

Aus dem Bereich Urologie und Kinderurologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Stöckle

Etablierung eines genetischen Prognosescores für klarzellige Nierenzellkarzinome

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von Julia Ellengard Grimm
geb. am: 15.05.1987 in Homburg

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlicher Mitteilungen und der angegebenen Quellen angefertigt habe. Alle eingesetzten Methoden wurden selbstständig etabliert. Alle weiteren Experimente und sämtliche Auswertungen wurden persönlich und selbstständig durchgeführt.

Die Arbeit wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Tübingen, den 20.01.2019

Julia Grimm

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	1
II. Summary	2
1. Einleitung	4
1.1 Das Nierenzellkarzinom	4
1.2 Epidemiologie und Ätiologie	4
1.3 Histologische und genetische Subtypen	7
1.4 Staging und Grading	10
1.5 Symptomatik und Diagnostik	12
1.6 Prognose	13
1.6.1 Prognostische Biomarker	15
1.7 Therapie	17
1.7.1 Therapie des lokalisierten NZK	17
1.7.2 Therapie des fortgeschrittenen NZK	18
1.7.2.1 Medikamentöse Therapie des metastasierten NZK	18
1.8 Genetische Veränderungen im kNZK	20
1.9 Metastasierung	22
2. Zielstellung	26
3. Material und Methoden	28
3.1 Verwendete Materialien	28
3.1.1 Geräte	28
3.1.2 Chemikalien	28
3.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen	29
3.1.4 Kits	30
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	30
3.1.6 Primer, Enzyme und Reagenzien	31
3.2 Patientenkollektiv für FISH und Genexpressionsanalysen	32
3.3 Patientenkollektiv für Tissue Micro Array (TMA) FISH Analyse	32
3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	33
3.4.1 Grundlagen der FISH	33
3.4.2 Zellkernisolation aus Gewebe	34
3.4.3 Vorbehandlung und Hybridisierung isolierter Zellen	34
3.4.4 Verwendete Sonden	35
3.4.5 Stringentes Waschen und Gegenfärbung	36
3.4.6 Vorbehandlung und Hybridisierung von FFPE-Gewebe	36
3.4.7 Stringentes Waschen und Gegenfärbung	36
3.4.8 Auswertung der Fluoreszenzsignale	37
3.5 Molekularbiologische Methoden	37

3.5.1 RNA-Isolation aus Gewebe und Zelllinien	37
3.5.2 Photometrische Mengen- und Reinheitsbestimmung der RNA.....	38
3.5.3 cDNA-Synthese.....	38
3.5.4 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	39
3.5.5 Auswertung:	40
3.6 Zellkulturmethoden	40
3.6.1 Verwendete Zelllinien	40
3.6.2 Subkultivierung	41
3.6.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	41
3.7 Funktionelle Analysen.....	42
3.7.1 Transiente Inhibierung von <i>EZH2</i> , <i>BCL-xL</i> und <i>SEPT9</i>	42
3.7.2 Proliferation.....	43
3.7.3 Migration	43
3.7.4 Apoptose.....	44
3.8 TCGA-Datenbank	44
3.9 Statistische Auswertung	45
3.9.1 ROC Analyse.....	45
3.9.2 Kaplan-Meier-Schätzer.....	45
3.9.3 Binomiale logistische Regression.....	45
3.9.4 Cox-Regressionsanalyse.....	46
3.9.5 REST© 2009	47
3.9.6 P-Wert	47
3.9.7 Exakter Fisher-Test	47
4. Ergebnisse	48
4.1 Patientenkollektive	48
4.2 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung	48
4.2.1 Berechnung und Verwendung des TNSA-Wertes.....	48
4.3 Zusammenhang zwischen Metastasierung und TNSA in Kohorte 1.....	49
4.3.1 Häufigkeiten der Veränderungen	49
4.3.2 Regressionsanalyse zum Vergleich von klinischen Parametern und TNSA	50
4.3.3 Einführung eines Risikostratifizierungsmodells.....	51
4.3.4 Analyse der organbegrenzten Tumore aus Kohorte 1	53
4.3.5 Analyse der organüberschreitende Tumore aus Kohorte 1.....	54
4.3.6 Vergleich des Risikostratifizierungsmodells mit dem Leibovich-Score	55
4.4 Überlebensanalysen für Kohorte 1	56
4.4.1 Progressionsfreies Überleben nach TNSA	56
4.4.2 Gesamtüberleben und tumorspezifisches Überleben nach TNSA.....	57
4.4.3 Progressionsfreies Überleben nach Anwendung des Risikoscores	58

4.4.4 Gesamtüberleben und tumorspezifisches Überleben nach Anwendung des Risikoscores ...	59
4.4.5 Überlebensanalysen in organbegrenzten Tumoren.....	60
4.4.5.1 Progressionsfreies Überleben	60
4.4.5.2 Gesamt- und tumorspezifisches Überleben	62
4.5 Etablierung des genetischen Prognoscores auf formalinfixierten Gewebsschnitten	63
(Kohorte 2, Tissue Micro Arrays)	63
4.5.1 Bestimmung der Cut-Off-Werte für die Verwendung der FISH-Sonden auf Schnittpräparaten.....	63
4.5.2 Korrelation der CNVs und des TNSA mit der Metastasierung	65
4.5.3 Häufigkeiten der chromosomalen Aberrationen in Kohorte 2	66
4.5.4 Regressionsanalysen zum Vergleich von klinischen Prognoseparameter und TNSA in Kohorte 2.....	66
4.5.5 Validierung des Risikoscores	67
4.5.6 Analyse der organbegrenzten Tumore aus Kohorte 2	68
4.5.7 Anwendung der Risikostratifizierung in der organbegrenzten Kohorte 2.....	69
4.6 Überlebensanalysen für Kohorte 2	70
4.6.1 Progressionsfreies Überleben nach TNSA	70
4.6.2 Gesamtüberleben und tumorspezifisches Überleben nach TNSA.....	71
4.6.3 Progressionsfreies Überleben nach Risikoscore.....	71
4.6.4 Gesamt- und tumorspezifisches Überleben nach Anwendung des Risikoscore	72
4.6.5 Überlebensanalysen in organbegrenzten Tumoren in Kohorte 2	73
4.6.5.1 Progressionsfreies Überleben nach TNSA in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2	73
4.6.5.2 Gesamtüberleben und tumorspezifisches Überleben nach TNSA in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2	74
4.6.5.3 Progressionsfreies Überleben in organbegrenzten Tumoren nach Risikoscore.....	75
4.6.5.4 Gesamt- und tumorspezifisches Überleben in organbegrenzten Tumoren nach Risikoscore	76
4.7 Validierung der untersuchten chromosomalen Regionen durch die Analyse des TCGA- Datensatzes.....	77
4.8 Genexpressionsanalysen.....	79
4.8.1 Selektion von Kandidatengenen	79
4.8.2 Messung der mRNA-Expression in primärem Nierentumorgewebe.....	81
4.8.3 Korrelation der Genexpression zur genetischen Charakterisierung der Tumorgewebe	82
4.8.4 Korrelation der mRNA-Expression zum tumorspezifischen Überleben und zur metachronen Metastasierung.....	84
4.8.5 Korrelation der mRNA Deregulation der TCGA-Kohorte zum Überleben	86
4.9 Funktionelle Analysen.....	87
4.9.1 Transiente Inhibierung der Genexpression in Zelllinien	87
4.9.2 Proliferation.....	89

4.9.3 Migration	90
4.9.4 Apoptose.....	91
5. Diskussion	94
5.1 Methodik der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung.....	94
5.1.1 Validierung des TNSA-Scores an kryokonserviertem Gewebe (Kohorte 1).....	95
5.1.2 Etablierung eines Algorithmus zur Risikostratifizierung	98
5.1.3 Organbegrenzte und organüberschreitende Tumore.....	102
5.1.4 Überlebensanalysen Kohorte 1	103
5.2 Etablierung der Methode auf formalinfixierten Gewebsschnitten.....	105
5.2.1 Cut-Off Bestimmung für Kohorte 2	105
5.2.2 Validierung des TNSA und des Risikoscores auf Gewebsschnitten der Kohorte2	107
5.2.3 Überlebensanalysen der Kohorten 2.....	108
5.3 Vergleichbarkeit der Kohorten	109
5.4 Validierung anhand der TCGA Daten	110
5.5 mRNA Expressionsanalysen im Gewebe klarzelliger Nierenzellkarzinome	112
5.5.1 Analyse des Zusammenhangs von Genexpression und Überleben	114
5.5.2 Netzwerkanalyse der betroffenen Gene.....	117
5.6 Expression ausgewählter Gene in Zelllinien und funktionelle Analysen.....	118
5.6.1 <i>EZH2</i>	118
5.6.2 <i>BCL-xL</i>	120
6. Schlussfolgerungen und Ausblick	122
III. Literatur	VII
IV. Abbildungsverzeichnis.....	XXVII
V. Tabellenverzeichnis	XXIX
VI. Abkürzungsverzeichnis	XXX
VII. Publikationsliste.....	XXXIII
VIII. Danksagung	XXXIII
IX. Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Meinem Großvater

I. Zusammenfassung

Tumorerkrankungen sind geprägt von diversen, teils entitätsspezifischen, genomischen Veränderungen, die zur Entstehung der Tumore, zu deren Wachstum und zum Teil zur Metastasierung führen. Das Nierenzellkarzinom stellt den dritthäufigsten urologischen Tumor dar und ist in seiner Genese maßgeblich geprägt von Funktionsverlusten in Genen, die auf Hypoxie reagieren. Zusätzlich häufen Nierentumore im Verlauf ihrer Entstehung weitere Veränderungen an, die teils als „driver“ den Progress der Erkrankung vorantreiben und teils als sogenannte „passenger“ keinen direkten Vorteil für die Tumorzellen darstellen, aber insgesamt zu einer zusätzlichen Komplexität des Krebsgenoms führen. Für die, in der modernen Krebstherapie immer wichtiger werdende individualisierte, oder personalisierte Medizin, ist es notwendig diejenigen Veränderungen zu identifizieren, aus denen sich eine geeignete Therapie und/oder Nachsorge für den Patienten ableiten lassen. Da das durchschnittliche 5-Jahresüberleben durch die Ausbildung von Fernmetastasen des Nierenzellkarzinoms von etwa 90% auf nur noch etwa 10% sinkt, ist die Metastasierung einer der wichtigsten prognostischen Faktoren. Die Identifikation derer Veränderungen, die zu einem Progress der Erkrankung beitragen und damit maßgeblich die Prognose der Patienten beeinflussen, ist demzufolge enorm wichtig. Ausgehend von der genetischen Beschaffenheit eines Tumors kann daraus die Nachsorge und Therapie individuell an den einzelnen Patienten angepasst werden. In vorangegangenen array-basierten komparativen genomischen Hybridisierungen und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Analysen wurden genetische Aberrationen identifiziert, die mit der Metastasierung und dem Überleben von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen korrelierten. Die Validierung dieses genetische Scores und Identifikation sowie Analyse metastasierungsassoziierter Gene wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Es ist gelungen den zuvor bereits publizierten genetischen Prognosescore (TNSA) an einer unabhängigen Kohorte zu validieren. Um die Aussagekraft zu verbessern und die Integration in bestehende prognostische Schemata zu ermöglichen, wurden Vergleiche des TNSA mit etablierten prognostischen Parametern durchgeführt, woraus sich ein neuer Risikoscore errechnen ließ, welcher die T-Kategorie und den genetischen Prognosescore einschloss. Dieser neue Risikoscore ist für die Stratifizierung von Patientenkohorten und für die individuelle Risikobewertung von Patienten hochsignifikant und mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 88% den anderen untersuchten prognostischen Parametern überlegen. Als Vorhersagemodell für eine metachrone Metastasierung ist der Risikoscore auch in

organbegrenzten Tumoren geeignet. Es konnte eine hochsignifikante Trennung der Überlebenskurven und ein über 14-fach erhöhtes Metastasierungsrisiko für Hochrisikopatienten gezeigt werden. Anhand einer zweiten Kohorte wurde der genetische Score für die Verwendung von formalinfixierten in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeschnitten etabliert. Dies erlaubte die Anwendung des neuen, integrierten Risikoscores für diese Kohorte, wodurch eine Validierung dessen erreicht werden konnte. Für organbegrenzte Tumore zeigte sich, dass der genetische Prognosescore der einzige Parameter ist, welcher signifikant mit dem Metastasierungsrisiko assoziiert ist. Der neu erstellte Risikoscore führte auch in der Validierungskohorte zu einer signifikanten Stratifizierung der Überlebenskurven mit einem über 4-fach erhöhten Metastasierungsrisiko in der Gesamtkohorte und einem über 10-fach erhöhten Risiko in organbegrenzten Tumoren für Patienten in der Hochrisikogruppe.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Gene identifiziert, welche auf den veränderten chromosomalen Regionen liegen und im Metastasierungsprozess eine Rolle spielen könnten. Dazu wurden die Daten des The Cancer Genome Atlas (TCGA) ausgewertet und 12 Kandidatengene ausgewählt, von welchen sich sechs in anschließenden quantitativen Untersuchungen als signifikant dereguliert in metastasierten Tumoren erwiesen und mit einem verkürzten Überleben assoziiert waren. Einen funktionellen Einfluss auf das Überleben von Tumorzellen konnte für BCL-xL nachgewiesen werden. Die spezifische Inhibierung der BCL-xL messenger-RNA führte zur Aktivierung der Caspasekaskade in Folge dessen zur Apoptose.

II. Summary

Tumours are characterized by diverse and partly entity specific genomic aberrations, that lead to tumorigenesis and metastatic spread. Renal cell carcinomas are the third most common urologic cancers and are mainly characterized by the loss of function of genes involved in hypoxia signalling. In addition, renal tumours accumulate aberrations that can either, as “drivers”, promote the progression of the disease, or as so called “passengers”, not yield a direct advantage for tumour cells, but result in added complexity of the cancer genome. For the concept of individualized or personalized medicine in modern cancer therapy it is necessary to identify those aberrations from which a suitable therapy and/or a fitting follow-up for the patient can be deduced. As the mean 5-year survival rate drops from about 90% to a mere 10% through the formation of metastasis it is apparent that metastasis formation is one of the most important prognostic factors. The identification of the aberrations that cause a progress of the disease and thereby essentially influence the patient’s prognosis is consequently hugely important. Based

on the genetic make-up of a tumour the follow-up and therapy can be tailored to the individual patient. In previous array based comparative genomic hybridization and fluorescent-in-situ-hybridization analyses genetic aberrations have been identified, that correlate with metastasis status and survival of patients with clear cell renal cell carcinoma. The validation of this genetic score and the identification as well as analysis of metastasis associated genes was carried out in the present work.

The previously published genetic prognostic score (TNSA) was successfully validated in an independent cohort. To improve the significance of the TNSA and enable the integration of it into existing prognostic schemes, it was compared to established prognostic parameters whereby a new risk score was calculated which comprises of the T-category and the genetic prognostic score TNSA. This new risk score significantly stratifies patient cohorts and is, with a sensitivity and specificity of 88%, superior to the other analysed prognostic parameters. As a prediction model for metachronous metastasis the new risk score is also applicable in organ confined tumours. A highly significant separation of the survival curves and an over 14-fold increase in metastatic risk was demonstrated for high risk patients. Using a second cohort the analysis of the genetic score was established and validated on formalin fixed paraffin embedded tissue sections. This allowed the application of the new integrated risk score for this second cohort, whereby a validation of the score was accomplished. For organ confined tumours the genetic prognostic score (TNSA) was the only parameter significantly associated with metastasis in the second cohort. The newly created risk score also significantly stratified the survival curves in this validation cohort with a 4-fold increase in metastatic risk for the whole cohort and a 10-fold increase for patients with organ confined tumours grouped into the high-risk group.

