implantiert. Die Operationen erfolgten in 5 Serien, wie in Tab. 7 als Übersicht unter Angabe der Mausstämme, Zelllinien, Anzahl der Mäuse und Nachbeobachtungszeit dargestellt. Im Folgenden werden die einzelnen Serien im Detail besprochen.

Tab. 7: Übersicht der Serien 1-5 unter Angabe der verwendeten Zelllinien. Zudem ist die Anzahl der Mäuse, welchen die jeweilige Zelllinie injiziert wurde, und deren Nachbeobachtungszeit angegeben. Diese variierte von wenigstens 10 Wochen bis hin zu 55 Wochen.

Serie	Mausstamm	Zelllinien	Anzahl Mäuse	Nachbeobachtung
1	BALB/c nude	NTB 498	4	14 Wochen
		NTB 621	4	14 Wochen
		NTB 265	4	14 Wochen
2	BALB/c nude	CAKI-2	3	10 Wochen
		NTB 621	3	14 Wochen
		NTB 498	4	14 Wochen
3	CB17 SCID	NTB 265	1	28 Wochen
		NTB 498	1	54 Wochen
		NTB 621	1	54 Wochen
	NOD SCID gamma	NTB 265	1	54 Wochen
		NTB 498	1	54 Wochen
		NTB 621	1	54 Wochen
4	BALB/c nude	NTB 1093	3	51 Wochen
		Tumorstück	2	55 Wochen
		NTB 1102	3	51 Wochen
		Tumorstück	2	55 Wochen
5	NOD SCID gamma	NTB 327	2	46 Wochen
		NTB 368	1	46 Wochen
		NTB 486	2	46 Wochen
		NTB 993	2	46 Wochen
		NTB 543	2	46 Wochen
		NTB 347	1	46 Wochen

4.3.1 Serie 1

In der ersten Serie erfolgten Inokulationen von Primärzellkulturen sowohl synchron- als auch metachron- und nicht-metastasierter Nierenzellkarzinome in jeweils 4 BALB/c nude Mäuse.

4.3.1.1 OP

Die Primärzellkulturen für die ersten 8 Tiere wurden mit Medium und Matrigel 3:1 verdünnt und pro Maus 500.000 Zellen in 10 µl Suspension unter die linke Nierenkapsel injiziert. Die Inokulation der Tumorzellen verlief bei den ersten 8 Mäusen (BALB/c nude, 4x NTB 498, 4x NTB 621) zunächst problemlos, jedoch zeigte sich zweimalig ein geringes Recoil aus dem Stichkanal nach Inokulation, einmalig entstand nach Injektion ein größeres, subkapsuläres Hämatom. Zudem konnte bei einem Tier keine ausreichende Kompression des Stichkanals ausgeübt werden, da die Niere bei unzureichender Fixierung wieder in das Abdomen des Tiers zurückrutschte. Zur Operation der letzten 4 Mäuse (BALB/c nude, 4x NTB 265) der ersten Serie wurden die Primärzellkulturen in einer 1:1 Medium:Matrigel Mischung suspendiert, um eine festere und schnellere Härtung im Gewebe und somit ein geringeres Recoil zu erreichen. Mittels des high-concentration Matrigels gelang hier bei allen Mäusen eine problemlose Inokulation und Kompression des Stichkanals ohne Recoil. Einmalig musste die rechte Niere zur Injektion verwendet werden, da die linke Nierenkapsel beim Injektionsversuch langstreckig einriss. Das weitere Vorgehen erfolgte auch in diesem Fall wie geplant. Verwendet wurden die auch in der Immunfluoreszenzfärbung als erstes untersuchten Zelllinien NTB 498, NTB 621 und NTB 265, wobei jede Zelllinie in jeweils 4 Mäuse injiziert wurde.

4.3.1.2 Follow-up

Die Nachbeobachtungen fanden wie vorgesehen statt. Sowohl in der ersten Sonographie vier Wochen nach OP als auch in den weiteren Kontrollen nach 8 (Sonographie und CT), 10 (Sonographie und MRT) und 14 Wochen (Sonographie) konnte kein Tumorstadium nachgewiesen werden. Die vier Tiere, welche die 1:1 Suspension mit high-concentration Matrigel erhielten, wurden nach 4, 6, 8 und 12 Wochen kontrolliert. Hierbei verstarb jedoch ein Tier während der Narkose im CT in Woche 8. Ein weiteres Tier musste aufgrund eines zu geringen Körpergewichtes aus tierschutzrelevanten Gründen vorzeitig abgebaut werden.

4.3.1.3 Abbau und Organexplantation

Der Abbau der verbliebenen 10 Tiere und deren Organexplantation verliefen problemlos. Auch makroskopisch konnte an den Organen kein Anhalt für Tumorstadium oder -

metastasierung gefunden werden, sodass von einer Histologie und Immunhistochemie abgesehen wurde.

4.3.2 Serie 2

Innerhalb der zweiten Serie erfolgte eine Wiederholung der in Serie 1 verwendeten synchron- und metachron-metastasierten Zelllinien (NTB 498 und NTB 621). Zusätzlich sollte zum Ausschluss eines chirurgischen Problems CAKI-2 als bereits im Mausmodell etablierte Zelllinie (Linxweiler, Korbel et al. 2017) Verwendung finden. Operiert wurden erneut Mäuse der Gattung BALB/c nude.

4.3.2.1 OP

. Neben den schon in Serie 1 verwendeten Zelllinien wurden hier zur erneuten Sicherung der Methodik (um ein fehlendes Anwachsen der Tumorzellen durch chirurgische Gründe auszuschließen) drei Tiere mit CAKI-2inokuliert. Es wurden pro Maus 500.000 Zellen/10 µl inokuliert. Dies gelang problemlos. Auch die Operation der weiteren 7 Mäuse (3 Mäuse NTB 621, 4 Mäuse NTB 498; s. Tab. 7) gelang wie vorgesehen.

4.3.2.2 Follow-up

Die Nachbeobachtung erfolgte 4 (Sonographie und CT), 6 (Sonographie), 8 (Sonographie und CT), 10 (Sonographie) und 14 Wochen (Sonographie) nach OP. Bei den drei CAKI-2-Mäusen konnten in allen Kontrollen Tumore und im Verlauf auch ein Größenwachstum derselben nachgewiesen werden (Abb. 16, Abb. 17). Die weiteren Tiere hingegen zeigten auch in Serie keine Anzeichen von Tumoren.

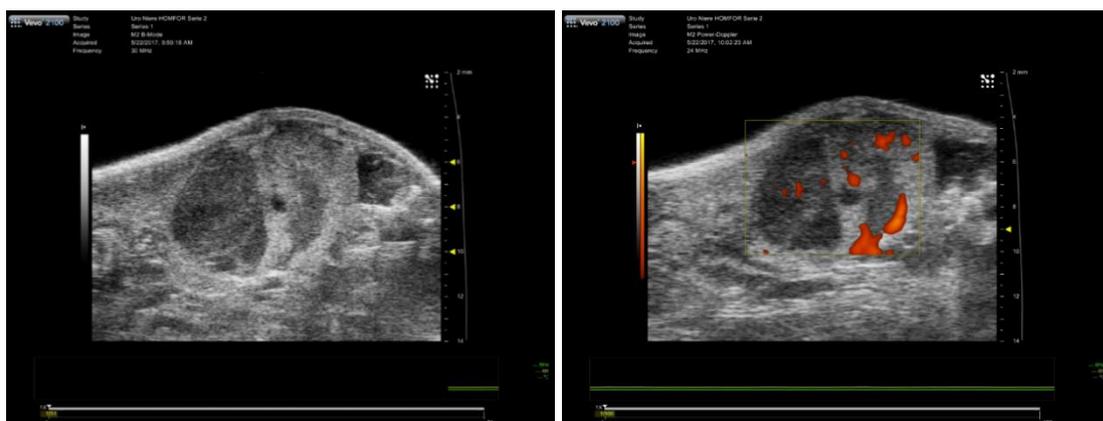


Abb. 15: (Farbduplex-)Sonographie der linken Niere einer CAKI-2-Maus 14 Wochen nach OP. Links: Sonographie mit großem Tumor der linken Niere. Rechts: Farbduplex-Sonographie der linken Niere mit regelrechter Vaskularisierung des Nierenparenchyms und beginnender Vaskularisierung des Tumors.

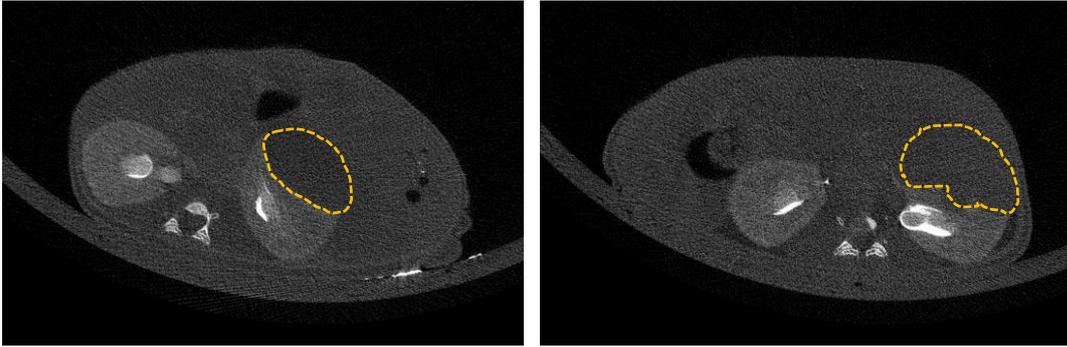


Abb. 16: Kontrastmittel CT Bilder der Nieren zweier CAKI-2-Mäuse 8 Wochen nach OP. Die Tumore sind mit einer gelben, gestrichelten Linie markiert. Die Nieren sind durch Kontrastmittelaufnahme im Vergleich zur Umgebung hyperdens deutlich zu erkennen.

4.3.2.3 Abbau, Organexplantation und Pathologie

Die drei CAKI-2-Mäuse mussten aus tierschutzrelevanten Gründen aufgrund der großen Tumormasse frühzeitig (nach 10 Wochen) abgebaut werden. Die weiteren 7 Tiere dieser Serie wurden planmäßig 14 Wochen nach OP abgebaut und die Organe explantiert. Auch hier konnte makroskopisch kein Anhalt auf Tumorwachstum gefunden werden, so dass die Histologie und immunhistochemischen Färbungen ausschließlich an den CAKI-2 Tumoren durchgeführt wurden. In der HE-Färbung der CAKI-2 Tumore waren deutlich pleomorphe Zellen mit vergrößerten Zellkernen und prominenten Nukleoli darstellbar. Zudem ließ sich eine reiche Vaskularisierung des Tumorgewebes nachweisen (s. Abb. 18). Immunhistochemisch wurden die Antikörper Ki67 als Proliferationsmarker der Mitosephase, HUNU als Marker für humane Zellen, CD90 als Fibroblastenmarker, CAIX und PAX8 als RCC-Marker und CK als Marker epithelialer Zellen gefärbt (s. Abb. 19). Hierbei fielen die Färbungen von Ki67, CAIX, PAX8 und CK positiv aus. Der Antikörper HUNU lieferte zu keinem Zeitpunkt eine positive Anfärbung, auch in der Positivkontrolle nicht.

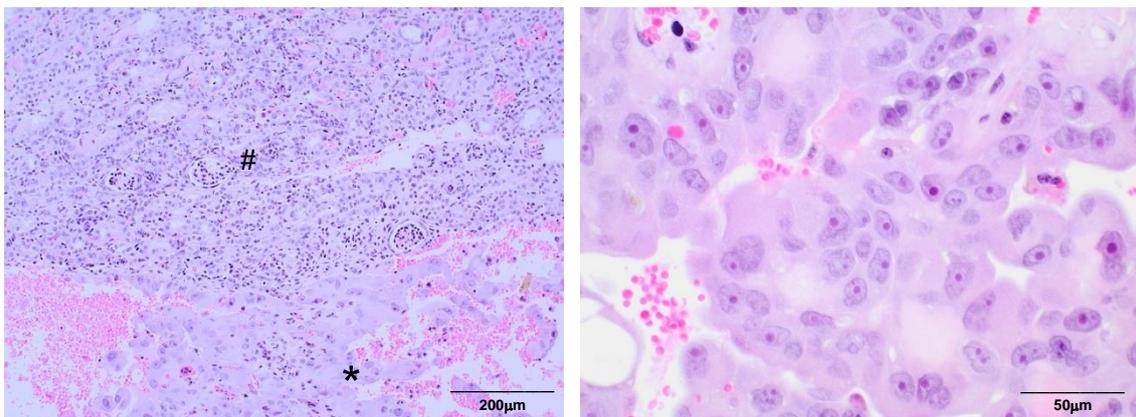
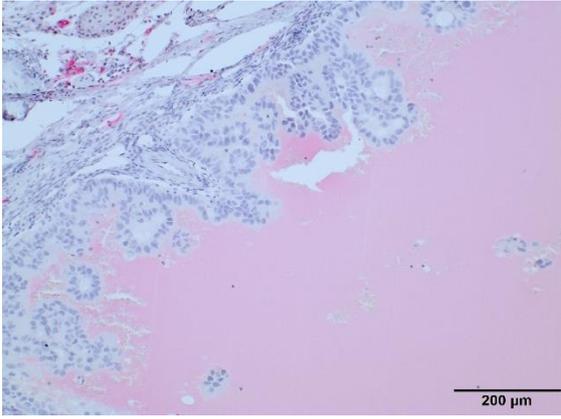
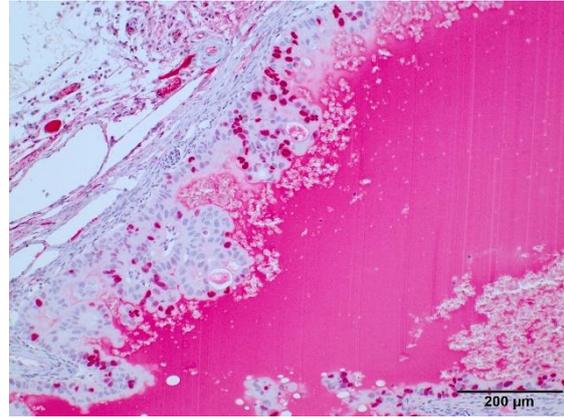