For the second part of this work genes which are located on the aberrant chromosomal regions and might play a role in the metastatic process were identified. For this purpose, the data of The Cancer Genome Atlas (TCGA) was analysed and 12 candidate genes selected of which six were shown to be significantly deregulated in metastatic tumours and associated with shortened survival in subsequent quantitative analyses. A functional influence on the survival of tumour cells was demonstrated for *BCL-xL*. The specific inhibition of BCL-xL messenger RNA lead to the activation of the caspase cascade and as a result to apoptosis.

1. Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

Im Jahre 1883 beschrieb Paul Grawitz die „sogenannten Lipome der Niere“ als Geschwülste, welche zwar Fett enthielten, jedoch kein Fettgewebe seien. Mit dieser Beobachtung bestätigte er die von Robin bereits 1853 beschriebenen „Lipome intra-périnéphrique“, welche dieser von den zu jener Zeit ausschließlich als Lipome bezeichneten Tumoren abgrenzen wollte. Diese Ergebnisse waren für die noch junge urologische Pathologie eine kleine Revolution, jedoch zog Grawitz aus seiner Untersuchung letztendlich den falschen Schluss, nämlich, dass der Ursprung dieser Tumore die Nebenniere sei (Grawitz, 1883). Aus heutiger Sicht kann angenommen werden, dass es sich bei den beschriebenen Tumoren um Nierenzellkarzinome handelte, welche mit einer Häufigkeit von 90% den Großteil der malignen Neoplasien der Niere ausmachen. Ihr zellulärer Ursprung sind die epithelialen Zellen der Nephrone. Die wirklichen Lipome der Niere sind gutartige, jedoch sehr seltene (<1%) Tumore; selbiges gilt für die Mehrzahl der Nebennierentumore.

1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Bösartige Neubildungen der Niere machen etwa 2-3% der jährlich weltweit diagnostizierten Krebsarten aus und sind nach dem Prostatakarzinom und dem Urothelkarzinom der Harnblase die dritthäufigste urologische Tumorerkrankung. Etwa 90% dieser Tumore sind Nierenzellkarzinome, die verbleibenden 10% machen Nierenbeckentumore und seltenere Erkrankungen aus. Im Verlauf der letzten vier Dekaden war ein Anstieg der Inzidenz von Nierentumoren in allen Industrienationen zu verzeichnen. Das jährliche Wachstum der Inzidenzrate betrug dabei 2% (Chow et al., 2010). Obwohl es große Unterschiede auch innerhalb eines Kontinents gibt, weisen Europa und die USA eine besonders hohe und Asien sowie Afrika eine besonders niedrige Rate an Neuerkrankungen auf (Curado et al., 2007). Erst ab Mitte der 1990er Jahre ist für einige europäische Länder eine Stagnation und teilweise sogar ein Rückgang der Inzidenz und Mortalität beschrieben worden (Hock et al., 2002; Levi et al., 2008). In den meisten Ländern, unter anderem in den Vereinigten Staaten von Amerika, steigt die Anzahl neuer Fälle weiterhin jährlich an (King et al., 2014; Znaor et al., 2015). Die Zahl, der an Nierentumoren Neuerkrankten wird weltweit jährlich auf 338.000 geschätzt, wobei die Erkrankung bei 144.000 Menschen jedes Jahr zum Tod führt. Damit ist der Nierentumor der insgesamt neunthäufigste Tumor bei Männern und der vierzehnthäufigste bei Frauen. In den westlichen Ländern ist er mit einer Inzidenz von 3,3 % sogar der siebthäufigste Tumor (Ferlay et al., 2015). Von der Gesamtzahl an Neuerkrankungen entfielen im Jahr 2012 etwa 84.400 auf

die Europäische Union. Am Häufigsten sind hier, mit einer Inzidenz von mehr als 16 per 100.000 Einwohner, Menschen in der Tschechischen Republik betroffen (Ferlay et al., 2013). Damit liegen sie auch im internationalen Vergleich weit vor anderen Ländern. In Deutschland wurden im Jahr 2013 14.810 neue Fälle und 5.458 Todesfälle registriert (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2016). Damit ist die Rate in Deutschland vergleichsweise hoch. Der Anstieg der Inzidenz lässt sich nicht allein durch verbesserte Diagnoseverfahren begründen. Zwar werden inzwischen kleinere Tumore häufiger entdeckt als dies noch vor 20 Jahren der Fall war (Kane et al., 2008), woraus sich neue Anforderungen an die Prognose ergeben, jedoch nimmt die Zahl an neu entdeckten größeren Tumoren nicht proportional zum Anstieg von diagnostizierten kleinen Tumoren ab. Allgemein sind Männer etwa 1,5- bis 2-mal so häufig betroffen wie Frauen. Mehr als 50% der Nierentumore werden bei Menschen zwischen dem 55sten und 75sten Lebensjahr diagnostiziert. Das mediane Diagnosealter liegt bei 64 Jahren und ist bei beiden Geschlechtern vergleichbar (Howlader et al., 2017).

Eine Reihe an Risikofaktoren, welche die Entstehung von Nierentumoren begünstigen, sind inzwischen belegt. Der wohl wichtigste kausale Faktor ist das Zigarettenrauchen, wobei nicht nur der aktive Konsum, sondern auch das passive Rauchen das Risiko, an Nierentumoren zu erkranken, erhöht. Der Anstieg des Erkrankungsrisikos liegt beim Tabakkonsum zwischen 20% und 50% und ist direkt proportional zur konsumierten Menge (Cumberbatch et al., 2016; Hunt et al., 2005). Der zugrundeliegende Mechanismus der Karzinogenese durch Tabakkonsum beruht auf der Entstehung von DNA-Schäden durch die im Rauch enthaltenen Schadstoffe. Speziell für das Nierenzellkarzinom wird angenommen, dass das Risiko zusätzlich durch die Genese einer chronischen Hypoxie im Gewebe erhöht wird (Sharifi and Farrar, 2006). Auch hierfür ist Rauchen ein maßgeblicher Risikofaktor. Der zweite wichtige Risikofaktor ist Adipositas. Im Vergleich zu normalgewichtigen Personen ist das Risiko, an einem Nierentumor zu erkranken, bereits ab einem Body-Mass-Index (BMI) von 25 kg/m^2 um das 1.43-fache bei Männern und das 1.57-fache bei Frauen erhöht. Ab einem BMI von 35 kg/m^2 ist das Risiko sogar um 71%- 150% im Vergleich zu Normalgewichtigen erhöht (Adams et al., 2008; Macleod et al., 2013). Durchschnittlich wird davon ausgegangen, dass das Erkrankungsrisiko mit einer Zunahme um 5 kg/m^2 des BMI für Männer um 24% und für Frauen um 34% steigt (Renehan et al., 2008). Übergewicht ist für die Entstehung von schätzungsweise 30%-40% aller Nierenzellkarzinome ausschlaggebend. Der Zusammenhang zwischen Übergewicht und der Tumorerkrankung liegt neben der chronischen Hypoxie in diesem Fall mutmaßlich in der Veränderung des Metaboloms der Zellen (Calle and Kaaks, 2004). Hypertonie führt ebenso zu

einem erhöhten Erkrankungsrisiko, wobei die Höhe des Blutdrucks proportional zum Risiko ist (Vatten et al., 2007; Weikert et al., 2008). Nicht selten treten Kombinationen aus Tabakkonsum, Adipositas und Hypertonie auf. Das NZK-Risiko ist in diesem Fall höher als beim Vorliegen von nur einem der Risikofaktoren (Flaherty et al., 2005). Des Weiteren sind Vorerkrankungen bekannt, die für ein NZK prädisponieren. Dazu zählen Zystennieren (Jilg et al., 2013), Nierensteine (Cheungpasitporn et al., 2015), Hepatitis C (Gonzalez et al., 2015), tuberöse Sklerose (Rakowski et al., 2006) sowie eine chronische Niereninsuffizienz oder chronische Infektionen des Harntraktes (Nouh et al., 2010; Parker et al., 2004). In Fällen von Dialysepflicht ist unklar, ob die Krankheit selbst oder die Langzeithämodialyse als ätiologischer Faktor angesehen werden muss. Nierentransplantierte Personen erkranken häufiger an NZK als die restliche Bevölkerung, wobei hier im Bereich der Pathogenese noch ein hoher Forschungsbedarf besteht. (Kasiske et al., 2004; Stewart et al., 2009). Der Einfluss diverser Nahrungs- und Genussmittel auf das NZK-Risiko wurde vielfach untersucht, jedoch sind Ergebnisse aus diesen Studien nicht konsistent (2007). Eine protektive Wirkung wurde für den Konsum von Früchten und Gemüse sowie für den moderaten Alkoholkonsum beschrieben (Bellocco et al., 2012; Lee et al., 2009; Song et al., 2012). Potentiell karzinogene chemische Stoffe und Metalle, mit denen Menschen im Arbeitsumfeld in Kontakt kommen können, wurden ebenfalls mit teils widersprüchlichen Ergebnissen untersucht. Der chemische Zusatzstoff Trichlorethylen (TCE) führt nachweislich zu einer signifikanten Erhöhung des NZK-Risikos je nach Grad der Belastung (Kelsh et al., 2010; Moore et al., 2010). Boffetta et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen NZKs und der Exposition mit Arsen, Blei, Cadmium, Chrom und Nickel mit dem Ergebnis, dass nur eine Bleibelastung das NZK-Risiko erhöht (Boffetta et al., 2011). In Meta-Analysen zeigte sich kein signifikanter Anstieg des Erkrankungsrisikos durch Asbest oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Karami et al., 2011; Sali and Boffetta, 2000).

Die hereditären Formen der NZKs sind mit etwa 4% sehr selten, treten aber bei Verwandten ersten Grades von NZK-Patienten doppelt so häufig auf wie in der übrigen Population (Clague et al., 2009; Siegel et al., 2016). Typisch für vererbte Tumorerkrankungen ist, dass die Tumore multifokal und bilateral auftreten und Patienten zum Zeitpunkt der Erkrankung erheblich jünger sind als Patienten mit sporadischem NZK (Shuch et al., 2014). Das häufigste hereditäre Nierenzellkarzinom-Syndrom ist das von Hippel-Lindau Syndrom, bei dem Keimbahnmutationen des Von-Hippel-Lindau (*VHL*)-Gens auftreten. Weitere erbliche Formen sind das hereditäre papilläre NZK, die hereditäre Leiomyomatose, das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom sowie seltenere genetische Prädispositionen, wie beispielsweise familiär gehäuft

auftretende *BRCA1 associated protein-1 (BAP1)*-Mutationen (Haugh et al., 2017; Ljungberg et al., 2011; Popova et al., 2013).

1.3 Histologische und genetische Subtypen

Vor 20 Jahren wurde die grundlegende Klassifizierung von Nierentumoren in benigne und maligne Subtypen auf einer Konferenz in Heidelberg beschlossen (Kovacs et al., 1997). Diese ‚Heidelberg Klassifikation‘ wurde sowohl von pathologischer Seite als auch durch die Verwendung genetischer und molekularbiologischer Untersuchungen seither erweitert und verfeinert. Die aktuelle Klassifikation von Nierentumorsubtypen der World Health Organisation (WHO) umfasst insgesamt 50 voneinander differenzierbare Entitäten, darunter die Nierenzellkarzinome (NZK), Tumore von mesenchymalem Ursprung, metanephrische Tumore und Mischformen (Moch et al., 2016). Seit 2004 wurde das Spektrum an Nierentumoren um acht distinkte Entitäten erweitert. Ziel dieser Optimierung ist es, den Krankheitsverlauf besser abschätzen und den Patienten die bestmögliche Therapie anbieten zu können. Nach wie vor machen die Nierenzelltumore den größten Teil der diagnostizierten Neoplasmen des Nierenparenchyms aus (Eble et al., 2004). Im Folgenden werden kurz die häufigsten Subtypen vorgestellt. Tabelle 1 fasst alle derzeit bekannten Subtypen zusammen. In Tabelle 2 sind die hereditären Formen dargestellt.

Das klarzellige Nierenzellkarzinom (kNZK), auch konventionelles NZK genannt, macht dabei einen Anteil von 75% aus (Lopez-Beltran et al., 2006). Charakterisiert ist das kNZK makroskopisch durch eine typische hell- bis goldgelbe Farbe. Unter dem Mikroskop zeigt sich ein klares Zytoplasma, da durch den Färbungsprozess die Lipide und Glykogene, welche dem kNZK seine Farbe geben, gelöst und ausgewaschen werden. Der Tumor wächst zumeist solide, kann multifokal und bilateral auftreten. Wegen seiner starken Vaskularisation sind Einblutungen typisch. Nekrosen, zystisches oder sarkomatoides Wachstum treten ebenfalls auf und haben einen Einfluss auf die Prognose. Genetisch ist das kNZK maßgeblich durch den Verlust einer Region des kurzen Arms von Chromosom 3 gekennzeichnet, welcher in etwa 90% der Fälle auftritt. Wie bei der hereditären Form des kNZK, die nur in etwa 4% der Fälle vorliegt, weist die spontane Form Deletionen und/oder Mutationen des *VHL*-Gens auf. Der Verlust dieses Tumorsuppressorgens ist der entscheidende tumorinitiierende Schritt der Tumorgenese des kNZK (Latif et al., 1993). Kapitel 1.8 befasst sich näher mit den genetischen Veränderungen und der Heterogenität des klarzelligen Nierenzellkarzinoms.

Das zweithäufigste NZK ist mit 10%-15% das papilläre NZK (pNZK). Dabei wird dieser Subtyp in 2 Unterkategorien gegliedert, Typ 1 und Typ 2, die sich hinsichtlich ihrer

mikroskopischen Erscheinung und Prognose unterscheiden. Das Wachstumsmuster beider Typen ist papillär oder tubulopapillär. Bei Typ 1 sind die Zellen charakteristisch klein und kubisch mit basophilem Zytoplasma. Mit zunehmender Entdifferenzierung findet man zylindrisch eosinophil veränderte Zellen, entsprechend einem Typ 2 papillären NZK (Delahunt and Eble, 1997). Einblutungen und nekrotische Areale sowie sarkomatoide Dedifferenzierung können in beiden Subtypen auftreten. Da Typ 1 Tumore in der Regel niedrigere Entdifferenzierungsgrade aufweisen als Typ 2, ist auch die Prognose der Typ 1 Tumore im Vergleich mit Typ 2 besser (Delahunt et al., 2001). Multifokale Tumore sind beim pNZK, vor allem bei der hereditären Form, häufiger als bei anderen Nierenkarzinomen (Eble et al., 2004). Wie beim kNZK gibt es beim pNZK Gemeinsamkeiten der hereditären und spontanen Formen der Tumore. Die häufigsten Veränderungen des pNZK sind Zugewinne auf Chromosom 7 und 17. Die hereditäre Form des Typ 1 ist charakterisiert durch Mutationen des *MET*-Protoonkogens auf Chromosom 7q31 (Lubensky et al., 1999). Typ 2 pNZK treten im Zusammenhang mit hereditären Leiomyomatose-NZK auf. Genetisch liegt hier eine Inaktivierung des Fumarat-Hydratase-Gens (*FH*) auf Chromosom 1q42 zugrunde (Toro et al., 2003).

Das chromophobe Nierenzellkarzinom (chNZK) tritt mit einer Häufigkeit von 5% auf und hat einen zumeist günstigen Verlauf. Das 5-Jahres-Überleben liegt bei über 90% (Przybycin et al., 2011; Volpe et al., 2012). Im seltenen Fall des Auftretens von Metastasen ist die Prognose ähnlich schlecht und durch die selben Faktoren definiert wie bei klarzelligem NZK (Klatte et al., 2008a). Sarkomatoide Dedifferenzierung und Nekrosen deuten auf einen schlechten Verlauf hin. Histologisch sind für das chNZK große, helle Zellen mit definierter Zellmembran charakteristisch. Die Tumore wachsen solide und sind durch die Hale-Färbung eindeutig von anderen Nierentumoren abgrenzbar. Einzig die Abgrenzung zum Onkozytom ist bei eosinophilem Zytoplasma nicht immer eindeutig. Genetisch weist das chNZK zahlreiche Monosomien auf, von denen der Verlust von Chromosom 1 und Chromosom 10 am häufigsten auftritt (Sanjmyatav et al., 2005). Verluste anderer Chromosomen, wie -2, -6, -1, -17, -21, sind im Vergleich zu anderen Entitäten häufig. Als erbliche Form des chNZK ist das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom bekannt, welches durch eine Mutation des Follikulin-Gens (*FLCN*) ausgelöst wird und neben diversen Nierenzellkarzinomen auch zu Lungenzysten und Fibrofollikulomen führen kann.

Die häufigste benigne Form eines epithelialen Tumors der Niere ist das Onkozytom (Amin et al., 1997; Trpkov et al., 2010). Onkozytome wachsen solide und ohne Pseudokapsel. Mikroskopisch sind granuläre, eosinophile Zellen erkennbar. Diese Erscheinungsform ist durch

die vermehrte Ansammlung defekter Mitochondrien in den Zellen begründet (Störkel et al., 2016). Noch ist unklar, ob Onkozytome unter gewissen Umständen zu chromophoben NZKs progredieren können. Ähnlichkeiten zwischen Onkozytomen und chNZKs, wie der Verlust des Chromosoms 1, deuten eine Verwandtschaft der beiden Subtypen an (Joshi et al., 2015). Ein direkter Progress eines Onkozytoms ist allerdings nicht nachgewiesen.

Tabelle 1 WHO Klassifikation der Nierentumore, Übernommen aus Störkel et al., 2016; Nierentumore im Erwachsenenalter.

<p>WHO-Klassifikation der Nierentumoren (2004)</p> <p>Epitheliale Nierenzelltumoren:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Maligne: <ul style="list-style-type: none"> - Klarzelliges Karzinom - Papilläres Karzinom - Chromophobes Karzinom - Sammelrohrkarzinom - Medulläres Karzinom der Niere - Karzinom assoziiert mit Neuroblastom - Muzinöses tubuläres und spindelzelliges Karzinom - Nierenkarzinom, nicht klassifizierbar - Benigne: <ul style="list-style-type: none"> - Papilläres Adenom - Onkozytom <p>Metanephrische Tumoren:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Metanephrisches Adenom - Metanephrisches Adenofibrom - Metanephrischer Stromatumor 	<p>Nephroblastische Tumoren:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nephrogene Reste - Nephroblastom <p>Mesenchymale Tumoren:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hauptsächlich im Kindesalter: <ul style="list-style-type: none"> - Klarzellsarkom - Kongenitales mesoblastisches Nephrom - Rhabdoidtumor - Hauptsächlich bei Erwachsenen: <ul style="list-style-type: none"> - Sarkome und benigne mesenchymale Tumoren - Angiomyolipom - Epitheloides Angiomyolipom - Juxtaglomerulärer Tumor - Renomedullärer interstitieller Tumor - Solitärer fibröser Tumor <p>Gemischte mesenchymale und epitheliale Tumoren:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Zystisches Nephrom - Gemischter Epithel- und Stromatumor - Synoviales Sarkom <p>Neuroendokrine-neuroektodermale Tumoren:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Karzinoid - Neuroendokrines Karzinom - Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET) - Neuroblastom - Phäochromozytom <p>Hämatopoetische und lymphoide Tumoren:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lymphome - Leukämien - Plasmozytom <p>Keimzelltumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Teratom - Choriokarzinom <p>Metastasen</p>
<p>Vancouver-Klassifikation: Vorschläge für neue Nierentumortypen einer künftigen WHO-Klassifikation und provisorische Nierentumorentitäten</p> <ul style="list-style-type: none"> - Neue epitheliale Nierentumortypen <ul style="list-style-type: none"> - Tubulozystisches Nierenzellkarzinom - „Acquired cystic disease“-assoziiertes Nierenzellkarzinom - Klarzelliges papilläres Nierenzellkarzinom - MiT-Familie der Translokationskarzinome (inkl. t(6;11)-Nierenzellkarzinom) - Hereditäres Leiomyomatosis-assoziiertes Nierenzellkarzinom - Provisorische Nierentumorentitäten <ul style="list-style-type: none"> - Schilddrüsenähnliches follikuläres Nierenzellkarzinom 	

Tabelle 2 Erbliche Tumorsyndrome der Niere und beteiligte Gene, angepasst nach Junker et al., 2013

Syndrom	Gen	Chromosom	Nierentumor
Von Hippel-Lindau	<i>VHL</i>	3p25	Multiple bilaterale klarzellige NZK, Zysten
Hereditäres papilläres NZK	<i>c-MET</i>	7q31	Multiple bilaterale papilläre NZK Typ1
Hereditäre Leiomyomatose	<i>FH</i>	1q42-43	Papilläre NZK Typ2

Birt-Hogg-Dubé	<i>BHD</i>	17p11.2	Multiple chromophobe NZK, kNZK, onkozytäre NZK, Hybridtumore
Tuberöse Skleose	<i>TSC1</i>	9q34	Multiple bilaterale Angiomyolipome, kNZK
	<i>TSC2</i>	16p13	

1.4 Staging und Grading

Neben der exakten histopathologischen Subtypenbeschreibung ist die Einteilung maligner Tumore anhand ihrer anatomischen Ausbreitung wichtig. Das „staging“ (engl. für Stadieneinteilung) beinhaltet nach der TNM-Klassifizierung die Beschreibung der maximalen Ausdehnung des Primärtumors (T), den Befall von regionären Lymphknoten (N) sowie das Auftreten von Fernmetastasen (M) (Moch et al., 2016; Wittekind, 2016). In den vergangenen Jahrzehnten wurde die TNM-Klassifizierung, basierend auf der prognostischen Wertigkeit der Einteilung, immer weiter verfeinert. Die aktuelle Version der von der Union für International Cancer Control (UICC) herausgegebenen achten Auflage erschien im Dezember 2016 (Wittekind, 2016). Für Nierenzellkarzinome änderte sich im Vergleich zur siebten Auflage, trotz Kritik am bestehenden System zur T-Kategorie-Klassifizierung, nur die Einteilung der Lymphknotenmetastasen (LK-Metastasen) (Delahunt et al., 2017). Der N2-Status, der das Auftreten von LK-Metastasen in mehreren regionären LK angibt, wurde aus der Klassifikation gestrichen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch noch die siebte Auflage der AJCC/ UICC TNM-Klassifizierung verwendet (Edge and Compton, 2010; Lee et al., 2011).

Tabelle 3 TNM-Klassifikation der Nierentumore nach AJCC/UICC 7. Auflage

T-Stadium des Primärtumors

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor kleiner als 7cm, auf die Niere begrenzt
T1a	Tumor 4cm oder kleiner in seiner größten Ausdehnung
T1b	Tumor größer als 4 cm, aber kleiner als 7cm in seiner größten Ausdehnung
T2	Tumor größer als 7 cm, auf die Niere begrenzt
T2a	Tumor größer als 7 cm, aber kleiner als 10 cm in seiner größten Ausdehnung
T2b	Tumor größer als 10 cm in seiner größten Ausdehnung
T3	Tumor infiltriert in größere Venen, in die Nebenniere oder ins perirenale Fettgewebe

T3a	Tumor mit makroskopischer Infiltration in die Nierenvene oder ihrer segmentalen Äste oder Infiltration des perirenal Fettgewebes, jedoch nicht über Gerota-Faszie hinaus
T3b	Tumor mit makroskopischer Infiltration in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Infiltration in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder der Wand der Vena cava
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus
N-Stadium: regionäre Lymphknoten	
Nx	Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem Lymphknoten
N2	Metastasen in mehreren Lymphknoten
M-Stadium: Fernmetastasen	
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Ein weiteres pathologisch-anatomisches Hilfsmittel ist die Verwendung eines Graduierungssystems für die Darstellung der Entdifferenzierung in malignen Tumoren. Für die Einteilung von Tumoren in Entdifferenzierungsgrade wurde in dieser Arbeit das Fuhrman-Grading verwendet (Fuhrman et al., 1982). Dieses System beruht auf der Einschätzung von drei unabhängigen mikroskopischen Merkmalen der Tumore. Diese sind Größe und Form der Zellkerne und das Aussehen, falls erkennbar, der Nukleoli.

Tabelle 4 Tumorgraduierungssystem nach Fuhrman et al., 1982

Fuhrman-Grading der Primärtumoren

Gx	Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
G1	Zellkerne sind klein, rund, einheitlich, ca. 10µm groß, unauffällige Nukleolen
G2	Erkennbar irreguläre Zellkerne, ca. 15µm groß, Nukleolen bei 400x Vergrößerung erkennbar
G3	Deutlich irreguläre Zellkerne, ca. 20µm groß, Nukleolen bei 100x Vergrößerung erkennbar
G4	Bizarre, multilobulierte Zellen zusätzlich zu Grad 3 Merkmalen, Mitosen

Neben dem Fuhrman-Graduierungssystem wurden in der Vergangenheit viele Systeme vorgeschlagen und haben, regional unterschiedlich, Anwendung gefunden. Nachdem die Kritik an der uneinheitlichen Verwendung und der Limitation des Fuhrman-Gradings vielfältig dargestellt wurde, einigte man sich auf ein vereinfachtes einheitliches Graduierungssystem (Delahunt et al., 2013; Moch, 2016a; Samaratunga et al., 2014). Dieses System verwendet die Eigenschaften der Nukleolen zur Einteilung und zieht für G4-Tumore eine rhabdoide oder sarkomatoide Differenzierung hinzu. Auf der Konsensuskonferenz der World Health Organisation (WHO) 2015 wurde zusammen mit der The International Society of Urological Pathology (ISUP) das WHO-ISUP-Grading als Standard empfohlen und ist seitdem auch in die S3-Leitlinien in Deutschland aufgenommen worden.

1.5 Symptomatik und Diagnostik

Der überwiegende Teil der diagnostizierten Nierentumore sind Zufallsbefunde (Escudier et al., 2016; Jayson and Sanders, 1998). Sie werden im Rahmen von Routineuntersuchungen per Sonographie gefunden. Die Früherkennung von Nierentumoren durch sonographische Verfahren lässt maligne Konturänderungen der Niere schon ab einer Größe von 2,5 cm sicher erkennen (Radermacher, 2003). Der Großteil der Patienten sind symptomlos und die Tumore in der Mehrzahl der Fälle in einem niedrigen Stadium. Die klassische Trias aus Flankenschmerzen, Hämaturie und tastbarer abdominaler Raumforderung tritt nur in fortgeschrittenen Stadien auf, die heute etwa 6-10% der Fälle ausmachen (Patard et al., 2003). Etwa ein Drittel der Patienten stellt sich mit Symptomen eines paraneoplastischen Syndroms vor (Fieber, Gewichtsverlust, Anämie, Unwohlsein, Nachtschweiß), welches unspezifisch auf ein Tumorleiden hinweist (Kim et al., 2003; Ljungberg et al., 2015). In fortgeschrittenen Stadien können durch Metastasen verursachte Symptome und Schmerzen auftreten. Für das präoperative staging wird die Computertomographie (CT) mit und ohne Kontrastmittel empfohlen. Bei Kontrastmittelunverträglichkeit oder Schwangerschaft kann auf die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) zurückgegriffen werden, die in Sensitivität und Spezifität dem CT gleichwertig ist (Ljungberg et al., 2015). Zudem ist ein Röntgen-Thorax oder ein CT-Thorax induziert um eventuell vorhandene Lungenmetastasen und vergrößerte Lymphknoten zu diagnostizieren. Ein Ganzkörper-CT, eine Skelett-Szintigraphie oder ein MRT des Kopfes werden nur bei Symptomen, die auf Metastasen hindeuten, durchgeführt (Koga et al., 2001; Marshall et al., 1990). Bei auf die Niere begrenzten Tumoren, dabei vor allem bei Tumoren kleiner 4cm, kann eine Biopsie durchgeführt werden. Sie ist allerdings nur dann angemessen, wenn das Ergebnis die Therapiewahl beeinflussen würde (Moch, 2016b). Da etwa 20% der T1a-Tumore benigne sind, kann durch dieses Verfahren die Anzahl der Operationen reduziert

werden. Patienten, bei denen Begleiterkrankungen dazu führen, dass sie nur schlecht oder unter hohem Risiko operiert werden könnten, kann zudem nach Abklärung der Histologie und des Gradings eine „*active surveillance*“ angeboten werden (Patel et al., 2016). Das Risiko, durch eine Stanzbiopsie einen aggressiven Tumor als zu harmlos einzuschätzen, liegt bei etwa 30%-40%, da standardmäßig nur die Histologie und das Grading begutachtet werden (Blumenfeld et al., 2010). Durch den Einsatz molekularer Marker sollte es in Zukunft möglich sein, dieses Defizit auszugleichen und anhand von Biopsien präzisere Prognosen zu stellen.

1.6 Prognose

Die Prognose der Nierenzellkarzinome hängt von einer Reihe an Parametern ab. Mehrere anatomische, histopathologische und klinische Faktoren wurden durch die retrospektive Analyse identifiziert, die mit dem Überleben der Patienten und/oder dem Progress der Erkrankung korrelieren. Dazu zählen die Tumorgröße, die Ausbreitung des Primärtumors, der Befall von Lymphknoten und die Präsenz von Fernmetastasen. Zusammengefasst sind diese Faktoren im TNM-Staging-System abgebildet (Kapitel 1.4). Die nukleare Graduierung nach Fuhrman oder der WHO-ISUP gibt histopathologisch Aufschluss über die mögliche Aggressivität der Tumore. Eine schlechte Prognose geht zudem mit einer sarkomatoiden Differenzierung oder mit nekrotischen Anteilen im Tumor einher (Kyriakopoulos et al., 2015; Molina et al., 2011; Park et al., 2014). Der Einfluss des histologischen Subtyps des NZK auf die Prognose ist noch nicht gänzlich geklärt. In einigen Studien wurde ein Unterschied im Überleben der Patienten mit klarzelligem NZK im Vergleich zu chromophoben und papillären Tumoren gezeigt (Ficarra et al., 2006; Leibovich et al., 2010). In multivariaten Analysen zeigte sich allerdings keine Verbesserung der Prognosemodelle durch miteinbeziehen der histologischen Subtypen (Capitanio et al., 2009; Patard et al., 2005). Die wichtigsten klinischen Parameter für die Prognose sind der *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) oder *Kanofsky Performance Status* (KPS) sowie Laktat-Dehydrogenase-Konzentration (LDH), Serum-Kalziumkonzentration und Auftreten einer Thrombocytose (Lam et al., 2008). Für das Überleben der Patienten ist die Metastasierung der entscheidendste Faktor. Nach aktuellen Zahlen der The Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER)-Kohorte liegt das 5-Jahres-Überleben mit lokal begrenztem Nierentumor bei fast 93%, bei Patienten mit Fernmetastasen hingegen nur noch bei etwa 12%. (Abb.1 (Siegel et al., 2016)).