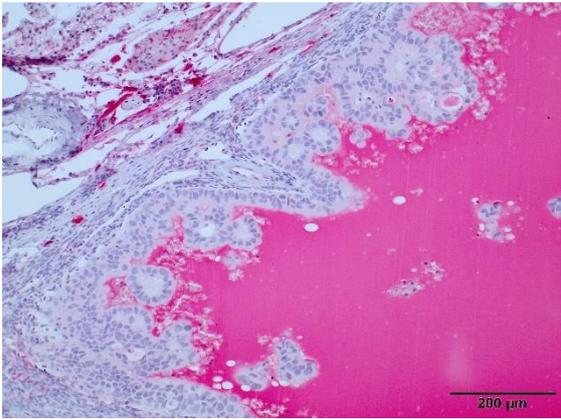
Abb. 17: HE-Färbung eines CAKI2 Tumors der Maus. Erkennbar sind deutlich pleomorphe Zellen mit vergrößerten Zellkernen und prominenten Nukleoli. Zudem ließ sich eine reiche Vaskularisierung des Gewebes nachweisen (Vergrößerung links 100x, rechts 400x). # gesundes Nierengewebe * Tumorgewebe



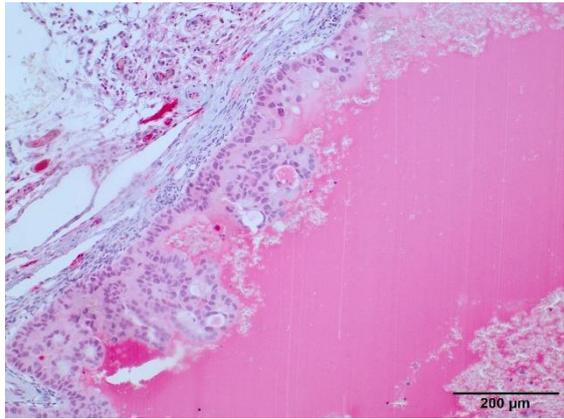
a. Negativkontrolle



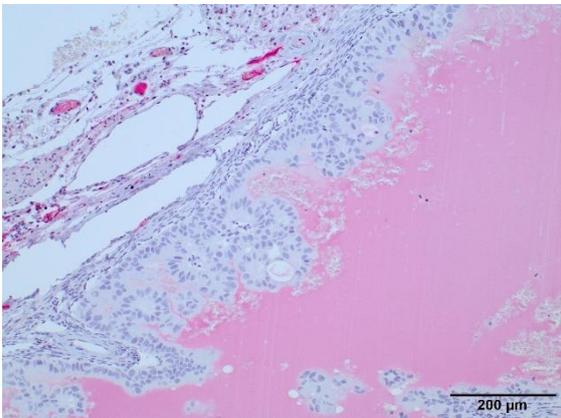
b. Ki67



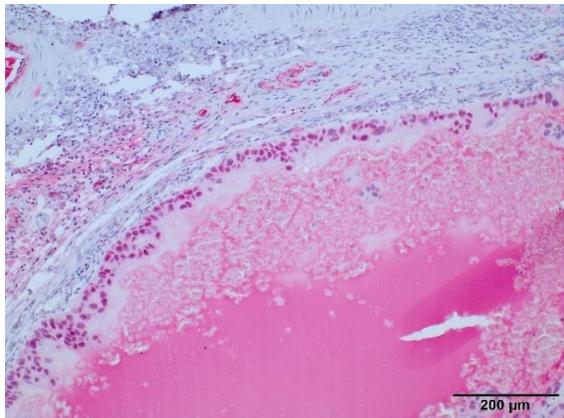
c. HUNU



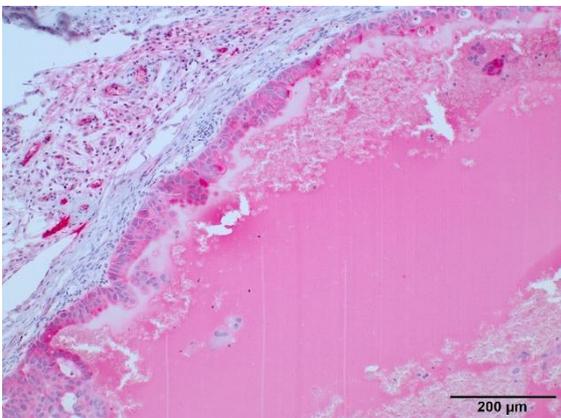
d. CAIX



e. CD90



f. PAX8



g. CK

Abb. 18: Immunhistochemische Färbungen eines renal-subkapsulären CAKI-2 Tumors in der Maus. *a.*: Negativkontrolle. *b.*: Ki67 als Proliferationsmarker ist deutlich positiv. *c.*: HUNU als Marker für humane Zellen ist negativ, jedoch auch bei negativer Positivkontrolle. *d.*: CAIX als RCC-Marker ist leicht positiv. *e.*: CD90 als Fibroblastenmarker ist negativ. *f.*: PAX8 als weiterer RCC-Marker ist positiv. *g.*: CK als Marker epithelialer Zellen ist positiv (Vergrößerung 100x).

4.3.3 Serie 3

4.3.3.1 OP

Während der dritten Serie wurden Tiere mit einer gegenüber den bisher verwendeten BALB/c nude Mäusen abweichenden Immundefizienz verwendet: drei NOD SCID gamma (NSG) Mäuse, drei CB17-SCID Mäuse. Es kamen wieder die drei in Serie 1 verwendeten Zelllinien zum Einsatz (NTB 265, NTB 498 und NTB 621), wobei jede Zelllinie in jeweils eine NSG-Maus und eine CB17-SCID Maus implantiert wurde (s. Tab. 7). Die Operation aller in der Serie behandelten Tiere verlief problemlos.

4.3.3.2 Follow-up

Die Nachbeobachtungszeit wurde hier auf 54 Wochen, also knapp über ein Jahr, ausgeweitet. Innerhalb dieses Zeitraums erfolgten 14 sonographische Kontrollen im Abstand von 2-4 Wochen und drei MRT-Kontrollen in Woche 10, 28 und 39 nach OP. Die NSG-Maus mit der Zelllinie NTB 498 zeigte sowohl sonographisch als auch im MRT eine kleine Läsion an der Nierenkapsel. Die CB17 SCID Maus mit der Zelllinie NTB 265 verstarb vorzeitig in Woche 28. Bei den übrigen Mäusen waren bildgebend keine Tumore detektierbar.

4.3.3.3 Abbau, Organexplantation und Pathologie

Der Abbau der verbleibenden Tiere erfolgte 54 Wochen nach OP. Hierbei konnten makroskopisch bei zwei Tieren weißliche Beläge der Nierenkapsel mit einsprossenden Gefäßen nachgewiesen werden (s. Abb. 20), zum einen bei der CB17 SCID Maus mit der Zelllinie NTB 498, zum anderen bei der NSG Maus mit derselben Zelllinie. Beide Läsionen wurden histologisch aufgearbeitet (Abb. 21) und immunhistochemisch gefärbt. Hierbei konnte jedoch lediglich eine minimale positive Anfärbung mit Vimentin in beiden Präparaten erreicht werden. Die weiteren Antikörper und die Negativkontrolle fielen negativ aus.

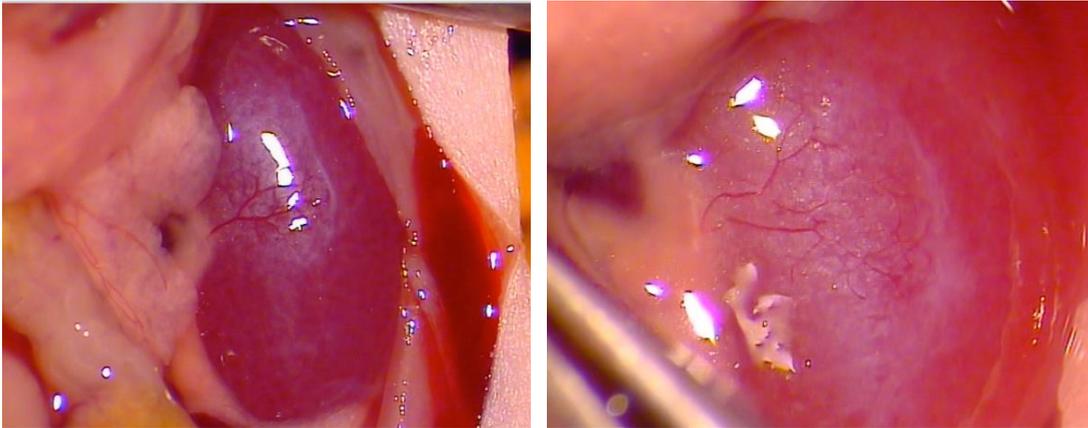


Abb. 19: Weißliche Beläge der Nierenkapseln nach Implantation der Zelllinie NTB 498. Außerdem sind in beiden Fällen deutlich einsprossende Gefäße zu sehen. *Links:* CB17 SCID *Rechts:* NSG

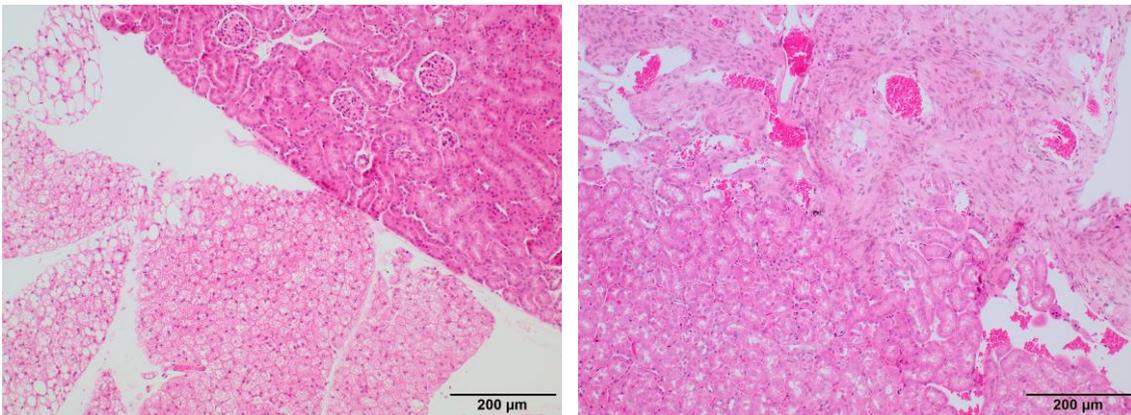


Abb. 20: HE-Färbung der Läsionen der Nierenkapsel, Zelllinie NTB498. *Links:* In der CB17 SCID Maus hat Fettgewebe die Tumorzellen ersetzt. *Rechts:* In der NSG Maus ist deutlich vaskularisiertes Tumorgewebe sichtbar (Vergrößerung 100x).

4.3.4 Serie 4

4.3.4.1 OP

Innerhalb der vierten Serie wurden wieder die schon zuvor verwendeten BALB/c nude Tiere genutzt, jedoch wurden neue RCC-Primärzellkulturen sowie parallel intakte Gewebestücke der entsprechenden Tumore eingesetzt. Hierbei wurden insgesamt 10 Tiere unter Verwendung von zwei Zelllinien (NTB 1093 und NTB 1102) operiert. Jeweils zwei der Mäuse erhielten die Implantation der Tumorstücke, aus denen anschließend die Primärzellkulturen generiert wurden (3.2.1), jeweils drei Mäusen wurden die entsprechenden Primärzellkulturen als Suspension injiziert. Auch hier konnten die OP-Verfahren wie vorgesehen durchgeführt werden.

4.3.4.2 Follow-up

Die Nachbeobachtungszeit betrug 51 bzw. 55 Wochen. Insgesamt fanden in diesem Zeitraum 11 sonographische Kontrollen mit einem Abstand von jeweils 4 Wochen statt. Von den 10 operierten Tieren konnte nur in zweien sonographisch ein Tumorwachstum nachgewiesen werden. Von diesen Tumoren aus der Zelllinie NTB 1102 fanden in Woche 42 auch CT-Kontrollen statt (Abb. 22, Abb. 23).