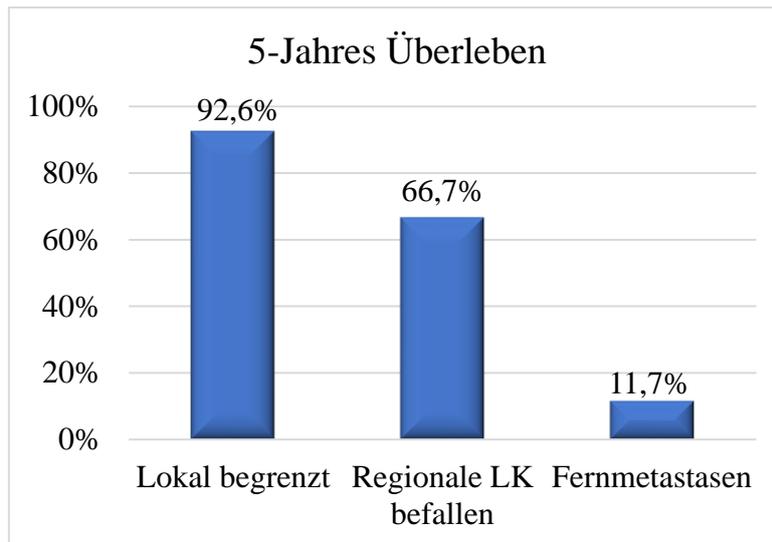


Abbildung 1 5-Jahres-Überleben mit lokal begrenztem und fortgeschrittenem NZK nach Daten der SEER Kohorte 2016

Durch die Früherkennung nimmt die Anzahl an synchron metastasierten Tumoren ab, allerdings sind 16%-30% der NZK zum Diagnosezeitpunkt bereits metastasiert. Weitere 20%-30% der initial lokal begrenzten Tumore metastasieren im Verlauf der Nachbeobachtung nach der Nierentumorentfernung (Dabestani et al., 2016; Howlader et al., 2017). Die Anzahl an Fernmetastasen spielt für das Überleben der Patienten dabei eine wichtigere Rolle als die Metastasenlokalisierung (Mekhail et al., 2005).

Die Kombination mehrerer prognostischer Faktoren in mathematischen Modellen führte zur Etablierung von Nomogrammen und Prognosealgorithmen, die der Stratifizierung von Patienten in Risikogruppen dienen. Verglichen mit einzelnen Variablen zur Prognose haben multivariable Modelle eine höhere Genauigkeit zur Vorhersage der Überlebenschancen oder zur Abschätzung eines Progresses. Diese Modelle eignen sich für die Rekrutierung von Patienten in Studienkohorten sowie für die Planung der Nachsorge (Crispen et al., 2008). Die wichtigsten postoperativen Prognosemodelle wurden entweder entworfen, um die Überlebensdauer der Patienten abzuschätzen oder ihre Prädisposition für die Entstehung metachroner Fernmetastasen. Die wichtigsten extern validierten Prognosescores sind neben dem *UCLA Integrated Staging System* (UISS) (Zisman et al., 2002), der *Stage, Size, Grade and Necrosis* (SSIGN) Score der Mayo Clinic (FRANK et al., 2002) und dessen dynamische Erweiterung (Leibovich et al., 2003), das *Kattan Nomogramm* (Kattan et al., 2001) sowie die ausschließlich auf klinischen Faktoren und Laborparametern beruhenden Modelle des Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) (Motzer et al., 2002) und des Tom Baker Cancer Centers (*International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium*, IMDC) (Heng et al., 2009). Die beiden letzteren Modelle

werden für die Unterteilung von Patienten in drei Risikogruppen verwendet, die der Wahl einer geeigneten Therapie im metastasierten Fall dienen. Der MSKCC-Score besteht aus 5 Parametern (Karnofsky PS weniger als 80%, Zeit von Diagnose bis Therapiebeginn <1 Jahr, Hämoglobin unter Normwert, Serum Kalziumkonzentration >10mg/dl und LDH Werte >1,5x des Normwertes), die falls zutreffend jeweils mit 1 bewertet werden und einen Risikoscore ergeben. Dabei hat ein Wert von 1-2 die Bedeutung mit einem intermediären Risiko und ab einem Wert von 3 mit einem hohen Risiko tumorbedingt zu versterben. Das IMDC-Modell wurde mit Daten von Patienten unter *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*-Therapie (Kapitel 1.7.2.1) entwickelt und beinhaltet vier der fünf MSKCC-Kriterien. Der LDH-Wert wurde durch die Hinzunahme zweier weiterer Faktoren (Thrombozyten und Neutrophile > Normwert) ersetzt.

1.6.1 Prognostische Biomarker

Durch die Integration molekularer Marker sollte es in Zukunft möglich werden, das Verhalten von Tumoren noch besser einschätzen zu können. Da selbst Tumore der Kategorie T1a metastatisches Potential haben (Guðmundsson et al., 2011; Klatter et al., 2008b), ist es wichtig, durch geeignete molekularbiologische Biomarker die Hochrisikopatienten auch in den durch klinisch-anatomische Parameter als Niedrigrisiko eingestuften Patientengruppen zu identifizieren (Abb. 2). Zusätzlich zu prognostischen Markern können dadurch neue therapeutische “targets“ (engl. für Angriffsziele) ausfindig gemacht werden. Trotz vieler Studien, die das Verhalten der Tumore auf DNA-, RNA- oder Proteinebene untersuchten, haben molekulare oder genetische Biomarker noch keinen Einzug in die klinische Praxis erhalten (Ljungberg et al., 2015; Moch, 2016b; Tan et al., 2013).

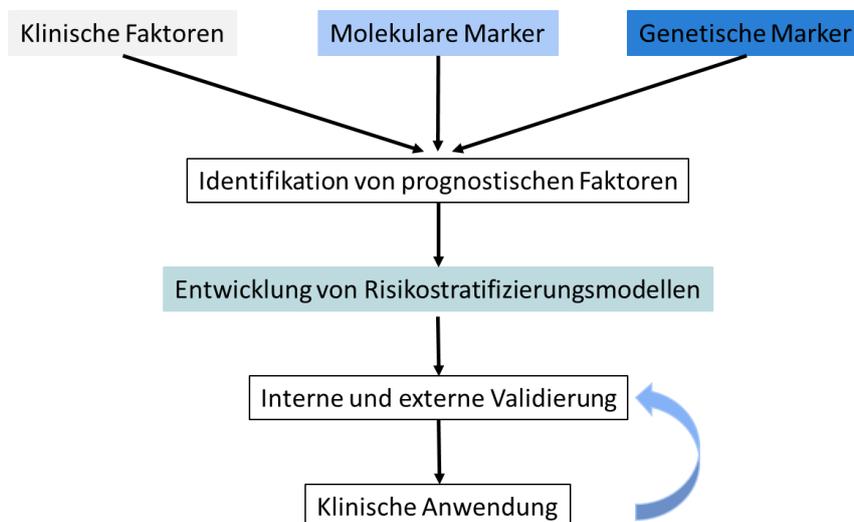


Abbildung 2 Entwicklungsschema für Risikostratifizierungsmodellen, verändert nach Shinohara and Abe, 2015

Zu den am besten untersuchten Biomarkern zählen sowohl die Expression der *Carbonischen Anhydrase 9 (CAIX)*, des *VEGF* und dessen Rezeptoren (*VEGFR*) als auch Mutationen der epigenetischen Regulatoren *BAP1* und *Polybromol (PBRM1)*, die Menge an exprimiertem *Programmed Death Ligand1 (PD-L1, B7-H1)* und einer Reihe an kleinen, nicht kodierenden RNA-Molekülen (MikroRNA, miRNA) (Bui et al., 2003; Erlmeier et al., 2017; Gu et al., 2015; Hakimi et al., 2013; Heinzelmann et al., 2014; Jacobsen et al., 2004; Joseph et al., 2014; Junker et al., 2013; Klatter et al., 2009a; Leibovich et al., 2007; Slaby et al., 2012). Die Validierung dieser Faktoren gestaltet sich jedoch schwierig und es gibt unterschiedliche Aussagen zur prognostischen Relevanz in multivariaten Analysen und in Kombination mit den gängigen Modellen. Die Verwendung von mehreren molekularen Markern in Kombination verspricht bessere Ergebnisse als immunhistochemische Charakterisierungen oder Expressionsanalysen einzelner Marker. Die Unterteilung von kNZK anhand ihrer Genexpression in zwei prognostische Gruppen (ccA und ccB) zeigte signifikante Unterschiede im progressionsfreien und im Gesamtüberleben der Patienten (Brannon et al., 2010). Um ein molekulargenetisches Prognosemodell zu etablieren, ist es nötig, dessen Überlegenheit gegenüber der gebräuchlichen Modelle zu beweisen oder diese in den neuen Score mit einfließen zu lassen. Erfolgreich umgesetzt wurde dieses Bestreben durch Rini et al. mit einem 16 Gene umfassenden Assay, welches in Kombination mit dem Leibovich-Score zu einer signifikant verbesserten Stratifizierung der Patientenkohorte führte (Rini et al., 2015). Der von Parker et al. entwickelte BioScore verbesserte ebenfalls die Genauigkeit des UISS- sowie des SSIGN-Modells (Parker et al., 2009). Das Clinical/Marker-Modell von Kim et al. führte ebenfalls zur Verbesserung des UISS-Modells bei Integration der Marker p53, CAIX, PTEN und Vimentin (Kim et al., 2005).

Zytogenetische Untersuchungen haben ergeben, dass eine Reihe an chromosomalen Zugewinnen und Verlusten mit der Prognose des NZK korrelieren. Kopienzahlveränderungen (CNV, von engl. *copy number variation*) sind mit komparativer genomischer Hybridisierung oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung schnell und verlässlich detektierbar. Am prominentesten ist dabei der Verlust der 9p-Region, welcher in zahlreichen Studien als unabhängiger Marker für das Überleben der Patienten sowie für die Metastasierung gezeigt wurde (Elfving et al., 1997; Klatter et al., 2009b; Moch et al., 1996; Sanjmyatav et al., 2011a). Eine Kombination von zytogenetischen Veränderungen mit Prognosemodellen zeigten ebenfalls eine hohe prognostische Wertigkeit eines 9p-Verlustes (Brunelli et al., 2007; El-Mokadem et al., 2014). Des Weiteren wurden Zugewinne der chromosomalen Regionen 1q, 7q, 12q und 20q, sowie Verluste der Regionen 4p und 14q als prognostisch signifikant beschrieben (Elfving et al., 1997; Klatter et al., 2009b; Sanjmyatav et al., 2011a). Sanjmyatav et al.

kombinierten CNV (+1q21.3, +7q36.3, -9p21.3 und +20q12) in kNZK zu einem eigenen unabhängigen prognostischen Score, welcher eine höhere Genauigkeit in der Vorhersage des Gesamtüberlebens, des tumorspezifischen Überlebens, sowie des progressionsfreien Überlebens als T-Kategorie, Fuhrman-Grading und Tumorgöße aufwies. Mit diesem genetischen Score ist zudem die Identifikation aggressiver kleiner Tumore möglich (Sanjmyatav et al., 2014).

1.7 Therapie

1.7.1 Therapie des lokalisierten NZK

Auf Grund der weitestgehenden Strahlen- und Chemotherapieresistenz der Nierenzellkarzinome ist die operative Entfernung der tumortragenden Niere oder partiell des Tumors aus der Niere die einzig kurative Therapie des lokal begrenzten Nierentumors. Diese kann offen oder laparoskopisch durchgeführt werden. Bei T1-Tumoren und gut operablen T2-Tumoren ist die organerhaltende Therapie auf jeden Fall der Nephrektomie vorzuziehen. Unbedingt indiziert ist eine Nierenteilresektion bei anatomischer oder funktionaler Einzelniere, Niereninsuffizienz sowie bei bilateralen Tumoren (Ljungberg et al., 2016). Ebenfalls ist eine laparoskopische oder roboterunterstützte Operationstechnik, wenn möglich, der offenen Operation vorzuziehen, da diese mit einem kürzeren stationären Aufenthalt und geringerem Blutverlust einhergehen als offene Nierenteilresektionen (Choi et al., 2015; Gratzke et al., 2009; MacLennan et al., 2012). Als Alternativen zur Operation stehen lokal ablativ Verfahren wie Kryoablation oder Radiofrequenzablation zur Verfügung. Da in einigen Arbeiten ein erhöhtes Rezidivrisiko bei Verwendung ablativer Techniken beschrieben wurde und bisher keine prospektiven Studien durchgeführt wurden, zählen diese Verfahren derzeit nicht zu den Standardtherapien (Ljungberg et al., 2016). Eine Lymphadenektomie sollte nur dann durchgeführt werden, wenn präoperativ im CT oder intraoperativ Vergrößerungen der Lymphknoten auffallen (Blom et al., 2009). Eine Adrenalektomie der ipsilateralen Nebenniere sollte ebenfalls nur dann erfolgen, wenn intraoperativ makroskopisch ein suspekter Befund vorliegt (Bekema et al., 2013). Als Option für Patienten mit hoher Komorbidität oder begrenzter Lebensdauer kann bei kleinen Tumoren (<4cm) eine aktive Überwachung (engl. active surveillance) in Betracht gezogen werden. Die Wachstumsraten kleiner renaler Raumforderungen sind auch bei malignen Tumoren meistens sehr gering. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass auch kleine Tumore metastatisches Potential besitzen können (Jewett et al., 2011; Mason et al., 2011; Smaldone et al., 2012; Umbreit and Thompson, 2011).

1.7.2 Therapie des fortgeschrittenen NZK

Bei fortgeschrittenen (metastasierten) NZK ist eine zytoreduktive, palliative Nephrektomie angezeigt. Falls möglich, sollte eine vollständige Metastasektomie durchgeführt werden, da sie die Prognose der Patienten verbessert (Alt et al., 2011; Dabestani et al., 2014; Flanigan et al., 2004). Nicht operable Metastasen in Hirn oder Knochen sollten mit einer stereotaktischen Radiotherapie behandelt werden.

1.7.2.1 Medikamentöse Therapie des metastasierten NZK

Nierentumore gehören zu den am stärksten vaskularisierten soliden Tumoren. Die ausgeprägte Neovaskularisation der NZK wird durch ein komplexes Netzwerk an Wachstumsfaktoren, intrazellulären Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren reguliert. Zentraler Bestandteil dieses Prozesses ist das VHL-Protein, das in den meisten klarzelligen NZK durch Deletion, Mutation oder Hypermethylierung inaktiviert ist (Baldewijns et al., 2010; Mittal et al., 2014). Unter normoxischen Bedingungen führt das intakte VHL-Protein zur Ubiquitinierung und damit zum Abbau des Transkriptionsfaktors *Hypoxia Inducible Factor1* (HIF1- α). Bei defizientem VHL akkumuliert HIF in den Zellen und führt zur Transkription von Zielgenen, welche die Angiogenese aktivieren. Zu diesen zählen unter anderem die Tyrosinkinase *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *platelet derived growth factor* (PDGF) gegen deren Rezeptoren heute zielgerichtete Therapeutika (engl. Targeted therapies) eingesetzt werden (Kaelin, 2008; Rini et al., 2009; Su et al., 2014). Sunitinib oder Pazopanib sind für die Erstlinientherapie die empfohlenen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) (Ljungberg et al., 2016). Bei einem Progress unter Therapie werden als weitere TKIs Cabozantinib oder Axitinib empfohlen (Choueiri et al., 2016a; Rini et al., 2011). Des Weiteren wurde der *mammalian target of rapamycin* (mTOR) Signalweg identifiziert, welcher unter anderem die Synthese von HIF1- α reguliert (Sabatini, 2006) und somit ein weiteres Ziel für die *targeted therapy* darstellt. Temsirolimus wird in der Erstlinie bei Hochrisikopatienten empfohlen (Hudes et al., 2007). Nivolumab oder Cabozantinib sind nach VEGF-Therapieversagen in der Zweit- oder Drittlinie indiziert (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2017; Ljungberg et al., 2016). Der Checkpoint Inhibitor Nivolumab sowie weitere Therapeutika dieser Art beruhen auf den in Tumoren dysregulierten Immunresistenzmechanismen. Hauptaufgabe des *programmed cell death 1* (PD1)-Rezeptors ist es, in gesundem Gewebe und bei Inflammation Autoimmunität zu verhindern. Die Liganden PD-L1 und PD-L2 werden von Tumorzellen häufig exprimiert, um durch negatives Feedback auf die zytotoxischen T-Zellen eine Immunantwort zu verhindern (Pardoll, 2012; Taube et al., 2014). Bisher nur für die Zweitlinientherapie zugelassen ist der PD1-Inhibitor Nivolumab. Abbildung 3 zeigt die verschiedenen Signalwege und Rezeptoren

sowie die heute zugelassenen Therapeutika in der Behandlung der metastasierten NZK. In Abbildung 4 ist das Schema der Sequenztherapie beim NZK gezeigt. Eine spezifische Sequenz von Therapeutika kann bisher allerdings nicht empfohlen werden.

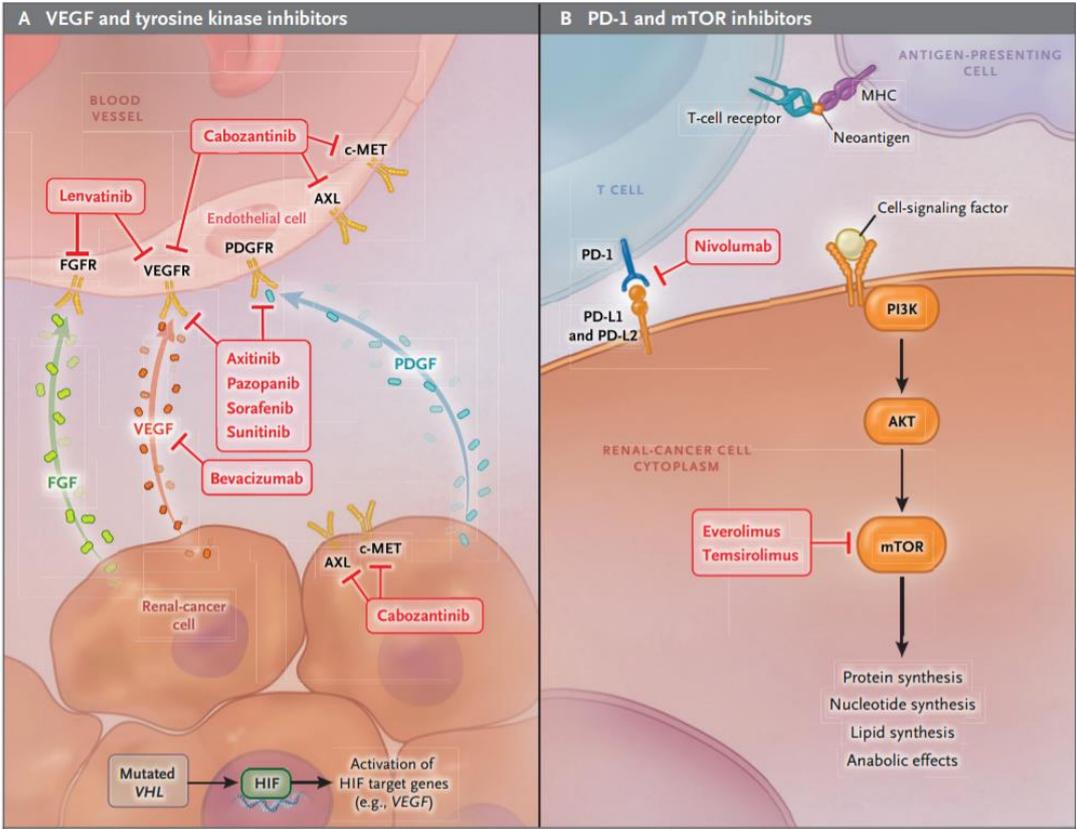


Abbildung 3 Therapierelevante Signalwege und zur Verfügung stehende Therapeutika für die Behandlung des metastasierten NZK, Choueiri and Motzer, 2017

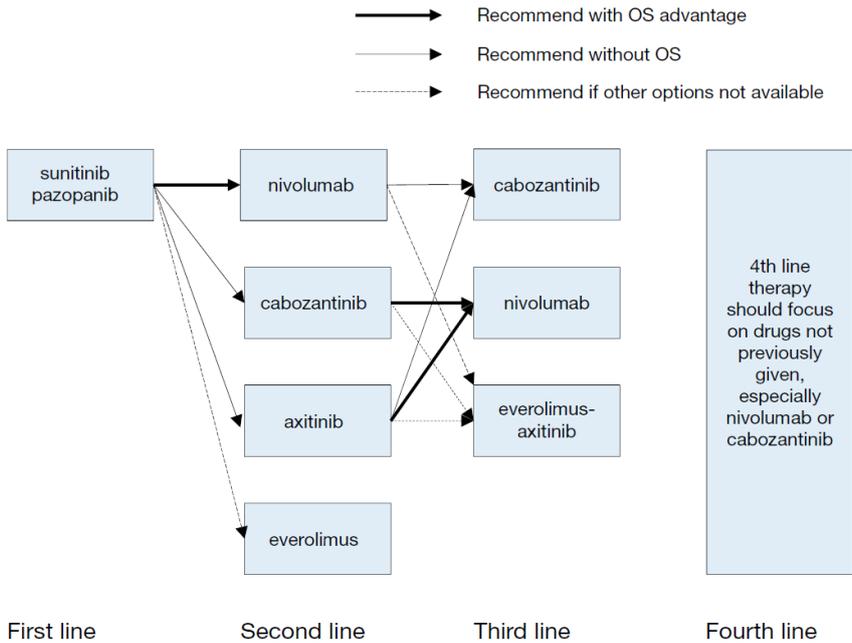


Abbildung 4 Aktuelles Therapieschema für metastasierte NZKs nach EAU Richtlinien 2017

Adjuvante oder neoadjuvante Gabe von TKIs konnte bis dato nicht zuverlässig einen Überlebensvorteil zeigen und wird deshalb nicht empfohlen (Bex et al., 2017; Haas et al., 2016; Ravaud et al., 2016). Ob Checkpoint-Inhibitoren im adjuvanten Setting Vorteile bringen, muss noch untersucht werden (Bindayi et al., 2017).

Welche Therapie primär eingesetzt werden sollte, hängt von der Risikogruppe des Patienten ab. Zur Einteilung können dafür verschiedene gängige Prognosemodelle verwendet werden (Kapitel 1.6). Am weitesten verbreitet ist die Verwendung des MSKCC oder des IMDC Prognosescores (Heng et al., 2009; Mekhail et al., 2005). Die beiden TKIs Sunitinib und Pazopanib sind vor allem bei Fällen mit niedrigem oder intermediärem Risikoprofil die erste Wahl, können aber auch für Hochrisikopatienten eine Option sein. Temsirolimus sollte bei Patienten mit einer schlechten Prognose bevorzugt werden.

1.8 Genetische Veränderungen im kNZK

Sowohl die hereditäre Form des klarzelligeren Nierenzellkarzinoms als auch die spontane Form sind genetisch durch den Verlust des kurzen Armes von Chromosom 3 geprägt. Dabei handelt es sich in etwa 90% der Fälle um einen Verlust des gesamten 3p-Armes, wobei der Verlust des *VHL*-Tumorsuppressorgens für kNZK charakterisierend ist (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). In Familien mit hereditärem VHL-Syndrom wurde der Verlust der Heterozygotie (LOH) zuerst beschrieben und der Genlokus auf 3p25 eingegrenzt (Latif et al., 1993). Durch Mutationen (50%) oder Promoter-Hypermethylierung (5-10%) des verbleibenden Allels kommt es zur vollständigen Inaktivierung der Funktion von VHL (Sato et al., 2013). Phylogenetische Untersuchungen an Nierentumoren bestätigen, dass der Verlust der VHL-Funktion ein frühes Ereignis der Tumorgenese ist, dessen Inaktivierung jedoch nicht ausreicht, um zur Formierung eines malignen Tumors zu führen. Weitere genetische Alterationen sind nötig, um die Entstehung eines Tumors zu ermöglichen. Da der Verlust von 3p in den meisten kNZK-Fällen auftritt, kann diese zytogenetische Veränderung für die Diagnose genutzt werden (Sanjmyatav et al., 2013). Das VHL-Protein (pVHL) reguliert unter normoxischen Bedingungen hauptsächlich den Abbau der hypoxieinduzierten Faktoren (HIF), ist daneben allerdings auch an der Stabilisierung der Mikrotubuli und der Ausbildung des Spindelapparates beteiligt (Hergovich et al., 2003; Maxwell et al., 1999; Shen and Kaelin, 2013; Thoma et al., 2009). Der VHL-Komplex wird zusammen mit Elongin B, Elongin C und Cul2 gebildet. Dieser Komplex bindet an die durch Prolyl-Hydroxylasen hydroxylierten Transkriptionsfaktoren HIF1 α und HIF2 α und markiert diese durch Ubiquitinierung zum Abbau im 26S-Proteasom (Jaakkola et al., 2001). HIF besteht aus einer α - (1 α , 2 α oder 3 α) und einer β -Untereinheit

(*HIF1 β* , oder *Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT)*), die unter Hypoxie oder bei *VHL*-Inaktivierung als Heterodimer in den Nukleus transloziert und die Transkription von Zielgenen reguliert. Je nach α -Untereinheit werden unterschiedliche Zielgene durch HIF reguliert, die der Anpassung an veränderte Sauerstofflevel und dem Überleben der Zelle dienen (Kaelin, 2008). Die wichtigsten HIF-regulierten Gene sind *VEGF*, *PDGF*, *COX2*, *MMPI*, *CXCR*, *TGF α* und *CAIX* sowie Gene, die zur metabolischen Reprogrammierung der Zelle führen und für den in Tumorzellen auftretenden Warburg-Effekt verantwortlich sind. Interessanterweise ist in etwa 40% der Fälle mit intaktem *VHL*-Gen eine trunkierende Mutation des für Elongin C kodierenden Gens *TCEB1* nachweisbar, wodurch der VHL-Komplex trotz vorhandenem wt*VHL* funktionslos wird (Sato et al., 2013). Diese Erkenntnis ist ein weiterer Beweis für die Wichtigkeit dieses Signalwegs in der Tumorgenese des kNZK. Generell sind *TCEB1*-Mutationen in kNZK-Fällen jedoch nicht häufig (0.5-5%). Tatsächlich befinden sich die nach *VHL* am häufigsten mutierten Gene alle auf Chromosom 3p21, unweit des *VHL*-Lokus und fallen zudem alle drei in die Klasse der epigenetischen Regulatoren. *PBRM1*, ein Bestandteil des SWI/SNF-Chromatin-remodellierenden Komplexes, ist in etwa 41% der kNZK Fälle mutiert (Pawłowski et al., 2013). Wichtige Aufgabe dieses Komplexes ist die Kontrolle der Zellproliferation durch Interaktion mit MYC und p16^{INK4A} (Wilson and Roberts, 2011). Ebenfalls mit der Kontrolle der Proliferation assoziiert ist die in 8-10% der kNZKs mutierte Histon-Deubiquitinase *BAP1* (Brugarolas, 2013). Tumore mit *BAP1*-Mutationen weisen eine von anderen Fällen gut abgrenzbare Genexpression auf, die mit einer schlechten Prognose einhergeht. Ebenfalls mit einem verkürzten Überleben assoziiert sind Mutationen im *SET domain containing 2 (SETD2)*-Gen (10-15% der kNZK Fälle) (Duns et al., 2010). Es ist anzunehmen, dass Mutationen dieser epigenetischen Regulatoren die Expression vieler wichtiger Gene verändert. Weitere signifikant veränderte Gene sind *PTEN* (4%), *MTOR* (6%) sowie *TP53*. Analysen des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs zeigten, dass Bestandteile dieses Signalweges in insgesamt 28% der kNZK-Fälle verändert waren (Su et al., 2015).

Hypermethylierung des Genoms und chromosomale Instabilität der Tumorzellen führen zu erhöhten Mutationsraten sowie zu diversen numerischen oder strukturellen Veränderungen der Chromosomen. Das NZK-Genom enthält im Durchschnitt 5.8 Amplifikationen und 6.8 Deletionen, wobei 55% dieser Aberrationen ganze Chromosomenarme betreffen (Bayani et al., 2007). Die häufigsten Amplifikationen sind +5q (58%-69%), +7q (30%-41%), +12p (24%), +20q (20%), +1q (13%), +8q (12%). Die häufigsten Deletionen betreffen -3p (81%-94%), -14q (27-45%), -8p (20-32%), -9p (15%-29%), -6q (23%), -4q (22%) und -1p (18%) (Beroukhim et al., 2009; Sato et al., 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013; Yoshimoto et

al., 2007). In mehreren Studien konnten einige dieser Aberrationen mit dem Überleben der Patienten korreliert werden. Der Verlust des Chromosoms 9p wurde mehrfach mit einem verkürzten Überleben und dem Auftreten von Fernmetastasen in Verbindung gebracht (Brunelli et al., 2007; El-Mokadem et al., 2014; Klatter et al., 2009b; La Rochelle et al., 2010). Durch array-basierte komparative genomische Hybridisierung wurden spezifische Aberrationen weitere Loci identifiziert, die mit dem Auftreten von Metastasen und verkürztem tumorspezifischem Überleben korrelieren. Zu diesen zählen Zugewinne der Regionen 1q21.3, 7q36.3, 12q13.12, 12q13.3q14.1, 20q11.21q13.2 sowie Verluste der Regionen 9p21.3p23.1 und 9q32q33.1 (Sanjmyatav et al., 2011a).