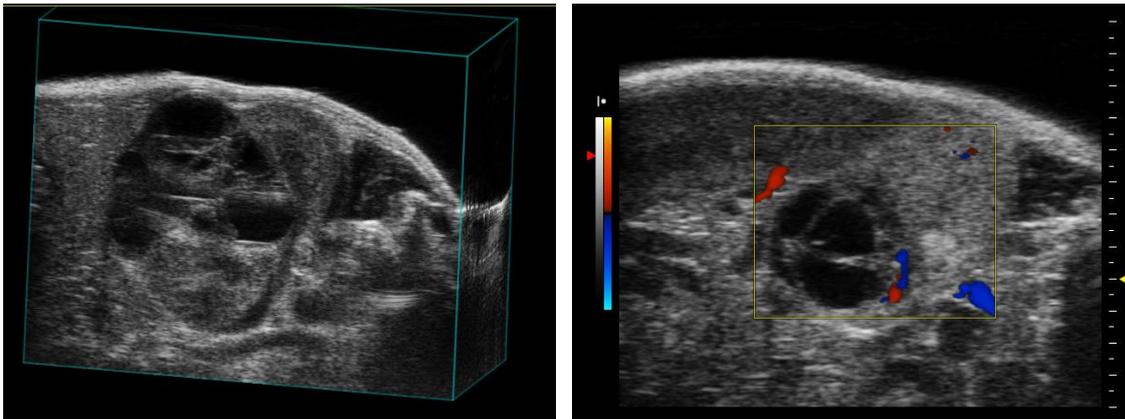


Abb. 21: Sonographie Balbc/nude Maus nach Zellimplantation der Zelllinie NTB 1102 39 Wochen nach OP. Links: Große zystische Raumforderung der linken Niere. Rechts: Farbduplex-Sonographie mit Nachweis der Vaskularisierung des Tumors im Randbereich.

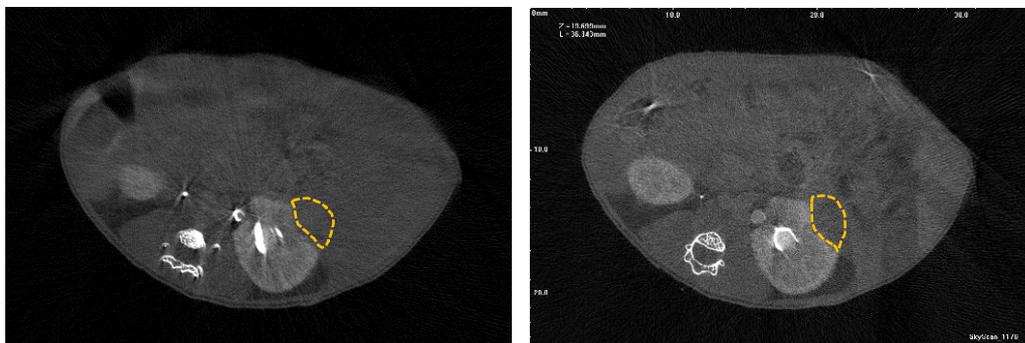


Abb. 22: Kontrastmittel-CT Bilder zweier Mäuse nach Implantation der Zelllinie NTB 1102 42 Wochen nach OP. Die Tumore sind mit einer gelben, gestrichelten Linie markiert. Die Nieren sind durch Kontrastmittelaufnahme im Vergleich zur Umgebung hypodens deutlich zu erkennen.

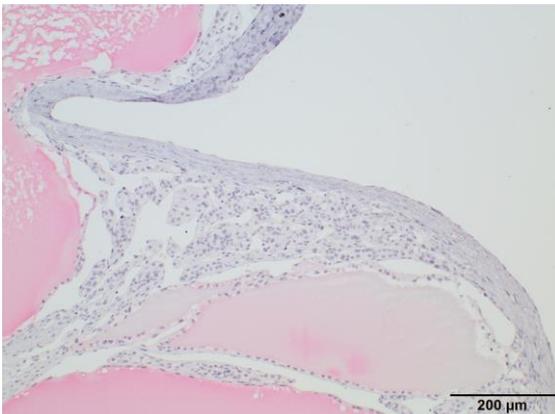
4.3.4.3 Abbau, Organexplantation und Pathologie

Der Abbau der Tiere erfolgte 51 bzw. 55 Wochen nach OP. Hierbei konnte makroskopisch in einer BALB/c nude Maus mit der Zelllinie NTB 1102 ein großer zystischer Tumor nachgewiesen werden (s. Abb. 24).

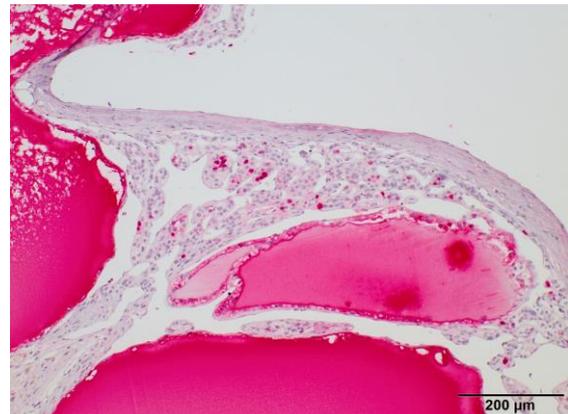


Abb. 23: Linke Niere der BALB/c nude Maus mit der Zelllinie NTB 1102 mit deutlich zystischem Tumorwachstum.

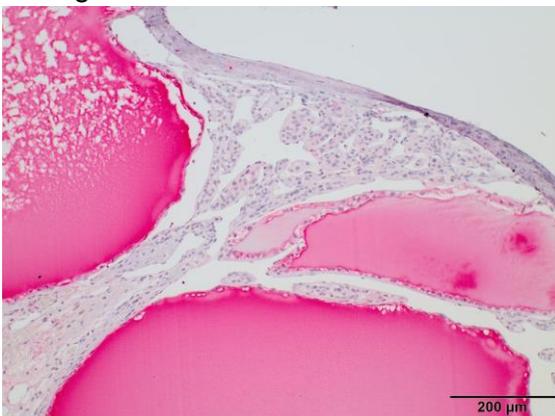
In der HE- und IHC- Färbung ließ sich der makroskopisch darstellbare Tumor auch mikroskopisch bestätigen. Hierbei zeigte der Tumor ein positives immunohistochemisches Signal für die Antikörper Ki67, CAIX, CK und Vimentin. Die weiteren Antikörper HUNU, CD90 und PAX8 fielen negativ aus (Abb. 25).



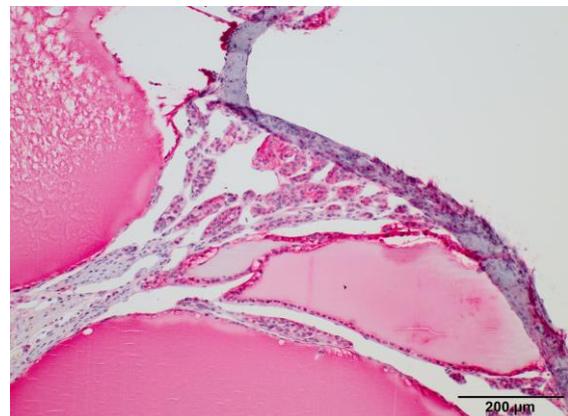
a. Negativkontrolle



b. Ki67



c. HUNU



d. CAIX

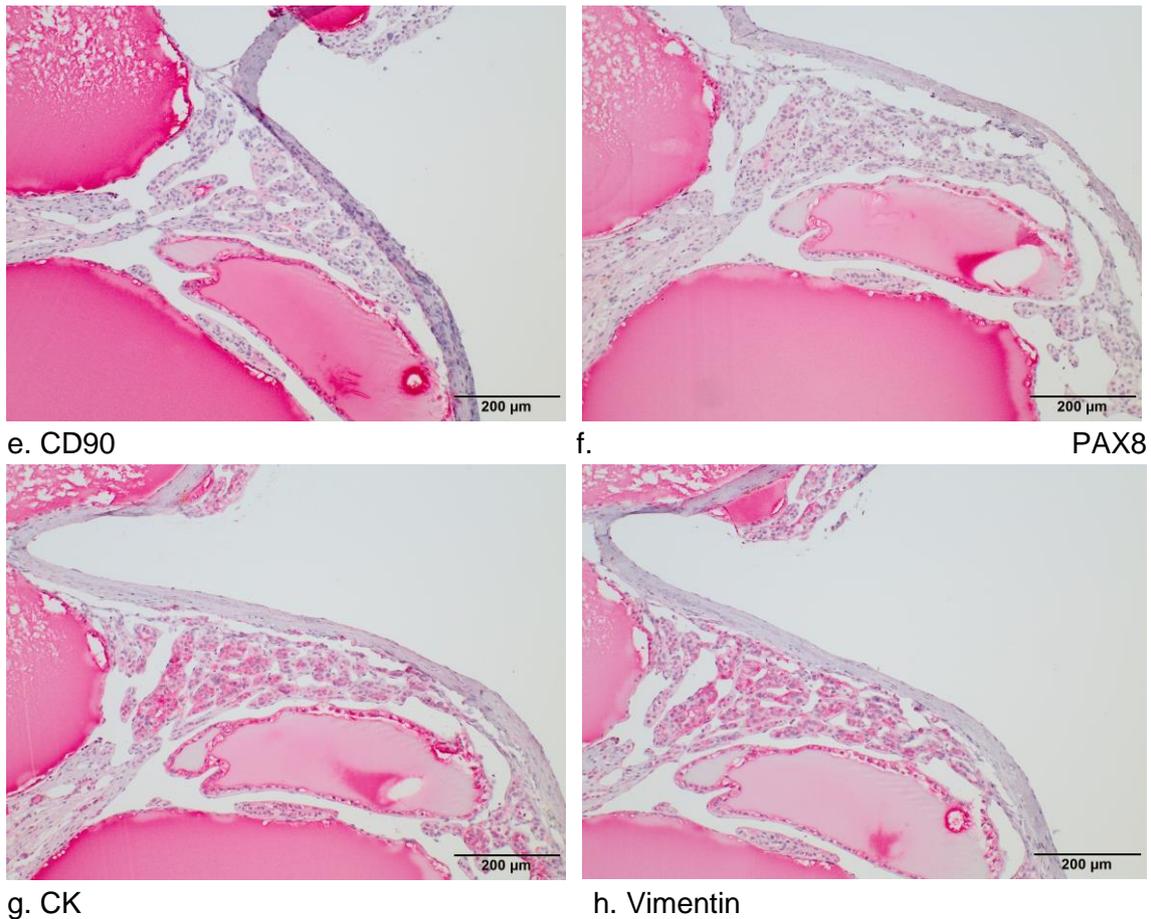


Abb. 24: IHC-Färbung des Tumors der Zelllinie NTB 1102 in einer BALB/c nude Maus. Positive Anfärbung von Ki67 (b.), CAIX (d.), CK (g.) und Vimentin (h.). HUNU (c.), CD90 (e.), PAX8 (f.) und die Negativkontrolle (a.) mit negativem Signal. (Vergrößerung 100x)

4.3.5 Serie 5

4.3.5.1 OP

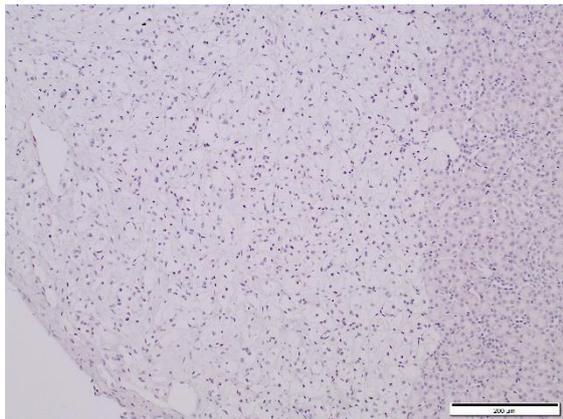
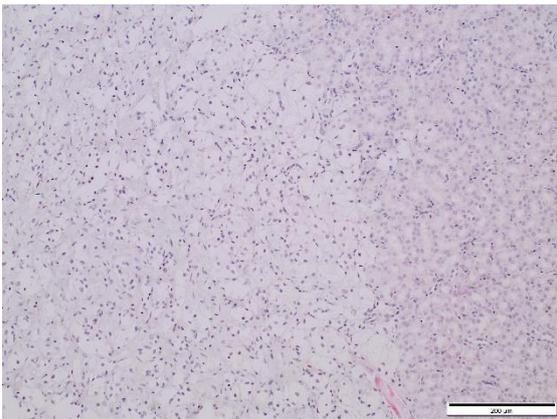
Zuletzt wurden in Serie 5 noch einmal 12 NSG Mäuse operiert, von denen jedoch zwei während der Narkose verstarben. Hierbei wurden 6 weitere Zelllinien verwendet (s. Tab. 7), hiervon auch eine aus einer Nebennierenmetastase generierte Zelllinie (NTB 993). Bis auf den genannten narkose-bedingten Verlust zweier Tiere konnten die Operationen problemlos durchgeführt werden.

4.3.5.2 Follow-up

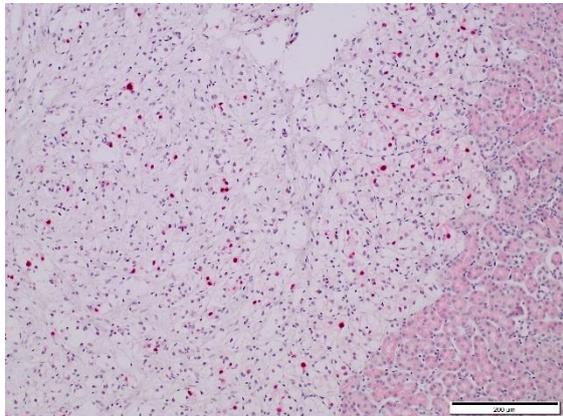
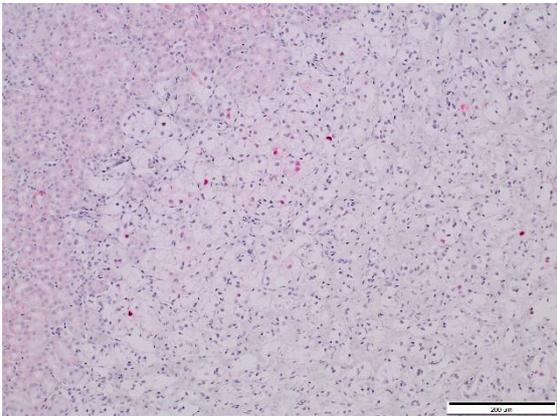
Das Follow-up wurde hier 46 Wochen lang durchgeführt. In diesem Zeitraum wurden 7 sonographische Kontrollen im Abstand von 6-8 Wochen durchgeführt. In keiner Bildgebung ließ sich jedoch ein Tumorwachstum nachweisen.

4.3.5.3 Abbau, Organexplantation und Pathologie

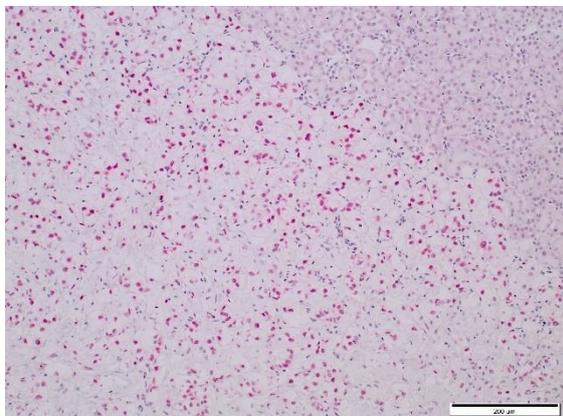
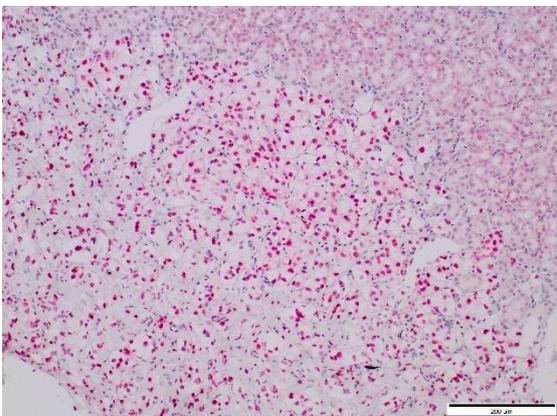
Der Abbau der Tiere erfolgte nach den obengenannten 46 Wochen nach OP. In 6 Fällen (NTB 327, NTB 368, NTB 486, NTB 543) zeigte sich makroskopisch ein weißlicher Saum. In drei Fällen ließen sich makroskopisch kleine Tumore nachweisen (NTB 327, NTB 993). Die beiden Tumore der Zelllinie NTB 993 wurden immunhistochemisch gefärbt (s. Abb. 26). Statt HUNU wurde Ku70 verwendet. Hierbei fielen die immunhistochemischen Signale für die Antikörper Ki67, Ku70, CAIX, PAX8, CK und Vimentin positiv aus. Die Negativkontrolle und CD90 blieben negativ (Abb. 26).



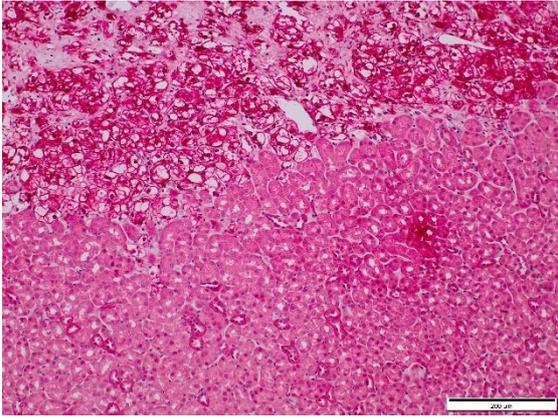
a. Negativkontrollen



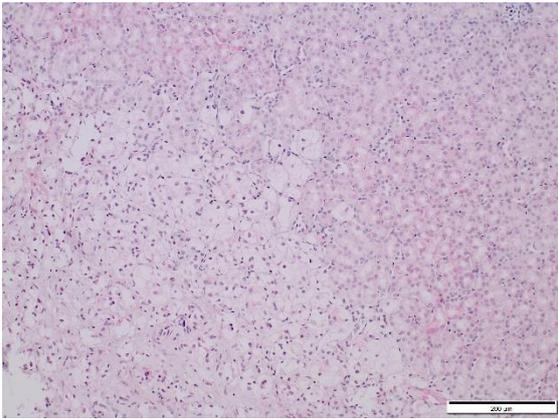
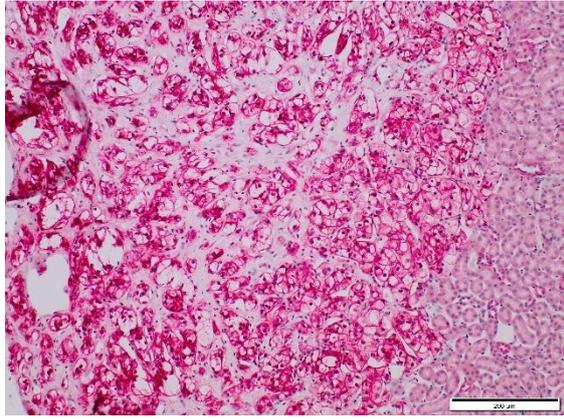
b. Ki67



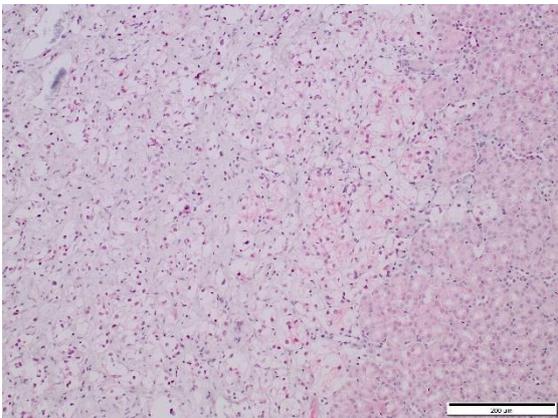
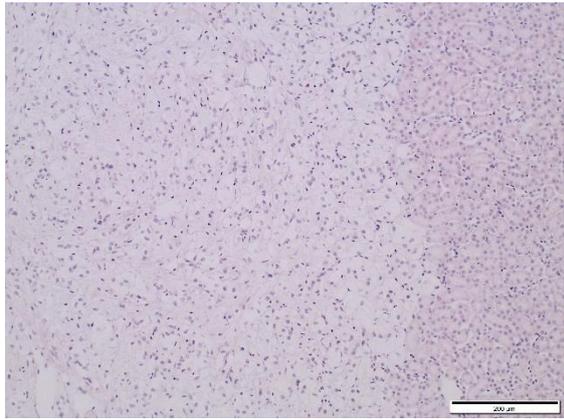
c. Ku70



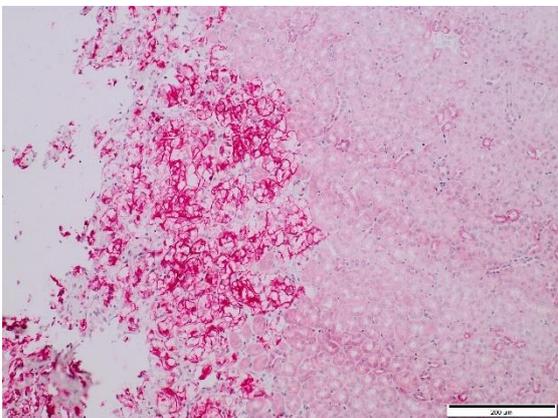
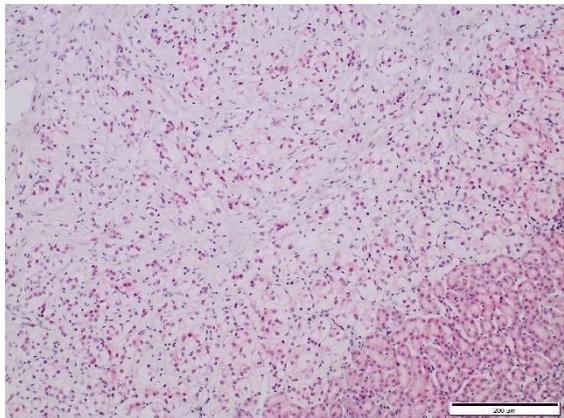
d. CAIX



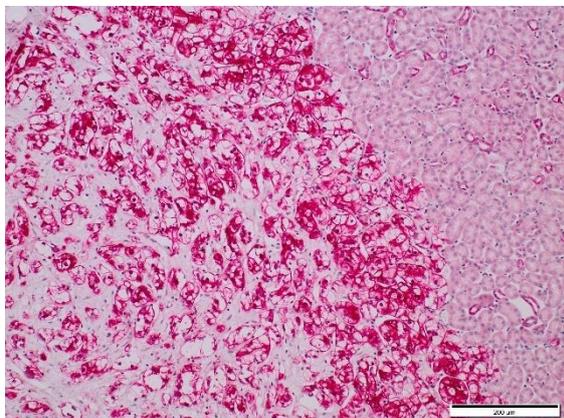
e. CD90

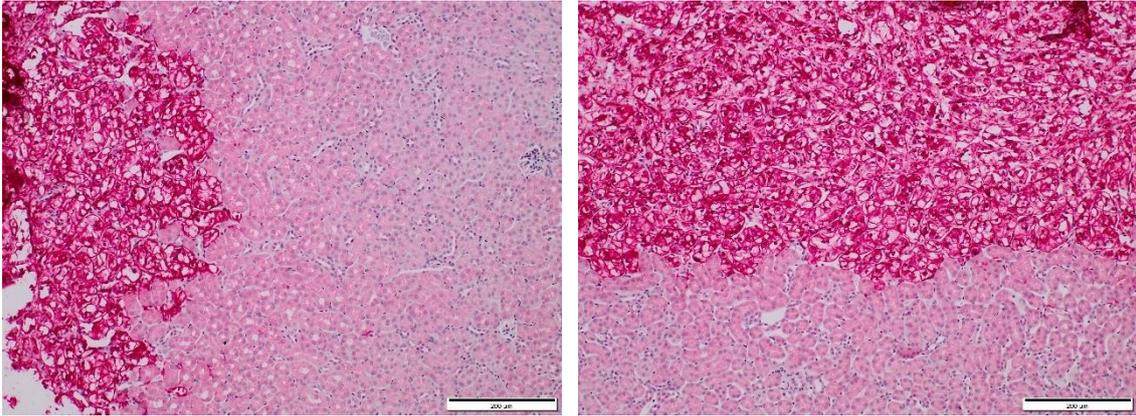


f. PAX8



g. CK





h. Vimentin

Abb. 25: IHC-Färbungen der Tumore der Zelllinie NTB 993 in NSG Mäusen (jeweils links Maus 1, rechts Maus 2). Positive Anfärbung von Ki67 (b.), Ku70 (c.), CAIX (d.), PAX8 (f.), CK (g.) und Vimentin (h.). *CD90 (e.) und die Negativkontrolle (a.) mit negativem Signal.* (Vergrößerung 100x)

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Insgesamt wurden in dem Zeitraum 02/2017 - 05/2019 48 Mäuse dreier verschiedener Mausstämmen (BALB/c nude, CB17 SCID und NSG) operiert. Hierbei konnten 12 verschiedene Primärzellkulturen, hiervon eine aus einer Nebennierenmetastase generierte Zelllinie, eine etablierte Zelllinie (CAKI-2) sowie zwei Tumorstücke renal subkapsulär implantiert werden. Unter Variation der Mausstämmen und des implantierten Materials, Optimierung der Methoden Operationstechnik und bildgebende Verfahren, konnte nach 10-55 Wochen Nachbeobachtungszeit ein Anwachsen der bereits etablierten Zelllinie CAKI-2 in drei von drei Mäusen (100%) sowie acht makroskopischer Läsionen und vier makroskopischer Tumore (2x NTB 1102, 2x NTB 993) nachgewiesen werden. Nach histologischer und immunohistochemischer Charakterisierung der Tumore konnten die Nierenzellkarzinom-typischen Markerexpressionsmuster annähernd wiedergespiegelt werden. Eine Metastasierung konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

5. Diskussion

5.1 Auswahl des Mausmodells und Ausmaß der Immundefizienz

Jedes der in Kapitel 1.2 aufgezeigten präklinischen Mausmodelle birgt entsprechende Vor- und Nachteile. Zusätzlich gibt es im Hinblick auf die Auswahl des Mausmodells bzw. der Mausgattung vielseitige Optionen bezüglich des Ausmaßes der Immundefizienz. Beide Punkte tragen wesentlich zur erfolgreichen Erfüllung der Zielsetzung bei und sind essenzielle Bestandteile zur Beantwortung der dazugehörigen Fragestellungen.