1.9 Metastasierung

Im Nierenzellkarzinom, wie bei den meisten Tumorerkrankungen, sind Metastasen die häufigste Todesursache, was den M-Status (des TNM-Systems) zu einem der wichtigsten Prognosefaktoren macht. Wie in Kapitel 1.6 bereits beschrieben, treten Metastasen beim kNZK in bis zu 60% der Fälle auf. Die häufigsten Metastasenlokalisationen sind dabei Lunge (~45%), Knochen (~30%), Lymphknoten (~20%), Leber (~20%), Nebenniere (8-10%) und Gehirn (5-8%) (Bianchi et al., 2012). Die molekularen Mechanismen zu verstehen, die zur Ausbildung lebensbedrohlicher Metastasen führen, ist deshalb zentraler Fokus der onkologischen Forschung. Einerseits um effektivere Therapien zu entwickeln, andererseits um Patienten prognostisch besser bewerten zu können. Der Prozess der Metastasierung verläuft nach heutigen Vorstellungen kaskadenartig in mehreren Schritten (Abb. 5). Einzelne Tumorzellen oder Zellcluster lösen sich zunächst aus dem Zellverband des Primärtumors und dringen in das umgebende Gewebe und schließlich in Lymph- oder Blutgefäße ein. Die in die Zirkulation gelangten Tumorzellen werden dann als CTCs (engl. Circulating Tumour Cells) bezeichnet und sind bereits in frühen Stadien der Tumorentwicklung nachweisbar (Alix-Panabières et al., 2008). Der Großteil dieser CTCs kann losgelöst aus dem Primärtumor jedoch nicht überleben und wird durch das Immunsystem beseitigt. Unklar ist, ob CTCs, die erfolgreich überleben und in ein entferntes Organ extravasieren, die nötigen molekulargenetischen Veränderungen bereits im Primärtumor entwickelt haben oder sie während der Zeit in der Zirkulation durch Anpassung an ihre neue Mikroumgebung erwerben (I. Khan et al., 2013). Auch nach erfolgreicher Invasion in fremdes Parenchym benötigen die Tumorzellen weitere aggressive Qualitäten, um erneut zu proliferieren, ihre Mikroumgebung zu konditionieren und ihre Nährstoffversorgung durch Neoangiogenese zu sichern. Jede Mutation, die diese einzelnen Schritte ermöglicht, bedeutet eine möglicherweise erhöhte Immunogenität der Tumorzellen und kann dazu führen, dass die CTC durch das Immunsystem erkannt und abgetötet wird. Es ist folglich nicht verwunderlich,

dass nur ein Bruchteil der extravasierten Tumorzellen zur Ausbildung von Makrometastasen führt. Es existieren zwei Modelle, die den zeitlichen Hergang dieses Prozesses einzuschränken versuchen.

In dem Modell der linearen Progression besteht die Annahme, dass eine Reifung der Tumorzellen im Primärtumor bis zur vollständigen Malignität stattfindet. Dies hat zur Folge, dass Charakteristika des Primärtumors in disseminierten Tumorzellen gefunden werden können und vice versa. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Aggressivität der CTCs mit der Größe des Tumors korrelieren, da mit zunehmender Größe eines Tumors dessen Mutationslast ebenfalls ansteigt (Klein, 2009). Für dieses Modell spricht die Tatsache, dass mit steigender Tumorgöße und T-Kategorie die Überlebenswahrscheinlichkeit sinkt, da CTCs, die den Tumor zu einem späteren Zeitpunkt verlassen, durch die voranschreitende Mutagenese ein höheres malignes Potential besitzen. Außerdem ermöglicht das lineare Progressionsmodell die Einschätzung des klinischen Verlaufs anhand von Tumorproben, was durch die erfolgreiche Vorhersage der tumorspezifischen und progressionsfreien Überlebensdauer anhand genetischer Profile des Primärtumors bewiesen werden konnte (Beuselinck et al., 2015a, 2017; Brannon et al., 2010; Sanjmyatav et al., 2014).

Das Modell der parallelen Progression hingegen geht davon aus, dass Zellen den Primärtumor verlassen, bevor sie vollständig einem malignen Phänotyp zugeordnet werden können und die CTCs in ihrer jeweiligen Mikroumgebung durch den Einfluss darwinischen Selektionsdrucks reifen (Gao et al., 2016). Durch die dadurch entstehende parallele Entwicklung von Primärtumor und Metastase kommt es zu großen Unterschieden in ihrer genetischen Beschaffenheit. Diese genetische Divergenz konnte von mehreren Arbeitsgruppen belegt werden (Bissig et al., 1999; Gulati et al., 2014) und ist vermutlich einer der Gründe, weshalb das Ansprechen auf molekular zielgerichtete Therapeutika nur unzureichend durch Analysen der Primärtumore eingeschätzt werden kann. Beide Modelle ziehen in Betracht, dass in Tumoren, durch den Einfluss der Tumormikroumgebung, geno- und phänotypisch unterschiedliche Subklone entstehen, die durch Akkumulation von Aberrationen entsprechend unterschiedlich maligne sein können. Es gibt Hinweise darauf, dass nur eine spezielle Subpopulation an Tumorzellen mit Stammzelleigenschaften Metastasen initiieren kann. Man spricht in diesem Zusammenhang von „tumour initiating cells“ (TIC) oder „cancer stem cells“ (CSC), die über die Fähigkeit der Selbsterneuerung und Tumorinitiierung in Transplantaten verfügen und mit Stammzellmarkern, wie CXCR4, CD105 oder NCAM detektierbar sind (I. Khan et al., 2013). Hierbei wird vermutet, dass diese Zellen in Dormanz solange verweilen bis

aktivierende Stimuli auf diese einwirken. Diese Stimuli gehen möglicherweise in Form von Wachstumsfaktoren, Chemokinen oder nicht-kodierender RNA vom Primärtumor aus und bereiten die (prä-)metastatische Nische vor oder kooperieren mit bereits vorhandenen Tumorzellen (I. Khan et al., 2013).

Dass nicht nur die Tumorzellen („seed“), sondern auch das Mikromilieu der Organe („soil“) im metastatischen Prozess entscheidend sind, stellte Stephan Paget bereits 1889 mit seiner, auf Untersuchungen des Mammakarzinoms basierenden, „seed and soil“- Hypothese auf (Paget, 1889). Heute ist bekannt, dass Endothelzellen der Kapillaren verschiedener Organe unterschiedliche Oberflächenrezeptoren exprimieren, die mitbeeinflussen, ob und welche CTCs einen Zugang zum Gewebe finden (Fidler, 2003). Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass Primärtumore bestimmte genetische Signaturen aufweisen, die einen Hinweis auf das Vorliegen von Metastasen in spezifischen Organen geben können (Heinzelmann et al., 2014; Minn et al., 2005). Darüber hinaus kann anhand von Genexpressionsmustern sowie zytogenetischen Alterationen auf die Aggressivität der Primärtumore geschlossen werden. Einige Gene sind dabei im Gegensatz zum überwiegenden Teil der publizierten Gene nicht tumorspezifisch, sondern geben krebsartübergreifend Aufschluss über den Prozess der Metastasierung. Dazu zählen Gene, die einen Vorteil für das Überleben, die Proliferation, die Migration und Invasion sowie die Kolonisierung der metastatischen Nische und der Immunevasion bieten (Chiang and Massagué, 2008), wie zum Beispiel Adhäsionsmoleküle (wie E-Cadherin) und Integrine sowie Bestandteile der extrazellulären Matrix.

Das Vorhandensein von metastasierungsassoziierten Genexpressionssignaturen in Primärtumoren beweist, dass nicht nur eine kleine Subpopulation von Zellen metastatisches Potential haben, sondern eine Vielzahl teilweise kompetenter Tumorzellen vorliegen, die die Expansion des Primärtumors fördern, aber für die Bildung von Metastasen notwendig, jedoch nicht ausreichend sind. In den letzten Jahren wurden für das kNZK einige Signaturen publiziert, die der Vorhersage des Überlebens und des klinischen Verlaufs dienen sollen. Erstaunlicherweise finden sich nur wenige Überlappungen in den einzelnen Genen der unterschiedlichen Studien und die Anzahl an relevanten Genen reicht von über 800 bis hin zu einem aus lediglich 16 Genen bestehenden Score (Beuselinck et al., 2015b; Brannon et al., 2010; Rini et al., 2015; Verbiest et al., 2018; Wuttig et al., 2009). Was diese Studien gemein haben, ist der Beweis, dass eine Prognose anhand von Gewebematerial des Primärtumors gestellt werden kann. Trotz der Einwände einiger, dass eine Abbildung der tatsächlichen molekularen Beschaffenheit der kNZK aufgrund ihrer intratumoralen Heterogenität nicht möglich sei (Bissig et al., 1999; Gerlinger et al., 2012, 2015), können die zahlreichen Befunde,

die eine Prognosestellung anhand des Primärtumorgewebes zeigen, nicht allein damit abgetan werden. Derzeit besteht noch kein endgültiger Konsens über den Einfluss und die Auswirkungen auf die Metastasierung selbst und die Erforschung metastasierungsspezifischer Veränderungen, die die intratumorale Heterogenität hat. Für die Metastasierungsforschung ergeben sich daraus zwei wichtige Schlussfolgerungen. Erstens muss zur Untersuchung von Tumoren eine Methode verwendet werden, die nicht nur die häufigsten Veränderungen in den Tumoren anzeigt, da veränderte Tumorzellen, die einen Anteil im Gewebe von weniger als 50% ausmachen, dennoch die aggressiven Subklone sein können. Zweitens muss unabhängig vom Primärtumor, die molekulare Beschaffenheit der Metastasen untersucht werden, welche als Therapieziel wichtig ist, da anhand von Gensignaturen oder chromosomalen Veränderungen der Primärtumore zwar das Metastasierungspotential erkannt werden kann, allerdings nicht unbedingt der Subklon nachgewiesen wird, welcher zur Ausbildung von Fernmetastasen führt (Turajlic and Swanton, 2016).

Speziell in klarzelligen NZKs muss der Einfluss von *VHL*-Alterationen auf die Metastasierung in Betracht gezogen werden. Die, durch *VHL*-Funktionsverlust resultierenden hohen HIF-Level führen zur Aktivierung von Angiogenese und Zellmigration durch Hochregulierung von VEGF und Aktivierung des Phosphoinositol-3-kinase(PI3K)-AKT-mTOR-Signalwegs (Schito and Semenza, 2016). Zudem wird die Transkription des Chemokinrezeptors CXCR4 aktiviert, was zu einem erhöhten Tumorwachstum, erhöhter Invasion und Zellmigration führt (Chatterjee et al., 2014; Staller et al., 2003). Des Weiteren induziert HIF die Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix durch Herunterregulation von E-Cadherin und erhöhte Transkription von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) wie *MMP2* und *MMP9* (Gilkes and Semenza, 2013).

2. Zielstellung

Das Nierenzellkarzinom stellt die elft häufigste bösartige Tumorerkrankung in Europa dar. Die Prognose der Patienten ist bei dieser Erkrankung maßgeblich von dem Vorliegen von Metastasen abhängig. So sinkt das 5-Jahres-Überleben im Fall einer Metastasierung von 90% auf nur noch 10-20%. Dabei treten Metastasen häufig erst Jahre nach Entfernen des Primärtumors auf. Die disseminierten Zellen des Nierenzellkarzinoms können in fremdem Gewebe verweilen, mitunter Mikrometastasen bilden, die in der Bildgebung nicht erkennbar sind und nach unbestimmter Zeit zu Makrometastasen heranwachsen, die zum Tod des Patienten führen. Die individuelle Risikoabschätzung bezüglich der Metastasenbildung ist Voraussetzung für eine frühzeitige Therapie und damit möglicherweise auch für eine Verbesserung des Überlebens. Die gängigen Prognosemodelle und Algorithmen beziehen sich ausschließlich auf klinische und pathologische Parameter wie Tumorgröße, Ausdehnung, Entdifferenzierungsgrad und das Vorliegen von Lymphknoten- oder Fernmetastasen. Da durch verbesserte Diagnoseverfahren vermehrt kleine, nicht metastasierte Tumore gefunden werden, kann die Verwendung von Prognoseparametern, die sich vor allem auf die Größe beziehen, dazu führen, dass die Aggressivität der Tumore unterschätzt wird. Ansätze, die Prognosemodelle mit Laborparametern oder Biomarkern zu erweitern oder Prognosescores zu entwickeln, die das Überleben der Patienten genauer abschätzen können, finden in der Praxis bisher keine Anwendung. Eine erfolgreiche Dissemination kann Tumorzellen nur dann gelingen, wenn sie Eigenschaften besitzen, die ihnen eine hohe Invasivität und gesteigerte Migration und Proliferation verleihen. Diese Eigenschaften sind mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits im Primärtumor vorhanden, weswegen die Prognose sich direkt aus Gewebeproben des entfernten Tumors ableiten lassen sollte. Genetische Veränderungen des Primärtumors haben demnach als Biomarker das Potential, den Verlauf einer Tumorerkrankung vorherzusagen. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten spezifische chromosomale Veränderungen mittels array-basierter komparativer genomischer Hybridisierung nachgewiesen werden, die mit der Metastasierung und einer schlechten Prognose des klarzelligen Nierenzellkarzinoms korrelierten (Sanjmyatav et al., 2011a). Diese Ergebnisse konnten erfolgreich mit einer zweiten Methode, der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), validiert und aus den einzelnen genetischen Veränderungen ein Prognosescore erstellt werden (Sanjmyatav et al., 2014).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Validierung des publizierten Prognosescores an zwei unabhängigen Patientenkohorten sowie die Identifizierung und Charakterisierung potentiell metastasierungsassoziiierter Gene, die durch die Zugewinne bzw. Verluste der vier

chromosomalen Regionen dereguliert sind. Hierzu sollen im einzelnen folgende Aufgabenstellungen behandelt werden:

1. FISH-Untersuchung der vier aberranten Regionen an 100 Primärtumoren einer unabhängigen, retrospektiven Kohorte
2. Überprüfung der prognostischen Wertigkeit des durch Sanjmyatav et al., 2014 erstellten Vorhersagemodells bezüglich Metastasierung, progressionsfreiem, tumorspezifischem und Gesamtüberleben
3. Etablierung der FISH auf paraffineingebetteten, formalinfixierten Gewebsschnitten und Definition der Cut-Off-Werte zur Risikoberechnung
4. FISH-Untersuchung von 100 Primärtumoren einer konsekutiven Kohorte unter Verwendung eines Tissue-Micro-Arrays (TMA)
5. Analyse der prognostischen Wertigkeit des Vorhersagemodells an Gewebsschnitten bezüglich Metastasierung, progressionsfreiem, tumorspezifischem und Gesamtüberleben
6. Identifikation relevanter Gene auf den untersuchten Chromosomenabschnitten mittels Analyse der „The Cancer Genome Project“-Genexpressions-Daten
7. Quantitative PCR zur Bestimmung der Expression von 12 ausgewählten Genen im Tumorgewebe
 - a. Korrelation der Genexpression mit den Ergebnissen der FISH-Untersuchung
 - b. Korrelation der Genexpression mit den klinisch-pathologischen Parametern der Patienten
8. Funktionelle Analyse von signifikant deregulierten Genen durch Transfektion von Nierenkarzinomzelllinien mit siRNA
 - a. Proliferations- und Migrationsanalyse
 - b. Analyse der Apoptose

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau
Heizblock, Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Axiovert S100	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Eclipse 600	Nikon
Mikroskop	Olympus
Nanodrop ND-1000	PeqLab, Erlangen, Germany
Real-Time Cell Analyzer, xCelligence	ACEA Bioscience, San Diego, USA
Schüttler	Bio.Rad Laboratories GmbH
Spektrophotometer Infinite® 200 PRO	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
StepOnePlus™ System	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Vakuumpzentrifuge	Chaist
Zellzählgerät Luna	Biozym Scientific GmbH
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Minispin	Eppendorf AG, Hamburg

3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acid-Phenol:Chloroform	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Aphidicolin	Calbiochem
Citrat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DAPI/DuraTect™	Zytovision
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Igepal	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Immersionsöl	Carl Zeiss, Jena

Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Natriumhydrogenphosphat	Merck KgaA, Darmstadt
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
RNase freies Wasser, DEPC-behandelt	Ambion
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer	Konzentration/Menge	Chemikalie
5x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	40g 1g 7,3g 1g 1l	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O KH ₂ PO ₄ Aqua dest.
20x SSC	175,32g (3mol) 88,23g (0,3mol) 1l	NaCl Natriumcitrat Aqua dest.
2x SSC/0,1% Igepal	10ml 90ml 0,1ml	20x SSC Aqua dest. Igepal
0,4x SSC/0,3% Igepal	100ml 500ml 1,8ml	2x SSC Aqua dest. Igepal
PT-100	9,6g (0,1M) 500ml 250µl (0,05%)	Citrat Aqua dest. Tween 20
1N HCl	8,3ml 91,7ml	37% HCL Aqua dest.