Zunächst soll hier auf die Vor- und Nachteile der oben genannten Mausmodelle eingegangen werden, anschließend auf die Relevanz der verschiedenen ausgeprägten Immundefizienz. Daraufhin werden diese in Bezug auf die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden sowie die erzielten Ergebnisse diskutiert. Hierbei wird auch der aktuelle Stand der Forschung auf diesem Gebiet mit einbezogen.

5.1.1 Vor- und Nachteile der verschiedenen Mausmodelle

Die in Tab. 8 (Sobczuk, Brodziak et al. 2020) aufgeführten Mausmodelle bieten diverse Vor- und Nachteile, welche je nach Fragestellung von entsprechender Relevanz sind. So können sowohl im Syngeneic model als auch im GEM und Chemically induced model (s. Kapitel 1.2) aufgrund nicht erforderlicher Immundefizienz die Rolle des Immunsystems und die Effekte von Immuntherapien untersucht werden. Hier besteht in den Xenograftmodellen wie dem CDX und PDX ein deutlicher Nachteil durch die doch zwingend erforderliche Modifizierung des Immunsystems zur Unterdrückung der Abstoßung der humanen Zellen bzw. Tumorbestandteile (Sobczuk, Brodziak et al. 2020).

Das Syngeneic model, bei dem murine Tumorzellen in immunkompetente Mäuse implantiert werden, stellt das einfachste Mausmodell dar und ist entsprechend kostengünstig. Hierbei können jedoch weder die humane Tumorbio­logie noch die Mikroumgebung der humanen Tumore adäquat abgebildet werden. In diesem Punkt bieten das GEM, die Chemically-engineered models und die PDX Alternativen, wobei die humane Tumorbio­logie im GEM, bei dem lediglich einzelne oder wenige Onkogene und/oder Tumorsuppressorgene im Zielgewebe manipuliert werden, ebenso nur zum Teil repräsentiert ist. Durch die technische und methodische Einfachheit der Syngeneic models ist unter anderem auch in Anbetracht der geringen Tumorerheterogenität eine direkte Translation auf den Menschen nur sehr eingeschränkt möglich (Sobczuk, Brodziak et al. 2020).

In den weitaus aufwändigeren und kostspieligeren GEMs kann histologisch teilweise eine große Ähnlichkeit zu humanen Tumoren festgestellt werden, wobei jedoch ausschließlich die Testung spezifischer genetischer Alterationen und somit eine Translation

nur auf Tumore mit spezifischen genetischen Defekten möglich ist. Das hohe Komplikationsrisiko und das nicht stabil hohe Metastasierungspotenzial stellen außerdem Nachteile der GEMs dar (Sobczuk, Brodziak et al. 2020).

Im Chemically induced model ist eine uneingeschränkte Translation auf den Menschen nicht möglich und auch hier kann wie im GEM eine Gefährdung weiterer Organsysteme bestehen. Die hohe Variabilität zwischen den Tieren, welche gleichzeitig eine hohe Heterogenität bedeutet, und die fehlende Möglichkeit der Widerspiegelung eines natürlichen Krankheitsverlaufs lassen die Chemically induced models nur unter sehr spezifischen Fragestellungen sinnvoll erscheinen. Einen wichtigen Vorteil bieten diese jedoch: die Beurteilung der Stadien der durch exogene Noxen bedingten Karzinogenese (Sobczuk, Brodziak et al. 2020).

In PDX-Xenograftmodellen kann hingegen eine hohe Tumorerheterogenität gegeben sein. Durch die Verwendung humanen Zell- oder Tumormaterials ist eine direkte Translation auf den Menschen möglich. Im einfacheren und kostengünstigeren CDX besteht eine hohe Tumorphomogenität (Sobczuk, Brodziak et al. 2020), wobei das Metastasierungsverhalten beurteilt und ein Vergleich der etablierten Zelllinien vorgenommen werden kann (Patel, Cohen et al. 2019). Genetische Veränderungen können analysiert, Therapieansätze getestet und das Tumorstadium beobachtet werden (Sanmamed, Chester et al. 2016). Etablierte Zelllinien wie CAKI-2 wurden jedoch größtenteils vor mehr als 30 Jahren aus Tumoren generiert. Zu diesem Zeitpunkt waren weder die histologischen Aufarbeitungsmöglichkeiten noch die klinische Datenerhebung auf dem heutigen Stand (Karam, Zhang et al. 2011). Diese Zelllinien weisen heute eine hohe genetische und phänotypische Instabilität auf. Zudem stammen sie von aggressiven Tumoren und sind nicht repräsentativ für die Komplexität der klinisch nachgewiesenen Nierenzellkarzinome (Sanmamed, Chester et al. 2016). Im aufwändigeren PDX besteht neben der Möglichkeit der Untersuchung diverser Therapiemethoden und Tumorkonditionen die Option der Testung einer personalisierten Therapie (Sobczuk, Brodziak et al. 2020). Des Weiteren lassen sich Histologie, Genexpression und Genkopienzahlvarianten analysieren (Pavía-Jiménez, Tcheuyap et al. 2014). Da zum Zweck der Diagnostik und Therapie der Patienten Material in Form von Biopsien und/ oder Tumornephrektomien bzw. Nierenteilresektionen gewonnen wird, steht dieses bereits begrenzt zur Verfügung (Patel, Cohen et al. 2019). Gerade orthotope Xenograftmodelle bilden optimale Rahmenbedingungen in Bezug auf die Tumor-Mikroumgebung, Sauerstoff-, Nährstoff- und hormonelles Milieu (Sanmamed, Chester et al. 2016), erfordern aber einen deutlich höheren Zeitaufwand bei u.a. länger dauerndem Tumorstadium und benötigen etablierte bildgebende Verfahren zum Nachweis eines Wachstums (Richmond and Su 2008). Den Vorteil der optimalen Rahmenbedingungen bieten heterotope Xenograftmodelle nicht. Hier können sich

ggf. Tumorcharakteristika umgebungsbedingt verändern und eine direkte Translation auf den Menschen einschränken (Patel, Cohen et al. 2019). Hauptnachteil ist neben dem hohen technischen und finanziellen Aufwand die Immundefizienz der Tiere.

Humanized mouse models vereinen das intakte Immunsystem, die Möglichkeit der Translation auf den Menschen durch Verwendung humanen Materials und die Widerspiegelung der Mikroumgebung und Tumorbiologie. Jedoch überwiegen hier aktuell noch die hohen Kosten und die Komplexität bei bisher begrenzter Evidenz (Sobczuk, Brodziak et al. 2020).

Tab. 8: Vor- und Nachteile der verschiedenen Mausmodelle (modifiziert nach Sobczuk, Brodziak et al. 2020).

Mausmodell	Vorteile	Nachteile
Syngeneic Models	<ul style="list-style-type: none"> - intaktes Immunsystem - Immuntherapie möglich - geringe Kosten - technisch einfach 	<ul style="list-style-type: none"> - humane Tumorbiologie kann nicht nachgeahmt werden, da murine Zellen - geringe Tumorheterogenität - Abbildung der Mikroumgebung des Tumors schlecht möglich
Genetically engineered models (GEM)	<ul style="list-style-type: none"> - intaktes Immunsystem - Mikroumgebung der Tumore abbildbar - Immuntherapie möglich - teilweise Ähnlichkeit zur Genetik humaner Tumore - Möglichkeit spezifische genetische Alterationen zu testen 	<ul style="list-style-type: none"> - hohes Komplikationsrisiko - spiegeln lediglich Patienten mit spezifischen genetischen Defekten wider - instabiles Metastasierungspotenzial - hohe Kosten - aufwändig
Chemically induced models	<ul style="list-style-type: none"> - Stadien der Karzinogenese nachbildbar - hohe Heterogenität - intaktes Immunsystem - Mikroumgebung der Tumore abbildbar - Immuntherapie möglich 	<ul style="list-style-type: none"> - spiegeln natürlichen Krankheitsverlauf nicht wider - hohe Variabilität zwischen den Tieren - Gefährdung anderer Organsysteme - spiegeln humane Tumorbiologie nicht wider - direkte Translation zum Menschen nicht möglich

Cell-derived Xenografts	<ul style="list-style-type: none"> - Verwendung humaner Tumorzellen - einfacher Vergleich etablierter Zelllinien - Beurteilung des Metastasierungsverhaltens möglich - einfach 	<ul style="list-style-type: none"> - geringe intratumorale Heterogenität - humane Mikroumgebung nicht gegeben - Immundefizienz erforderlich - Immuntherapie nicht möglich - hohe Tumorphomogenität
Patient-derived Xenografts	<ul style="list-style-type: none"> - Verwendung humanen Tumorgewebes - natürliche Umgebung des humanen Tumors gegeben - direkte Translation der Ergebnisse auf den Patienten möglich - personalisierte Modelle möglich 	<ul style="list-style-type: none"> - begrenztes Tumormaterial - hohe inter- und intratumorale Heterogenität - Immundefizienz erforderlich - keine Immuntherapie austestbar
Humanized mouse models	<ul style="list-style-type: none"> - intaktes Immunsystem - Verwendung humaner Tumore/ Zelllinien - Mikroumgebung des Tumors gegeben - Immuntherapie möglich 	<ul style="list-style-type: none"> - bisher noch begrenzte Evidenz und Standardisierung - hohe Kosten - komplex und aufwändig

Bei den genannten Vor- und Nachteilen der verschiedenen Mausmodelle heben sich die PDX vor allem in Bezug auf die Möglichkeit der Etablierung personalisierter Modelle hervor. Die fehlende Möglichkeit nach Etablierung eines solchen Modells zur Immuntherapie und zur Untersuchung von Aspekten der Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem stellt jedoch weiterhin einen Nachteil dar, welcher nur in humanized mouse models ohne Einschränkung der Translationsmöglichkeit auf den Menschen ausgeglichen werden könnte.

Zur Etablierung eines stabilen, repräsentativen in-vivo Modells des Nierenzellkarzinoms ist das orthotope PDX unseres Erachtens als am sinnvollsten zu beurteilen. Dieses innovative und flexible in-vivo Modell nimmt auch bei publizierten Arbeiten zur Untersuchung von RCCs einen immer höheren Stellenwert ein (Grisanzio, Seeley et al. 2011). Trotz der Tatsache, dass ein stabiles Anwachsen humaner Tumore im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, ist das orthotope PDX das einzige der diskutierten Modelle,

welches durch eine natürliche Mikroumgebung der Tumore und eine direkte Translationsmöglichkeit auf den Menschen zur Etablierung einer personalisierten Therapie, aber auch Analyse von Histologie und Reproduktion des metastatischen Potenzials geeignet ist. Zur Kontrolle der Methodik konnte in diesem Rahmen ein orthotopes CDX mit CAKI-2 erfolgreich erprobt werden, wobei, wie oben beschrieben, dieses durch die fehlende Widerspiegelung der Komplexität humaner RCCs kein Modell zur Etablierung eines personalisierten präklinischen in-vivo Modells des Nierenzellkarzinoms darstellt.

5.1.2 Immundefizienz der Mäuse

Als Voraussetzung zur Implantation humanen Materials in einen murinen Wirt ist die Immundefizienz der Mäuse unabdingbar (Sobczuk, Brodziak et al. 2020). Hier variiert das Ausmaß von ausschließlich fehlenden T-Zellen durch fehlenden Thymus (Nude Mäuse, wie athymic nude, BALB/c nude, CD1-nude etc. (Charles River Laboratories 2017)), bis hin zu fehlenden T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen (SCID Mäuse, wie NOD SCID gamma, SCID Beige etc. (Charles River Laboratories 2017)) (s. Tab. 9). Bereits 1962 konnten erste Xenograftmodelle in „nude“ Mäusen etabliert werden, wobei ihr Name maßgeblich durch die fehlende Behaarung zustande kam (Okada, Vaeteewoottacharn et al. 2019). BALB/c nude Mäusen fehlt zusätzlich die Makrophagen-vermittelte Phagozytose humaner Zellen (Okada, Vaeteewoottacharn et al. 2019). Zur Etablierung von PDX sind zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion (Richmond and Su 2008) vor allem die SCID und insbesondere NOD SCID Mäuse geeignet, da diese ihre angeborene, herabgesetzte Immunität durch das Fehlen der oben genannten Zellen (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen), aber auch verminderter Makrophagenaktivität, abnormaler Funktion der dendritischen Zellen und fehlenden Komplementfaktoren besitzen (Inoue, Terada et al. 2017). Die in Tab. 9 aufgeführten Mausstämme verdeutlichen die Vor- und Nachteile der unterschiedlich stark ausgeprägten Immundefizienz und die hieraus resultierende Erfolgsrate für die Verwendung in einem PDX. Hier liegen die Erfolgsraten bei den auch in dieser Arbeit verwendeten Mausstämmen niedrig (SCID, hier verwendet CB17 SCID) bis hoch (NSG). Eine entsprechende Angabe der aus BALB/c und Nude kombinierten Tiere (BALB/c nude) kann womöglich als moderat eingestuft werden. Hierbei muss jedoch, abgesehen von den in der Tabelle aufgeführten Aspekten, auch die implantierte Tumorentität und -aggressivität einbezogen werden (Okada, Vaeteewoottacharn et al. 2019). Diesbezüglich findet sich eine Aufführung der Erfolgsraten von PDX des Nierenzellkarzinoms in Tab. 10. Vor allem die NSG Mäuse zeigen den deutlichen Vorteil einer Erfolgsrate von 45% bei subkutaner Implantation des Materials (Dong, Manley et al. 2017). Auch bei renal-kapsulärer Implantation in NOD SCID Mäusen konnte eine Erfolgsrate von 37,2% verzeichnet werden (Sivanand, Peña-Llopis et al. 2012). Wie bereits in Tab.

9 festgestellt, blieb auch im Versuch die Erfolgsrate in reinen Nude Mäusen bei subkutaner Implantation mit 8,9% gering (Tab. 10) (Lang, Béraud et al. 2016).

Tab. 9 Vor- und Nachteile sowie Erfolgsrate im PDX verschiedener Mausstämme (Okada, Vaeteewoottacharn et al. 2019). NK-Zellen= natürliche Killerzellen, s.c.= subcutan, SPF= spezifiziert pathogenfrei

Mausstamm	Phänotyp	Vorteile	Nachteile	Erfolgsrate PDX
Nude	kein Thymus, kein Haar	gut charakterisiert, s.c. Tumore leicht detektierbar	funktionelle B- und NK-Zellen, zunehmende Abnahme der T-Zellen mit dem Alter	niedrig
SCID	keine B- und T-Zellen	besseres Anwachsen verglichen mit Nude	funktionelle NK-Zellen, Fehlende T-Zellen, strahlensensibel	niedrig
SCID/Beige	keine B- und T-Zellen, beeinträchtigte Makrophagen- und NK-Zellfunktion	besseres Anwachsen verglichen mit SCID	fehlende T-Zellen, strahlensensibel	moderat
NOD/SCID	keine B- und T-Zellen, beeinträchtigte Makrophagen-, NK-Zell- und dendritische Zellfunktion	besseres Anwachsen	spontane Lymphombildung, Lebensspanne durchschnittlich 36 Wochen, strahlensensibel	moderat
NOG/NSG/NOJ	keine B-, T- und NK-Zellen, beeinträchtigte Makrophagen- und dendritische Zellfunktion	exzellentes Anwachsen im PDX, insbesondere hämatologischer Tumore	strikte SPF-Bedingungen notwendig, Anzucht schwieriger und teuer	hoch
Balb/c	keine B-, T- und NK-Zellen	exzellentes Anwachsen im PDX, stressresistent, einfache Anzucht, beständig gegen Strahlung		hoch

Tab. 10 Erfolgsraten von PDX des Nierenzellkarzinoms unter Verwendung verschiedener Mausstämme (Okada, Vaeteewoottacharn et al. 2019). s.c.= subcutan, r.c.= renal capsulär

Stamm	Implantation	Anzahl	Erfolgsrate	Verweise
Nude	s.c.	336	8,9%	(Lang, Béraud et al. 2016)
NOD/SCID	r.c.	94	37,2%	(Sivanand, Peña-Llopis et al. 2012)
NSG	s.c.	74	45%	(Dong, Manley et al. 2017)

Karam et al. implantierten sowohl RCC-Tumorstücke als auch RCC-Primärzellkulturen heterotop in die Subcutis von BALB/c nude Mäusen und konnten ein erfolgreiches Anwachsen und die Etablierung von vier stabil wachsenden Xenograftmodellen verzeichnen (Karam, Zhang et al. 2011). Auch erste Therapieversuche mit Sunitinib und Everolimus waren erfolgreich (Karam, Zhang et al. 2011). Einschränkend muss jedoch das isolierte Anwachsen von High-grade Tumoren, die geringe Patientenzahl und die Implantation in heterotopes Gewebe (Karam, Zhang et al. 2011) aufgeführt werden, so dass die adäquate Mikroumgebung des Tumors nicht wiedergespiegelt werden kann und personalisierte Therapieansätze auf diesem Weg zunächst noch nicht möglich erscheinen. Di Martino, De Luca et al. verwendeten ein orthotopes Xenograftmodell in NSG Mäusen, wobei die aus Patiententumoren generierten Zelllinien genauestens mittels Durchflusszytometrie, PCR, Western Blot und Immunfluoreszenz-Färbung sortiert und charakterisiert wurden. Ausschließlich Proben, welche neben epithelialen und mesenchymalen Charakteristika stammzellähnliche Phänotypen aufwiesen, wurden weiter zur Implantation in die Maus verwendet (di Martino, De Luca et al. 2018). Wie Karam et al. konnten auch di Martino et al. nur Xenograftmodelle mit high-grade Tumoren erfolgreich etablieren, so dass in beiden Versuchen ein generalisiertes und das komplette, klinische Spektrum der Tumore wiedergebendes Modell nicht geschaffen werden konnte. Das Ausmaß der Immundefizienz schien jedoch ausschließlich bei Lang et al. in Nude Mäusen von Relevanz gewesen zu sein. Das unspezifische Anwachsen der Tumore und der Nachweis von Läsionen sowohl in BALB/c nude als auch in CB17 SCID und NSG Mäusen in dieser Arbeit lässt außerdem auf die ausreichende Immundefizienz der aufgeführten Mausstämme schließen. Verglichen mit den Ergebnissen der oben genannten Forschungsgruppen kann angenommen werden, dass auch im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit keine mangelhafte oder übermäßige Immundefizienz für das unzureichende Wachstum der Tumore verantwortlich ist und lediglich ein fehlender Thymus und damit eine Einschränkung der T-Zellfunktion (BALB/c nude) ausreichend sein kann. Um den Einfluss mangelnder Immundefizienz gänzlich auszuschließen, kann jedoch zunächst vorrangig der NSG Mausstamm in Folgeversuchen verwendet werden.

5.2 Chirurgisches Verfahren

Die Vor- und Nachteile der heterotopen und orthotopen Implantation wurden bereits in Abschnitt 5.1.1 bei den verschiedenen Mausmodellen erläutert. Hier soll nun das chirurgische Verfahren bei orthotoper Implantation, also in diesem Fall die renal-subkapsuläre Implantation von Tumormaterial in die Maus, diskutiert werden.

Verfahren wurde nach dem etablierten OP-Verfahren zur renal-subkapsulären Implantation von Linxweiler et al. aus dem Versuch zur Bildgebung orthotoper Xenograftmodelle des Nierenzellkarzinoms in der Maus mittels CAKI-2 Tumoren (Linxweiler, Korbel et al. 2017). Dieses Verfahren unterscheidet sich in den relevanten Schritten nicht von anderen etablierten Verfahren durch z.B. di Martino et. al., wobei diese Arbeitsgruppe standardmäßig 20 μ l Matrigel verwendet und nicht angegeben ist, in welchem Verhältnis dieses Volumen zu dem der Tumorstammzellen suspendiert wird. Zur zusätzlichen chirurgischen Kontrolle wurde anschließend PBS injiziert, womit das Gesamtvolumen der injizierten Lösung mehr als das Doppelte des in den Versuchen dieser Arbeit implantierten Volumens (10 μ l) beträgt (di Martino, De Luca et al. 2018). Trotz der Verwendung der genannten etablierten Verfahren ließ sich in der ersten Serie (s. 4.3.1) ein Recoil aus dem Stichkanal verzeichnen. Zudem konnte der Stichkanal anschließend nicht ausreichend komprimiert werden, sodass zur weiteren Implantation high-concentration Matrigel verwendet wurde, welches 1:1 mit Zellkulturmedium gemischt wurde. Mittels dieser 1:1 Suspension konnte weiteres Recoil vermieden werden. Abgesehen von dieser Problematik verliefen die Operationen nach dem vorgesehenen Verfahren problemlos, sodass nicht angenommen werden kann, dass hier nach Anpassung der Suspension mit dem Matrigel eine Fehlerquelle bezüglich des mangelnden Wachstums einiger Primärzellkulturen und Tumorstücke besteht.

5.3 Auswahl der Zelllinien

Die Auswahl der in die Mäuse implantierten Zelllinien erfolgte wie in 4.2 beschrieben. Es kann jedoch anhand der in 4.2-4.4 dargestellten Ergebnisse weder ein Rückschluss auf das schlechte Wachstum einiger-, noch das sehr gute Wachstum anderer der ausgewählten Zelllinien bzw. Primärzellkulturen und Tumorstücke erfolgen. Die Charakterisierung mittels Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-CK, Anti-CD90 und Anti-PAX8 sollte zur Auswahl der Zelllinien angewendet werden, hat jedoch, wie zu erwarten war, keine Aussagekraft über die Erfolgsrate des Wachstums.

Di Martino et. al. sortierten und charakterisierten die zu implantierenden Zellen beispielsweise mittels Durchflusszytometrie (Anti-human, Anti-CK8 und Anti-CK18), real-time qRT-PCR nach RNA Extraktion, Western Blot und Immunfluoreszenz-Färbung. So konnte ein stabiles Anwachsen von genauestens charakterisierten high-grade Tumoren erreicht werden (di Martino, De Luca et al. 2018).

Neben der detaillierteren Charakterisierung mittels oben genannter Verfahren stellt die weitere Passagierung und Subkultivierung der sowohl vor Implantation generierten Primärzellkulturen als auch von extrahierten Zellen der aus der Maus explantierten Tumore einen möglichen Ansatz zur besseren Auswahl der Zelllinien dar. So ließ sich z.B. ein orthotopes Xenograftmodell des Prostatakarzinoms generieren. Aus LuCaP136, einem PDX Model, wurden 3D-Zellkulturen generiert, welche wiederum in orthotopen Xenograftmodellen verwendet wurden (Linxweiler, Hajili et al. 2020). Auf diese Weise könnten eine weitere Expansion und ein aggressiveres Wachstum (di Martino, De Luca et al. 2018) ermöglicht werden. Aufgrund mangelnden Tumormaterials zur immunhistochemischen Färbung und Passagierung von Zellen der Tumore konnte letztere in dieser Arbeit nicht vorgenommen werden. Hier stünden vor allem weitere Versuche, insbesondere der bisher angewachsenen Zelllinien im Vordergrund, sodass nachvollzogen werden kann, weshalb ein Wachstum dieser im orthotopen Xenograftmodell möglich war und inwiefern Charakteristika und Phänotyp nach Explantation erhalten bleiben.

Auch ein Wachstum der implantierten Tumorstücke konnte nach Charakterisierung der entsprechenden Zelllinie nicht nachgewiesen werden, wobei in früheren Studien ein Solches im Vergleich zum Wachstum der als Zellsuspension eingebrachten Tumorzellen deutlich stärker zu verzeichnen war (An, Jiang et al. 1999). Daher sollten ebenso weitere Versuche zur orthotopen Implantation von Tumorstücken angestrebt werden.

5.4 Follow-up Methoden bzw. bildgebende Verfahren

Die in der nicht-invasiven Diagnostik des Nierenzellkarzinoms klinisch relevantesten, bildgebenden Verfahren sind weiterhin die CT und MRT (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) 2020). Diese bildgebenden Verfahren konnten für präklinische Experimente in Kleintieren ausgeweitet werden (Lyons 2015). In den oben beschriebenen Vorarbeiten (1.3.1) wurden sowohl die Kontrastmittel- μ CT und Kleintier-MRT als auch die hochauflösende 3D-Sonographie zur nicht-invasiven Diagnostik und Überwachung des Tumorwachstums bei genauer Volumenberechnung der Tumore in orthotopen Xenograftmodellen des Nierenzellkarzinoms etabliert (Linxweiler, Korb et al. 2017). Zur Verlaufsbeobachtung von Xenograftmodellen des Nierenzellkarzinoms wurden bisher kaum bildgebenden Verfahren (Sivanand, Peña-Llopis et al. 2012) verwendet. In Versuchen konnte jedoch auch in-vivo bioluminescence imaging (IVIS) in Kombination mit vorheriger lentiviraler Luciferase-Transduktion und Gabe von D-Luciferin zur Bildgebung der Tumore angewandt werden (Karam, Zhang et al. 2011, di Martino, De Luca et al. 2018). Die schnelle und einfache Detektierung der Tumore auf diesem Weg bietet einen Vorteil, jedoch müssen die Zellen entsprechend transfiziert werden, und auch eine genaue Quantifizierung ist nicht möglich (Jäger, Moskalev et al. 2013, Rojas, Joiner et al. 2022). Der Zeitraum des Follow-ups variierte in dieser Arbeit stark (10-55 Wochen). Der längere Beobachtungszeitraum von +/- 50 Wochen wurde in Serie 3, 4 und 5 genutzt, wobei hier in jeder der Serien Tumore oder Läsionen nachgewiesen werden konnten. Sowohl Karam et. al. als auch di Martino et al. konnten Tumorwachstum bereits nach 30 Tagen beobachten. Hier scheint die bereits oben diskutierte Charakterisierung und ggf. Passagierung der Zellen und das bedingte Anwachsen von High-grade Tumoren von Relevanz zu sein.

5.5. Immunhistochemische Aufarbeitung

Die immunhistochemische Aufarbeitung der in orthotopen Xenograftmodellen herangewachsenen Tumore hat einen hohen Stellenwert bezüglich der Beurteilung des Überlebens, Wachstums und Tumoreigenschaften der implantierten Primärzellkulturen/ Tumorstücke und herangewachsener Tumore. Aufgrund des Markerexpressionsmusters in der IHC können Rückschlüsse auf die Charakteristika des Nierenzellkarzinoms gezogen werden und beurteilt werden, inwiefern Veränderungen der Zellen in der Maus stattfinden (Magaki, Hojat et al. 2019). Die hier nach internen Standards angewandten histologischen (u.a. HE-Färbung, s. 3.2.6) und immunhistochemischen Färbungen (s. 3.2.4) sind weit verbreitete Methoden zur Untersuchung (histo)pathologischer und tumorbiologischer Charakteristika von Gewebeproben (Magaki, Hojat et al. 2019).