1%ige Formaldehydlösung	1,25ml	2M MgCl ₂
	1,35ml	37% Formaldehyd
	47,4ml	1x PBS
Pepsinlösung 100µg/µl	5g	Pepsin
	50ml	Aqua dest.
Fixativ (3:1)	15ml	Methanol
	5ml	Eisessig

3.1.4 Kits

Kit	Hersteller
Apo-ONE® homogeneous Caspase 3/7	Promega GmbH, Mannheim
Cell Death Detection ELISA plus	Roche Diagnostics, Mannheim
GoScript™ Reverse Transcription System	Promega GmbH, Mannheim
FISH tissue implementation	Zytovision
miRNeasy mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan Gene Expression Mastermix	Applied Biosystems

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96 Well PCR Platte, farblos, "Fast" Typ	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
CIM-Platten	OMNI Life Sciences
Deckfolie PCR Platten	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Deckgläschen Ø13mm, 30x40mm	Carl Roth GmbH & Co.KG
DNA/RNA LoBind Reaktionsgefäße (0.2, 0.5, 1.5, 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Kanülen	Sarstedt AG & Co.
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One
Objektträger	Carl Roth GmbH & Co.KG
Pasteurpipetten Glas	Carl Roth GmbH & Co.KG
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	BD Bioscience, Heidelberg
Skalpell	Sarstedt AG & Co.
Zellkultur Multiwellplatten	Corning
Zellkulturflaschen	Corning

Zellzählchip	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Zentrifugenröhrchen	BD Bioscience, Heidelberg, D

3.1.6 Primer, Enzyme und Reagenzien

Enzyme	Hersteller
Pepsin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
RNaseZap	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Qiazol Lysepuffer	Qiagen, Hilden
Medium	
DMEM, 4,5g Glukose	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
OptiMEM	Gibco Invitrogen
RPMI, 2g Glukose	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
TaqMan Primer und Sonden	
<i>ARNT</i>	Applied Biosystems
<i>BCL2L1</i>	Applied Biosystems
<i>B7H1(PD-L1 oder CD274)</i>	Applied Biosystems
<i>CDKN2A</i>	Applied Biosystems
<i>DNAJB6</i>	Applied Biosystems
<i>ECM1</i>	Applied Biosystems
<i>EZH2</i>	Applied Biosystems
<i>E2F1</i>	Applied Biosystems
<i>MTAP</i>	Applied Biosystems
<i>SHH</i>	Applied Biosystems
<i>S100A10</i>	Applied Biosystems
<i>TPX2</i>	Applied Biosystems
siRNA	
FlexiTube siRNA 5nmol Hs_BCL2L1_2 Target sequence: 5'-CTGCTTGGGATAAAGATGCAA-3'	Qiagen, Hilden
FlexiTube siRNA 5nmol Hs_EZH2_7 Target sequence: 5'-AACCATGTTTACAACACTATCAA-3'	Qiagen, Hilden
siSEPT9	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

Transfektionsreagenz	
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

3.2 Patientenkollektiv für FISH und Genexpressionsanalysen

In der vorliegenden Arbeit wurden retrospektiv 100 Tumorgewebeproben von Patienten mit primärem, klarzelligem Nierenzellkarzinom untersucht, die im Rahmen einer radikalen oder partiellen Nephrektomie in der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Homburg im Zeitraum von 2004 bis 2015 entnommen wurden. Die aus den Operationen erhaltenen Tumorproben wurden gemäß standard operating procedure (SOP) eingefroren und in Ultratiefkühlschränken bei -80°C oder flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt. Zum Operationszeitpunkt waren die Patienten zwischen 38 und 90 Jahre alt, das Durchschnittsalter betrug 64,5 Jahre (Median 66 Jahre). Die Tumore wurden durch das Institut für Pathologie der Universitätsklinik Homburg histologisch begutachtet und nach TNM- und UICC-Richtlinien bewertet. Vor Beginn der Untersuchungen wurden die Tumorproben erneut histopathologisch bewertet und nur diejenigen mit einem genügend großen Tumoranteil ($>90\%$) für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Genexpressionsanalysen ausgewählt. Die selektierte Kohorte bestand zu 50% aus nicht metastasierten (M0) und zu 50% aus metastasierten (M1) Tumoren. Tumorproben wurden dann als nicht metastasiert eingestuft, wenn nach einem Follow-Up von mindestens 36 Monaten keine Anzeichen einer Fernmetastasierung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms festgestellt wurden. In der Gruppe der metastasierten Tumore wurden synchron und metachron metastasierte Fälle zusammengefasst. Patienten mit einer weiteren Tumorerkrankung wurden ausgeschlossen, da anhand einer Bildgebung nicht unterschieden werden kann, von welcher Tumorentität eine etwaige Metastasierung stammt. Für alle verwendeten Proben lag eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten vor.

3.3 Patientenkollektiv für Tissue Micro Array (TMA) FISH Analyse

100 Tumorgewebeproben wurden in einer zweiten, konsekutiven Kohorte untersucht. Die Gewebe lagen in Form eines Tissue-Micro-Arrays (TMA), erstellt vom Institut für Pathologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, vor. Die Operationen zur Entfernung der Tumore durch Nierenteilresektionen oder radikalen Nephrektomien erfolgte zwischen 2007 und 2012 am Universitätsklinikum Erlangen. Die Gewebeproben wurden nach Entnahme in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE). Der Anteil der Patienten mit metastasierten

Tumoren betrug 32%, der Anteil der Patienten ohne Anzeichen einer Metastasierung betrug 68%.

Details zu den Patientenkollektiven sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 5 Aufgliederung der einzelnen Parameter der untersuchten Patientenkohorten

Kohorte	1 (isolierte Zellkerne)	2 (TMA)
Fallzahl	100	100
Alter		
Mittel/Median	64,55/66	63,08/66
Spannweite	38-90	32-90
Geschlecht		
Männlich/Weiblich	69/31	58/39
T-Kategorie		
T1a	30	43
T1b	23	22
T2	5	10
T3a	23	14
T3b	14	11
T3c	1	-
T4	4	-
Grade		
G1	2	20
G2	79	60
G3	13	20
G4	4	-
Fernmetastasen		
Ja/Nein	50/50	32/68
Metachron	22	17
Lymphknotenmetastasen		
Ja/Nein oder Nx	15/85	0/100
Tode		
Tumorbedingt/Gesamt	26/34	17/23
Nachsorge		
Mittel/Median	60,65/62	39,11/39,5
Spannweite	1-127	0-101

3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

3.4.1 Grundlagen der FISH

Die In-situ-Hybridisierung ermöglicht den Nachweis spezifischer DNA- oder RNA-Sequenzen in einzelnen Zellen oder im morphologischen Kontext von Geweben. Die Technik basiert auf

der Bindung (Hybridisierung) von DNA- oder RNA-Fragmenten, sogenannter Sonden, an komplementäre Bereiche der zellulären Nukleinsäuren. Die daraus entstandenen Hybride sind stabil und mit verschiedenen Methoden, je nach eingesetzter Sonde, nachweisbar. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung dient der Markierung von DNA- Sequenzen mittels synthetischer Sonden, welche direkt mit Fluorochromen verknüpft sind, wodurch numerische und strukturelle Veränderungen auf Einzelzellbasis untersucht werden können.

3.4.2 Zellkernisolation aus Gewebe

Von den gefrorenen Tumorgewebeproben wurden mit einem Kryostat (-28°C, CM3050S, Leica) je nach Größe und Tumoranteil 10-30 50µm dicke Schnitte angefertigt und in eine Petrischale überführt. Mit einem Skalpell wurden die Gewebeschnitte anschließend mechanisch zerkleinert. Bei Raumtemperatur (RT) wurden 300µl Lysepuffer (PT-100 Puffer) in 50µl-Schritten zugegeben und das zerkleinerte Gewebe durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren weiter separiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und bei RT für 90 Minuten inkubiert. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 6000U/min (\cong ~3800g) wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Das im Reaktionsgefäß verbliebene Kernsediment wurde zweimal mit 500µl frisch angesetztem, -20°C kaltem Fixativ (Methanol: Eisessig; 3:1) gewaschen und erneut zentrifugiert. Die optimale Zelldichte wurde durch lichtmikroskopische Kontrolle ermittelt. Die isolierten Zellen wurden im Anschluss bei -20°C in Fixativ bis zur Verwendung gelagert.

3.4.3 Vorbehandlung und Hybridisierung isolierter Zellen

Ein Tropfen der fixierten Zellsuspension wurde auf einen Objektträger getropft und getrocknet. Ein Bereich mit ausreichender Zelldichte wurde mit Hilfe eines Diamantschreibers auf der Rückseite des Objektträgers markiert. Die Objektträger wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 85%, 100%) dehydriert und dann an der Luft getrocknet. In einer Küvette wurden 99ml 1N HCL auf 37°C erwärmt und 500µl Pepsinlösung (100µg/ml) hinzugegeben. Die trockenen Objektträger wurden zur Permeabilisierung der Zellkerne 10 min in der sauren Pepsinlösung inkubiert. Nach einem 3-minütigen Waschschrift in 1x PBS wurden die Objektträger in 1% Formaldehyd bei RT für 10 Minuten fixiert und dann erneut in 1x PBS gewaschen. Nach erneutem Dehydrieren in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 100%) und vollständigem Trocknen der Objektträger wurde die Hybridisierung durchgeführt. Je nach verwendeten Sonden wurden die fertigen Sondenmischungen direkt eingesetzt oder zunächst manuell gemischt und bei 90°C im Thermoschüttler denaturiert. Eine genaue Auflistung der Sonden ist in Abschnitt 3.3.4 zu finden. Auf den markierten Bereich wurden

vorsichtig 3µl Sonde pipettiert, mit einem runden Deckglas (Ø 13mm) luftblasenfrei abgedeckt und mit Montagekleber (Fixogum®) versiegelt und getrocknet. Bei Verwendung von Sonden der Firma Zytovision wurden die Objektträger 10 Minuten bei 75°C auf einer Heizplatte denaturiert. Die Sonden der Firma Leica bedurften einer Denaturierung bei 80°C für 5 Minuten. Durch die Hitzeeinwirkung werden Wasserstoffbrückenbindungen in der DNA aufgebrochen, wodurch es zur Vereinzelung der DNA-Stränge in den Zellkernen sowie der Hybridisierungssonden kommt. Die Objektträger wurden im Anschluss für 48 h in einer feuchten Kammer bei 37°C hybridisiert.

3.4.4 Verwendete Sonden

Untersucht wurden vier spezifische, chromosomale Regionen sowie zwei Zentromerbereiche unterschiedlicher Chromosomen. Die Zentromersonden für Chromosom 2 und 7 dienten als Ploidiekontrollen. Eine genaue Auflistung der Sonden sowie der Zusammensetzung der Sondenmischungen sind in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet.

Tabelle 6 Verwendete FISH-Sonden und Fluoreszenzfilter

Sondenfarbstoff	Hersteller	Absorption	Emission	Filter (Nikon)
ZyGreen	Zytovision	503nm	528nm	FITC
ZyOrange	Zytovision	547nm	572nm	G-2A
PlatinumBright415	Leica	429nm	470nm	DEAC
PlatinumBright495	Leica	495nm	517nm	FITC
PlatinumBright550	Leica	550nm	580nm	G-2A

Tabelle 7 Mischverhältnis der einzelnen FISH-Sonden

Chromosomen-region	Sonde 1	µl	Sonde 2	µl	Sonde 3	µl	Zusatz	µl
1q21.3	1q21/8p21	1	SE2	1	-		FB Puffer	1
7q36.3	ST7qter	0,75	SE2	0,75	SE7	1	FB Puffer	0,5
20q11.3q12	20q(20q12)/ 20q11	1,25	SE2	1	-		FB Puffer	0,75
1q21.3	ZytoLight SPEC MCL1/1p12	3	-		-		-	
9p21.3p24.1	ZytoLight SPEC CDKN2A/ CEN 9	3	-		-		-	

3.4.5 Stringentes Waschen und Gegenfärbung

Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger gewaschen. Im Fall der Verwendung von Zytovision-Sonden fand die Stringenzwaschung bei 37°C statt. Die Objektträger wurden zweimal 5 Minuten in 1x Wash Buffer A (Zytovision, Hannover) gewaschen. Bei Verwendung der Hybridisierungssonden von Leica Biosystems wurden die Objektträger zunächst in 72°C warmem 0,4xSSC/Igepal, anschließend in 2xSSC/Igepal bei RT für jeweils 2 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurden die Objektträger unabhängig vom vorhergegangenen Schritt in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 86%, 100%, je 2 min) dehydriert und im dunklen trocknen gelassen. Die hybridisierten Zellkerne wurden mit 15µl DAPI/DuraTect (Zytovision) gegengefärbt und mit einem 24mm x 30mm Deckglas eingedeckt. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

3.4.6 Vorbehandlung und Hybridisierung von FFPE-Gewebe

Für die FISH an FFPE-Gewebe wurde der „FISH tissue implementation kit“ der Firma Zytovision verwendet. Zur Entparaffinierung wurden die Objektträger zunächst auf einer Heizplatte bei 70°C für 10 Minuten erhitzt und im Anschluss 2x 10 Minuten in Xylol inkubiert. Nach Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe (2x 100%, 90%, 70%, 2x Aqua dest., je 5 Minuten) wurden die Objektträger in vorgewärmtem Heat Pretreatment Buffer (PT1) bei 98°C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 2x in Aqua dest. für 2 Minuten gewaschen, trocknen gelassen und mit einer Pepsinlösung (ES1) für 15 Minuten bei 37°C verdaut. Im Anschluss an die Proteolyse wurden die Objektträger in Wash Buffer SSC (WB1) überführt und bei RT für 5 Minuten gewaschen. Die Dehydrierung erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe (je 1min Aqua dest, 70%, 85%, 100% Ethanol) und Trocknen an der Luft. Die Sonden wurden im selben Mischverhältnis wie in 3.3.4 angegeben verwendet. Je nach zu hybridisierender Fläche wurden 3µl- 10µl Sondenlösung zur Hybridisierung verwendet. Die Objektträger wurden mit einem 22mm x 22mm Deckglas abgedeckt und mit Fixogum versiegelt. Nach Denaturierung für 10 Minuten bei 75°C wurden die FFPE-Gewebe für 48h bei 37° hybridisiert.