Die wichtigsten in der immunhistochemischen RCC-Diagnostik angewendeten Marker sind CD10, RCC-Ma, PAX2 und PAX8 (Truong and Shen 2011). Weitere für RCCs und insbesondere ccRCCs typische Marker sind Zytokeratine, Vimentin und CAIX (Truong and Shen 2011). Als Proliferationsmarker maligner Zellen, unter anderem des RCCs, kann zudem Ki67 verwendet werden (Yang, Zhang et al. 2018). Zur Detektion humaner Zellen eignen sich HUNU und Ku70, wobei ersterer hauptsächlich in Versuchen zu humanen Stammzellen Verwendung findet (Liu, Cai et al. 2020).

Die in dieser Arbeit genutzten Marker bilden bereits das relevante Spektrum gut ab (Ki67, HUNU, Ku70, CAIX, CD90, PAX8, CK und Vimentin). CD90 als Fibroblastenmarker wurde zusätzlich zum Ausschluss der Kontamination mit Fibroblasten verwendet. In nahezu allen Färbungen konnte das zu erwartende Markerexpressionsmuster des Nierenzellkarzinoms nachgewiesen werden. PAX8 konnte jedoch nur einmalig als deutlich positiv eingestuft werden und war ansonsten schwach bis negativ. Lediglich HUNU konnte in keiner der Färbungen, auch der negativen Positivkontrolle, detektiert werden. Hieraus begründet sich die Verwendung von Ku70 als Marker humaner Zellkerne in Serie 5, welche erfolgreich war (vgl. 4.3.5.3). Di Martino et al. färbten ausschließlich PAX8, CD10, Vimentin und EMA, wobei nur Vimentin und EMA deutlich positiv ausfielen. Auch hier funktionierten die Färbungen mit Anti-PAX8 als Antikörper und Anti-CD10 nur bedingt (di Martino, De Luca et al. 2018). In erneuten Versuchen und anschließenden IHC-Färbungen kann eine überarbeitete Auswahl der Antikörper als sinnvoll erachtet werden, wenn auch die bisherigen Färbungen deutlich das Vorhandensein und die Proliferation der Nierenzellkarzinome darstellen konnten. Zunächst könnte HUNU ausgeschlossen und zusätzlich Ku70, PAX2, RCC-Ma, EMA und CD10 verwendet werden.

Auch in den HE-Färbungen dieser Arbeit und der anderer Arbeitsgruppen (Karam, Zhang et al. 2011, di Martino, De Luca et al. 2018) konnten typische histopathologische Charakteristika nachgewiesen werden: deutlich pleomorphe Zellen mit vergrößerten Zellkernen und prominenten Nukleoli mit sichtbarer Vaskularisierung des Gewebes.

Die histologische und immunhistochemische Aufarbeitung der explantierten Gewebe ist bereits gut etabliert und aussagekräftig. Veränderungen, wie eine optimierte Auswahl an Antikörpern, können jedoch in Erwägung gezogen werden. Die Methodik erscheint insgesamt jedoch als sehr geeignetes Verfahren zur Beurteilung und Untersuchung der aus der Maus explantierten Gewebe und kann Aufschluss über Analogie zum Menschen, Wachstum, Proliferation, Vaskularisierung und ggf. Metastasierung der Tumore geben.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Nierenzellkarzinom stellt weiterhin eine der häufigsten malignen, urologischen Tumorerkrankungen mit steigender Inzidenz in den europäischen Ländern dar (Ferlay, Colombet et al. 2018). Zwar konnte eine Abnahme der alterstandardisierten Sterberate der Nierenzellkarzinom-Patienten verzeichnet werden (Robert-Koch-Institut 2017), dennoch stellen die Tumorerheterogenität und die schlechte Prognose im metastasierten Stadium immer noch große Herausforderungen dar (di Martino, De Luca et al. 2018). Die Charakterisierung von Tumoren wird immer präziser. So konnten zunächst Tumore nur nach Lokalisation differenziert werden („Darmkrebs, Lungenkrebs etc.“), heute sind umfangreiche molekulare Charakterisierungen und Untergruppierungen möglich. Eine maßgeschneiderte Therapie gewinnt zunehmend an Relevanz und erfordert eine subtile Differenzierung. Bereits vor 40 Jahren wurden erste Schritte zur Etablierung von Xenograftmodellen des Nierenzellkarzinoms unternommen (Höehn and Schroeder 1978, Otto, Huland et al. 1985). Die Etablierung eines uneingeschränkt auf die Klinik anwendbaren, personalisierten, prädiktiven Modells für jeden Patienten ist bisher jedoch nicht möglich. Zu einer solchen Etablierung eignet sich vermutlich aufgrund der natürlichen Mikroumgebung der Tumore und der direkten Translationsmöglichkeit auf den Menschen am ehesten ein orthotopes PDX. Dieses ist zudem zur Analyse von Histologie, Immunhistochemie und Reproduktion des metastatischen Potenzials am geeignetsten. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte ein stabiles, personalisiertes, präklinisches in-vivo Modell des Nierenzellkarzinoms nicht etabliert werden. Zwar konnte ein orthotopes CDX mit CAKI-2 reproduziert werden, jedoch spiegelt dieses die Komplexität und Heterogenität humaner RCCs nicht wider. Zur Verbesserung der Methodik und Kontrolle u.a. des chirurgischen Verfahrens kann dieses Modell jedoch problemlos angewandt werden.

Als ausreichendes Ausmaß der erforderlichen Immundefizienz zum Anwachsen humaner Tumore kann ein lediglich fehlender Thymus und damit der Verlust der T-Zellfunktion der Maus ausreichend sein. Dies wird durch das unspezifische Anwachsen von Läsionen und Tumoren in den drei verwendeten Mausstämmen BALB/c nude, CB17 SCID und NSG bestätigt. Um eine mangelnde Immundefizienz vollständig auszuschließen, sollte in Folgeversuchen vorrangig der NSG Mausstamm verwendet werden. Dies zeigt auch auf ähnliche Weise etablierte Modelle. Im Falle eines erfolgreichen stabilen Wachstums könnten anschließend mit den jeweiligen Primärzellkulturen andere kostengünstigere und haarlose Mausstämme wie BALB/c nude versucht werden.

Das angewandte chirurgische Verfahren ist insgesamt etabliert und konnte durch Anpassung der Suspension mit Matrigel (von 3:1 zu 1:1) verbessert werden, sodass das

mangelnde Wachstum einiger Primärzellkulturen und der Tumorstücke nicht auf eine Problematik in diesem Bereich zurückzuführen ist.

Da die Generierung und Charakterisierung einiger stabil anwachsender Xenograftmodelle angestrebt werden sollte, muss vor allem eine genauere Charakterisierung und Sortierung der Primärzellkulturen vor Implantation in die Maus erfolgen. Hierzu könnten mittels Immunzytologie die relevanten Marker zur Diagnostik des ccRCCs getestet werden. Diesbezüglich sollte eine Anpassung der verwendeten Antikörper erfolgen (5.5) und neben Ki67, Ku70, CAIX, CD90, PAX8, CK und Vimentin auch PAX2, RCC-Ma, EMA und CD10 angefärbt werden. Die Verwendung ausgewählter der obigen Antikörper kann auch im Rahmen von Immunfluoreszenzfärbungen zur Charakterisierung der zu implanzierenden Primärzellkulturen beitragen. Durch diese genannten Verfahren und Veränderungen kann dann eine Implantation von Fibroblasten bzw. nicht-Tumorzellen nahezu gänzlich ausgeschlossen werden.

Durch eine Passagierung der Zellen nach Explantation könnte ein aggressiveres Wachstum und stärkere Expansion der Zellen provoziert werden. Hierzu fehlte im Rahmen dieser Arbeit das notwendige Material. Die Subkultivierung bzw. Passagierung sollte somit zusätzlich in Folgeversuchen angestrebt werden.

Neben der Etablierung einer personalisierten Therapie des Nierenzellkarzinoms könnten mittels eines solchen stabilen orthotopen Xenograftmodells des RCCs langfristig die auch in der klinischen Diagnostik des RCCs relevanten bildgebenden Verfahren für Kleintiere, insbesondere Mäuse, weiter verbessert werden. Es bestünde die Möglichkeit, weitere Therapieoptionen an klinisch repräsentativen Tumoren zu testen und eine direkte Translationsmöglichkeit auf den Menschen zu erarbeiten. In diesem Rahmen könnten auch die Genetik und die Umwelteinflüsse auf das Nierenzellkarzinom genauer analysiert werden.

Insgesamt ist die Kombination der beiden etablierten Techniken, Nierenzellkarzinom-Primärkulturen zum einen und orthotope Mausmodelle zum anderen, im Rahmen dieser Arbeit nur teilweise gelungen. Hierbei konnten die Ursachen nicht ausreichend ermittelt werden. Jedoch besteht weiterhin Bedarf eines stabilen Wachstums von vom Patienten abgeleiteter Tumoren im orthotopen Xenograftmodell, sodass eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob ein lokal-invasives Wachstum von Tumoren auf diesem Weg möglich ist und welches Metastasierungsverhalten diese aufweisen. Ein Vergleich der Histologie der humanen Nierenzellkarzinome mit der Histologie der im Mausmodell angewachsenen Tumore konnte vorgenommen werden, ist jedoch aufgrund des nicht reproduzierbaren Wachstums der verschiedenen Primärzellkulturen nur bedingt aussagekräftig. Im Vordergrund dieser Arbeit stand schlussendlich vor allem die Anpassung und

Verbesserung der Methodik, sodass die genannten Ziele in Folgeversuchen erreicht werden könnten.

Literaturverzeichnis

1. (DGHO), D. G. f. H. u. M. O. e. V. and D. G. f. U. e. V. (DGU) (2023). Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 4.0, 2023, AWMF-Registernummer: 043-017OL
2. Albers, P., et al. (2017). Uroonkologie kompakt Diagnostik und Therapie. Stuttgart, Schattauer GmbH.
3. An, Z., et al. (1999). "Development of a high metastatic orthotopic model of human renal cell carcinoma in nude mice: benefits of fragment implantation compared to cell-suspension injection." Clin Exp Metastasis **17**(3): 265-270.
4. Charles River Laboratories, Germany GmbH (2017). Research Models and Services Catalog. Charles River Laboratories, Germany GmbH: 40-43.
5. Choueiri, T. K. and R. J. Motzer (2017). "Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma." N Engl J Med **376**(4): 354-366.
6. di Martino, S., et al. (2018). "Renal cancer: new models and approach for personalizing therapy." J Exp Clin Cancer Res **37**(1): 217.
7. Dong, Y., et al. (2017). "Tumor Xenografts of Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma But Not Corresponding Cell Lines Recapitulate Clinical Response to Sunitinib: Feasibility of Using Biopsy Samples." Eur Urol Focus **3**(6): 590-598.
8. Ferlay, J., et al. (2018). "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018." Eur J Cancer **103**: 356-387.
9. Flanigan, R. C., et al. (2001). "Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer." N Engl J Med **345**(23): 1655-1659.
10. FUJIFILM VisualSonics, I. (2020). "Vevo 2100." Retrieved 10.08.2020, from <https://www.visualsonics.com/product/imaging-systems/vevo-2100>.
11. Grisanzio, C., et al. (2011). "Orthotopic xenografts of RCC retain histological, immunophenotypic and genetic features of tumours in patients." J Pathol **225**(2): 212-221.
12. Heng, D. Y., et al. (2009). "Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study." J Clin Oncol **27**(34): 5794-5799.
13. Höehn, W. and F. H. Schroeder (1978). "Renal cell carcinoma: two new cell lines and a serially transplantable nude mouse tumor (NC 65). Preliminary report." Invest Urol **16**(2): 106-112.
14. Inoue, T., et al. (2017). "Patient-derived xenografts as in vivo models for research in urological malignancies." Nat Rev Urol **14**(5): 267-283.
15. Jäger, W., et al. (2013). "Ultrasound-guided intramural inoculation of orthotopic bladder cancer xenografts: a novel high-precision approach." PLoS One **8**(3): e59536.

16. Karam, J. A., et al. (2011). "Development and characterization of clinically relevant tumor models from patients with renal cell carcinoma." Eur Urol **59**(4): 619-628.
17. Lang, H., et al. (2016). "Establishment of a large panel of patient-derived preclinical models of human renal cell carcinoma." Oncotarget **7**(37): 59336-59359.
18. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), D. K. e. V. D. u. D. K. D. (2020). Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 2.0, AWMF Registernummer: 043/017OL.
19. Linxweiler, J., et al. (2020). "Cancer-associated fibroblasts stimulate primary tumor growth and metastatic spread in an orthotopic prostate cancer xenograft model." Sci Rep **10**(1): 12575.
20. Linxweiler, J., et al. (2017). "Experimental imaging in orthotopic renal cell carcinoma xenograft models: comparative evaluation of high-resolution 3D ultrasonography, in-vivo micro-CT and 9.4T MRI." Sci Rep **7**(1): 14249.
21. Liu, Y., et al. (2020). "Collagen Scaffold with Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Remarkably Improves Intrauterine Adhesions in a Rat Model." Gynecol Obstet Invest **85**(3): 267-276.
22. Ljungberg, e. a. (2016). Guidelines on renal cell carcinoma, European Association of Urologists (EAU).
23. Lyons, S. K. (2015). "Imaging Mouse Models of Cancer." Cancer J **21**(3): 152-164.
24. Magaki, S., et al. (2019). "An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry." Methods Mol Biol **1897**: 289-298.
25. Méjean, A., et al. (2018). "Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma." N Engl J Med **379**(5): 417-427.
26. Mickisch, G. H., et al. (2001). "Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial." Lancet **358**(9286): 966-970.
27. Moch, H. (2008). "Funktionen des VHL-Proteins bei Entstehung und Progression von Nierenzellkarzinomen." Pathologe(29): 149-152.
28. Motzer, R. J., et al. (2002). "Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma." J Clin Oncol **20**(1): 289-296.
29. Motzer, R. J., et al. (1999). "Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma." J Clin Oncol **17**(8): 2530-2540.
30. Nicole K. Andeen, M. D., Maria Tretiakova, M.D., Ph.D. (2017, 07/2020). "Kidney tumor - Adult renal cell carcinoma - common - Papillary type 2." Retrieved 09.08.2020, from <http://www.pathologyoutlines.com/topic/kidneytumormalignnantrccpaptyp2.html>.
31. Okada, S., et al. (2019). "Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models." Cells **8**(8).

32. Otto, U., et al. (1985). "Transplantation of human renal cell carcinoma into NMRI nu/nu mice. III. Effect of irradiation on tumor acceptance and tumor growth." J Urol **134**(1): 170-174.
33. Patel, A., et al. (2019). "Patient-derived xenograft models to optimize kidney cancer therapies." Transl Androl Urol **8**(Suppl 2): S156-S165.
34. PathoPic (2001). "Bild-ID 1269, HE-Färbung." Retrieved 06.08.2020, from <https://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/getpic-fra.cfm?id=001269>.
35. PathoPic (2002). "Bild-ID 4892, HE-Färbung, 400x Vergrößerung." 12.06.2002. Retrieved 08.08.2020, from <https://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/getpic-fra.cfm?id=004892>.
36. PathoPic (2003). "Bild-ID 6581, HE-Färbung, 100x Vergrößerung." Retrieved 06.08.2020, from <https://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/getpic-fra.cfm?id=006581>.
37. Pavía-Jiménez, A., et al. (2014). "Establishing a human renal cell carcinoma tumorgraft platform for preclinical drug testing." Nat Protoc **9**(8): 1848-1859.
38. Prasad, S. R., et al. (2006). "Common and uncommon histologic subtypes of renal cell carcinoma: imaging spectrum with pathologic correlation." Radiographics **26**(6): 1795-1806; discussion 1806-1710.
39. Richmond, A. and Y. Su (2008). "Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics." Dis Model Mech **1**(2-3): 78-82.
40. Robert-Koch-Institut, G. d. e. K. i. D. e. V. (2017). Krebs in Deutschland. Berlin: 17.
41. Robert-Koch-Institut, G. d. e. K. i. D. e. V. (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014, Kapitel Niere-C64. Berlin: 100-103.
42. Rojas, J. D., et al. (2022). "Validation of a combined ultrasound and bioluminescence imaging system with magnetic resonance imaging in orthotopic pancreatic murine tumors." Sci Rep **12**(1): 102.
43. Sanmamed, M. F., et al. (2016). "Defining the optimal murine models to investigate immune checkpoint blockers and their combination with other immunotherapies." Ann Oncol **27**(7): 1190-1198.
44. Sivanand, S., et al. (2012). "A validated tumorgraft model reveals activity of dovitinib against renal cell carcinoma." Sci Transl Med **4**(137): 137ra175.
45. Sobczuk, P., et al. (2020). "Choosing The Right Animal Model for Renal Cancer Research." Transl Oncol **13**(3): 100745.
46. The Jackson Laboratory (2018). Mouse Strain Datasheet - 005557 NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ The Jackson Laboratory.
47. Truong, L. D. and S. S. Shen (2011). "Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms." Arch Pathol Lab Med **135**(1): 92-109.

48. Warren, A. Y., Harrison, David (2018). "WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies." World Journal of Urology **36**: 1913-1926.

49. Yang, C., et al. (2018). "Ki67 targeted strategies for cancer therapy." Clin Transl Oncol **20**(5): 570-575.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumor-Lokalisationen an allen Krebsfällen in Deutschland 2014.....	5
Abb. 2: Altersspezifische Erkrankungsrate nach Geschlecht, ICD 10 C64, Deutschland 2013-2014.....	6
Abb. 3: a: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, ICD 10 C64, Deutschland 1999 – 2014/2015. b: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle nach Geschlecht, ICD-10 C64, Deutschland 1999 – 2014/2015.....	6
Abb. 4: Verschiedene Funktionen des pVHL.....	10
Abb. 5: A: Zentrale Angriffspunkte der VEGF- und Tyrosinkinaseinhibitoren: Neben den VEGF-Tyrosinkinaseinhibitoren wie Axitinib, Pazopanib, Sorafenib und Sunitinib mit Wirkmechanismus an den entsprechenden Rezeptoren, sind auch der VEGF-Antikörper Bevacizumab und die Tyrosinkinaseinhibitoren Lenvatinib und Cabozantinib mit ihrem jeweiligem Wirkmechanismus dargestellt.....	13
Abb. 6: Vorarbeiten zum orthotopen Xenograftmodell – Tumorwachstum nach renal subkapsulärer Implantation von 1 x 10 ⁶ CAKI-2 Zellen.....	15
Abb. 7: Weg der Generierung und Charakterisierung der RCC-Primärzellkulturen, sowie deren Einsatz im PDX-Mausmodell.....	20
Abb. 8: Arbeitsschritte des OP-Verfahrens.....	22
Abb. 9: links: Visual Sonics Vevo 2100 Kleintier-Sonographiergerät (FUJIFILM Visual-Sonics 2020) Rechts: Beispielbild einer Doppler-Sonographie der linken Niere einer Maus (Aufnahme vom 22.05.2017).....	24
Abb. 10: links: Bruker Skyscan 1176 Kleintier-CT (Bruker Corporation, Billerica, USA); Rechts: beispielhafte CT Bilder des RCC der Maus.....	25
Abb. 11: links: Biospec Avance III 94/20 Kleintier-MRT (Bruker Biospin GmbH, Ettlingen); Mitte: T2 gewichtete Aufnahme; rechts: ADC Aufnahme.....	26
Abb. 12: Zeitplan zu Beginn der Versuchsphase.....	30
Abb. 13: Beispielbilder der Mikroskopie nativ der Primärzellkulturen NTB 265, NTB 621 und NTB 498. (Vergrößerung 100x).....	31
Abb. 14: Beispielbilder der Immunfluoreszenzfärbung: Färbung von CD90 (grün) zum Fibroblastennachweis und von Panzytokeratin (rot) zum Nachweis von Nierenzellkarzinomzellen (Vergrößerung 200x).....	31
Abb. 15: (Farbduplex-)Sonographie der linken Niere einer CAKI-2-Maus 14 Wochen nach OP.....	35
Abb. 16: Kontrastmittel CT Bilder der Nieren zweier CAKI-2-Mäuse 8 Wochen nach OP.....	36
Abb. 17: HE-Färbung eines CAKI2 Tumors der Maus.....	36

Abb. 18: Immunhistochemische Färbungen eines renal-subkapsulären CAKI-2 Tumors in der Maus (Vergrößerung 100x).....	37
Abb. 19: Weißliche Beläge der Nierenkapseln nach Implantation der Zelllinie NTB 498.....	39
Abb. 20: HE-Färbung der Läsionen der Nierenkapsel, Zelllinie NTB498 (Vergrößerung 100x).....	39
Abb. 21: Sonographie Balbc/nude Maus nach Zellimplantation der Zelllinie NTB 1102 39 Wochen nach OP.....	40
Abb. 22: Kontrastmittel-CT Bilder zweier Mäuse nach Implantation der Zelllinie NTB 1102 42 Wochen nach OP.....	40
Abb. 23: Linke Niere der BALB/c nude Maus mit der Zelllinie NTB 1102 mit deutlich zystischem Tumorwachstum.....	41
Abb. 24: IHC-Färbung des Tumors der Zelllinie NTB 1102 in einer BALB/c nude Maus. (Vergrößerung 100x).....	41
Abb. 25: IHC-Färbungen der Tumore der Zelllinie NTB 993 in NSG Mäusen (jeweils links Maus 1, rechts Maus 2) (Vergrößerung 100x).....	43

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: TNM-Klassifikation des klarzelligen Nierenzellkarzinoms.....	8
Tab. 2: Klinische Stadieneinteilung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms.....	8
Tab. 3: Histologische Charakteristika des Nierenzellkarzinoms.....	9
Tab. 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.....	18
Tab. 5: Für die in-vivo Versuche verwendete Mausstämme.....	23
Tab. 6: Übersicht zur Auswahl der verwendeten Zelllinien: Neben dem Metastasierungsgrad sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien aufgeführt.....	31
Tab. 7: Übersicht der Serien 1-5 unter Angabe der verwendeten Zelllinien.....	33
Tab. 8: Vor- und Nachteile der verschiedenen Mausmodelle.....	48
Tab. 9 Vor- und Nachteile sowie Erfolgsrate im PDX verschiedener Mausstämme.....	51
Tab. 10 Erfolgsraten von PDX des Nierenzellkarzinoms unter Verwendung verschiedener Mausstämme.....	52

Abkürzungsverzeichnis

ADC	apparent diffusion coefficient
Aqua dest.	Aqua destillata
ccRCC	clear cell renal cell carcinoma
CDX	cell-derived xenografts
chRCC	chromophobe renal cell carcinoma
c-MET	Hepatozyten Wachstumsfaktor Rezeptor
CT	Computertomographie
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DWI	diffusion weighted imaging
EPI	Echo Planar Imaging
GEM	genetically engineered mouse models
HIF α	Hypoxie induzierter Faktor
HU	Hounsfield-Einheiten
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IL-2	Interleukin-2
IVC	isolated ventilated cages
KG	Körpergewicht
LSAB	labelled Streptavidin Biotin
MGE	Multi-Gradienten-Echo-Sequenz
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian target of rapamycin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	non-obese diabetic
NSG	NOD SCID gamma
PD	programmed death protein
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PD-L1 bzw. 2	programmed death ligand 1 bzw. 2
PDX	patient-derived xenografts
pRCC	papillary renal cell carcinoma
RCC	renal cell carcinoma
SCID	severe combined immunodeficiency
SPF	spezifisch pathogenfrei
TBST	TBS-Tween
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von-Hippel-Lindau

Danksagung

Ich bedanke mich an dieser Stelle bei allen Personen, die bei der Erarbeitung und Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren und mich hierbei in den vergangenen sechs Jahren unterstützt haben.

Zuerst möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Junker und meinem Betreuer Dr. Johannes Linxweiler danken. Die hervorragende Betreuung sowohl während der experimentellen als auch während der Schreibphase ist mit Sicherheit außergewöhnlich gewesen. Vor allem hat Dr. Johannes Linxweiler mich immer wieder mit seinem Ehrgeiz angesteckt und es geschafft mir das wissenschaftliche Arbeiten mit Freude und Humor fachlich nahezubringen. Ein großes Dankeschön hierfür.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitenden des Forschungslabors der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes (UKS), die mich immer herzlich empfangen und geduldig bei jeglichen Labortätigkeiten unterstützen. Hier wurden mir zudem selbstverständlich Räumlichkeiten und Material zu Verfügung gestellt. Außerdem gilt mein Dank Barbara Linxweiler, die mir in diesem Bereich sehr viel Zeit und anregende Diskussionen entgegenbrachte.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitenden des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des UKS. Ohne die Mithilfe dieser Menschen, wären die Unterbringung, Pflege, Bildgebung und Operation der Versuchstiere nicht möglich gewesen.

Eine weitere Hilfe war das von der Klinik für Urologie und Kinderurologie des UKS veranstaltete Doktorandenseminar. Vielen Dank für die kritischen Rückfragen und Diskussionen bezüglich meiner Arbeit und die hilfreichen Anregungen und Vorträge zum Gelingen einer Promotion.

Zudem gilt mein Dank der Forschungskommission HOMFOR, welche die Arbeit finanziell überhaupt möglich machte.

Ein riesiges Dankeschön auch an meine Familie und Freunde, sie konnten mich immer wieder ermutigen und haben mir den Rücken freigehalten, wenn es notwendig war.

Zu guter Letzt möchte ich mich vor allem bei meinen Eltern bedanken. Ohne euch wären weder das Studium noch die Promotion möglich gewesen. Ihr habt mich zu jeder Zeit und in all meinen Entscheidungen bedingungslos unterstützt. Hierfür bin ich euch unendlich dankbar.

Lebenslauf

Publikation

„Cancer-associated fibroblasts stimulate primary tumor growth and metastatic spread in an orthotopic prostate cancer xenograft model“ (Linxweiler J, Hajili T, Körbel C, Berchem C, Zeuschner P, Müller A, Stöckle M, Menger MD, Junker K, Saar M.) Sci Rep. 2020 Jul 28;10(1):12575. doi: 10.1038/s41598-020-69424-x. PMID: 32724081; PMCID: PMC7387494.

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

Tag der Promotion: 27. November 2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatler: Prof. Dr. Kerstin Junker

Prof. Dr. Lorenz Thurner