3.4.7 Stringentes Waschen und Gegenfärbung

Nach 48h wurde der Montagekleber vorsichtig entfernt und die Objektträger für 1-3 Minuten in 37°C warmem Wash Buffer A (WBA) inkubiert, bis die Deckgläser abgeschwemmt waren. Die Objektträger wurden anschließend 2x 5 Minuten in warmem WBA gewaschen, in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 85%, 100% Ethanol) dehydriert und an der Luft, im dunklen getrocknet. Je nach Größe des hybridisierten Bereichs wurden 10µl-20µl DAPI/DuraTect™

(MT7) zur Gegenfärbung der Zellkerne und zum Eindecken verwendet. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3.4.8 Auswertung der Fluoreszenzsignale

Zur Auswertung der Fluoreszenzsignale wurde das Nikon Eclipse E600 Mikroskop mit entsprechenden Filtern verwendet. Um eine unvoreingenommene Auswertung zu garantieren, wurden die Proben ohne Kenntnis des Metastasierungsstatus und der Überlebenszeit der Patienten analysiert. Spezifische Zugewinne oder Verluste wurden in 100 Zellkernen jeder Probe erfasst. Dazu wurden die hybridisierten Bereiche schematisch abgefahren und die Fluoreszenzsignale von Zellkernen mit auffälliger Morphologie ausgewertet. Die Anzahl der Signale der spezifischen Chromosomenregionen wurden mit den Signalen der Ploidiekontrollen verglichen. Ein spezifischer Verlust der Region 9p21.3 lag vor, wenn nur ein (heterozygoter Verlust) oder gar kein (homozygoter Verlust) Fluoreszenzsignal der Sonde zu sehen war. Spezifische Zugewinne der Chromosomen 1q21.3, 7q36.3 sowie 20q12 lagen vor, wenn mehr als zwei Signale in einem diploiden Kern, beziehungsweise mehr als vier Signale in einem tetraploiden Kern vorlagen. Aus den dichotomisierten Ergebnissen der einzelnen Aberrationen wurde ein Gesamtwert an auftretenden Veränderungen berechnet. Dieser, im Folgenden als TNSA (Total Number of Specific Aberrations) bezeichnete Wert, errechnet sich aus der Addition der einzelnen veränderten Chromosomenabschnitte.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RNA-Isolation aus Gewebe und Zelllinien

Zur Bestimmung der Expression ausgewählter Gene wurde aus untersuchten Geweben sowie aus Zellkulturen RNA extrahiert. Zur Isolierung der RNA wurde das miRNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Von kryokonserviertem Gewebe wurden je nach Größe des Gewebstückes 20-30 5µm dicke Schnitte angefertigt und nach Zugabe von 700µl Qiazol-Lysepuffer gevortext. Der Lysepuffer besteht aus Phenol sowie Guanidin-Thiocyanat und führt neben der Lyse des Gewebes auch zur Inhibierung von RNasen. Sobald das Gewebe vollständig homogenisiert war, wurden 140µl Chloroform zugegeben und für 15s gevortext. Nach 2-minütiger Inkubation wurde das Homogenat bei 4°C und 12.000g für 15 min zentrifugiert. Durch diesen Prozess trennt sich die Lösung in 3 Phasen, die unterschiedliche Bestandteile der Zelllysate beinhalten. Die obere, wässrige Phase, in der die RNA gelöst ist, wurde vorsichtig mit einer Pipette entnommen, in ein adäquates Reaktionsgefäß überführt und mit 1,5x dem entnommenen Volumen an 100% Ethanol vermischt, um das Binden der RNA an die Silicamembran zu ermöglichen. Das Gemisch wurde auf Säulen pipettiert und zentrifugiert,

wodurch die RNA an die Membran der Säule bindet. Waschschritte mit den im Kit enthaltenen Puffern RWT und RPE entfernen Phenol- sowie DNA- und Proteinreste vor der Elution der RNA. Das Lösen der RNA folgte mit 30µl RNase-freiem Wasser.

3.5.2 Photometrische Mengen- und Reinheitsbestimmung der RNA

Die Reinheit und Menge der isolierten RNA wurde mit dem Nanodrop 1000 (Peqlab) bestimmt. Dieses Verfahren ermöglicht die gleichzeitige Messung von RNA-Quantität und -Qualität bei sehr geringem Materialverlust. Nachdem die Proben gevortext wurden, wurden 1,5µl zum Messen aufgetragen. Die Absorption der RNA wurde bei 230nm, 260nm und 280nm gemessen. Aus der Messung bei 260nm wird die RNA-Konzentration in ng/µl errechnet. Aus den Quotienten der Messungen ergeben sich Verhältnisse, welche eventuelle Verunreinigungen des extrahierten RNA mit weiteren zellulären Bestandteilen oder Lösemitteln anzeigen. Die Absorptionsverhältnisse von 260/280 sollten bei RNA bei ~2.0 liegen. Das Verhältnis 260/230 sollte zwischen 1.8 und 2.2 liegen. Nur Proben, die diese Bedingungen erfüllten und eine Ausbeute von mindestens 60ng/µl erbrachten, wurden für die Expressionsanalysen verwendet.

3.5.3 cDNA-Synthese

Vor der quantitativen Analyse der mRNA-Expression aus Zellen und Gewebe muss die gewonnene RNA zunächst in „complementary DNA“ (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wurde das GoScript™ Reverse Transcription Kit (Promega) verwendet. Zur Initiation des Transkriptionsprozesses wurden 500ng RNA mit 0,5µg Random-Primer versetzt, auf 10µl mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt, bei 70°C für 5min denaturiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Anders als Oligo(dT) Primer binden Random-Primer nicht an den Poly-A-Schwanz der mRNA, sondern lagern sich an mehreren Stellen der RNA an und bilden so multiple Bindepunkte für die Reverse Transkriptase, wodurch sich die Ausbeute an cDNA erhöhen lässt. Zum RNA-Primer-Gemisch wurden 10µl des Reaktionsgemischs gegeben.

Tabelle 8 Reaktionsgemisch zur cDNA Synthese

Komponente	Volumen	Endkonzentration in 20µl
nukleasefreies Wasser	1,5µl	---
GoSkript™ 5x Reaktion Buffer	4µl	1x
MgCl ₂	2µl	2,5mM
PCR-Nukleotidmix	1µl	0,5mM je dNTP
RNasin® RNase Inhibitor	0,5µl	20u
GoScript™ Reverse Transkriptase	1µl	---

Die Anlagerung der Primer erfolgte in einem Thermoblock bei 25°C für 5 min. Für die Elongation wurde der Block auf 42°C erwärmt und die Proben für 60min inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase geschah bei 70°C für 15min. Die Proben wurden im Anschluss auf 4°C abgekühlt und entweder direkt im Anschluss für die qRT-PCR verwendet oder bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.5.4 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction, PCR) ist ein Verfahren zur synthetischen Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzen. Die DNA wird zunächst denaturiert, um die Wasserstoffbrückenbindungen, welche den Doppelstrang zusammenhalten, aufzuspalten. An die daraus resultierenden DNA-Einzelstränge können sich dann in einem zweiten Schritt die Primer anlagern. Durch die Wahl geeigneter Primer, welche zur Ziel-DNA komplementär sind, lassen sich beliebig viele Kopien von Genen herstellen. Die Primer sind dabei nur etwa 20bp lang und dienen der DNA-Polymerase als Bindemoleküle für den Start der Reaktion. Die Elongation verläuft dann durch schrittweise Anlagerung von komplementären Nukleotiden an den DNA-Strang. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge an Ziel-DNA im PCR-Gemisch. Als RealTime-PCR bezeichnet man den quantitativen Nachweis der Menge an PCR-Produkt durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes in das Reaktionsgemisch. In dieser Arbeit wurden Hydrolysesonden, sogenannte TaqMan-Sonden, verwendet. Diese Oligonukleotide sind ebenfalls komplementär zur Ziel-DNA konstruiert und lagern sich in einem Bereich der DNA zwischen den Primern an. An die Sonden gekoppelt sind zwei Moleküle. Eines davon ist ein Fluoreszenzfarbstoff, das andere, ein sogenannter Quencher, unterbindet durch den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) die Emission von Photonen durch den Fluoreszenzfarbstoff. Durch die Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase werden bei der Kopie des Zielgens Quencher und Farbstoff soweit räumlich voneinander getrennt, dass das Fluoreszenzsignal detektierbar wird. Ein Anstieg in der messbaren Fluoreszenz ist somit gleichsetzbar mit der Amplifikation der Ziel-DNA. Die Zunahme der Fluoreszenz wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen und generiert einen Graphen, anhand dessen Unterschiede in der Expression von Genen festgestellt werden können. Alle zu untersuchenden Gene wurden zunächst mit der ΔC_T - Methode auf das Referenzgen *PPIA* normalisiert (Wierzbicki et al., 2014). Die Effizienz der Primer wurde durch Verdünnungsreihen bestimmt und in der Auswertung der Genexpression mit verrechnet. Die Auswertung erfolgte über das REST 2009 Programm (Qiagen). Die qRT-PCR wurde mit dem StepOne Plus (Life Technologies) in einem 10µl Reaktionsvolumen in 96-well-Platten durchgeführt. Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 9 Reaktionsgemisch für die qRT-PCR

Komponente	Volumen
nukleasefreies Wasser	2,5µl
TaqMan Primer-Sonden-Gemisch	0,5µl
Gene Expression Mastermix	5µl

Zu 8µl Reaktionsgemisch wurden 2µl cDNA oder 2µl H₂O (Negativkontrolle) gegeben. Jede Probe wurde als Triplet aufgetragen.

3.5.5 Auswertung:

Die durch das StepOne Plus Programm errechneten C_T-Werte der Zielgene und des Referenzgens wurden verwendet, um den ΔC_T-Wert zu berechnen. Dieser ergibt sich aus Abzug des C_T-Wertes des Referenzgens von dem des Zielgens. Die relative Expression errechnet sich im Anschluss durch die Formel:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta C_T}$$

Wenn zwei Gruppen (bspw. transfizierte vs. nicht transfizierte Zellen) verglichen werden sollen, wird der ΔΔC_T-Wert durch Abzug des ΔC_T-Wertes der Kontrolle (nicht-transfiziert) vom ΔC_T-Wert der behandelten Zellen gebildet. Diese Verfahren sind nur bei 100%iger Primer-Effizienz exakt. Aus diesem Grund wurde die Effizienz der Primer über eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000) bestimmt. Die exakte relative Expression wurde unter Angabe der Effizienz mit dem REST© 2009 Programm (Kapitel 3.8.5) bestimmt.

3.6 Zellkulturmethoden

3.6.1 Verwendete Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5%CO₂. Die Zelllinien wurden dabei in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25cm² oder 75cm² mit Membranfilterdeckel bis zu einer Konfluenz von 80-90% wachsen gelassen.

Zur Verwendung kamen 2 Nierenzellkarzinomzelllinien:

Tabelle 10 Herkunft, Kultivierungsmedium und VHL-Status der verwendeten Nierenzellkarzinomzelllinien

Name der Zelllinie	Herkunft	VHL Status	Verwendetes Medium
786-O	58 Jahre, männlich, Kaukasier, kNZK Primärtumor	mutVHL	RPMI + DMEM (1:1)
Caki-2	69 Jahre, männlich, Kaukasier, kNZK Primärtumor	wtVHL	RPMI 1600

3.6.2 Subkultivierung

Um eine Inhibierung der Proliferation zu verhindern, müssen die Zellen vor Erreichen der Konfluenz (d.h. Zellrasen bedeckt den gesamten Flaschenboden) mit einer geeigneten Verdünnung subkultiviert werden. Die Zellen werden dafür zunächst mit PBS gewaschen und anschließend unter Verwendung von Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) abgelöst. Trypsin ist eine Endopeptidase, genauer eine Serinprotease. Sie spaltet bei Zugabe zu Zellkulturen zunächst extrazelluläre Peptidbindungen, welche den Zell-Zell-Kontakt und den Zell-Oberflächen-Kontakt bilden. Ethylendiamintetraessigsäure (kurz EDTA) wird als Chelator hinzugefügt, um Magnesium- und Kalziumionen zu binden, die ihrerseits für die Bildung von Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Kontakten wichtig sind und die Aktivität von Trypsin hemmen. Je nach Größe der Zellkulturflasche wurde die Menge an Trypsin angepasst (0.5ml-1.5ml). Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 2-5 min. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle wurden 2-5ml frisches serumhaltiges Kulturmedium zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Zellen wurden für 3min bei 218xg zentrifugiert, das alte Medium abgesaugt und das Zellpellet in 3ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in einem Verhältnis von maximal 1:20 auf die Zellkulturflaschen verteilt.

3.6.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Konservierung können Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Nach Ablösen der Zellen, wie in 3.5.2 beschrieben, wird das Zellpellet statt in Kulturmedium in Einfriermedium resuspendiert. Dieses setzt sich zusammen aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10% Fetales Kälberserum (FKS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). Das DMSO dient als Gefrierschutzmittel, wirkt allerdings bei RT permeabilisierend und führt zur Apoptose der Zellen. Die Zelllinien werden in 2ml Kryoröhrchen pipettiert und für 24h bei -80°C langsam abgekühlt bevor sie in den Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryogefäß nach Entnahme aus dem Stickstoff direkt auf Eis gesetzt und der Inhalt schrittweise durch Zugabe von warmem Kulturmedium aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zentrifugieren und Aussäen der Zellen erfolgte dann wie in 3.5.2 beschrieben. Nach 24h wurde das Medium gewechselt.

3.7 Funktionelle Analysen

3.7.1 Transiente Inhibierung von *EZH2*, *BCL-xL* und *SEPT9*

Für die gezielte Inhibierung der Genexpression von *Enhancer of Zest Homolog 2 (EZH2)*, *B-Cell-Lymphoma-2-like-1 (BCL-xL)* und *Septin 9 (SEPT9)* wurden sowohl Caki- als auch 786-O Zelllinien mit „silencer RNA“ (siRNA) transfiziert. Diese kurzen (20-25bp) RNA-Stränge binden im „RNA-induced-silencing complex“ (RISC) komplementär an die zu hemmende mRNA und bewirken so eine posttranskriptionelle Inhibierung der Genexpression. Die siRNAs gegen *EZH2* und *BCL-xL* wurden von Qiagen bezogen. Diese siRNAs sind vorgefertigt und auf Funktionalität getestet. *SEPT9* siRNA von Sigma Aldrich wurde als Kontrolle für Apoptoseanalysen verwendet, da in vorausgegangenen Studien gezeigt wurde, dass keine Apoptose durch Transfektion mit *SEPT9* induziert wird (Stubendorff, 2014). Die Transfektion erfolgte für beide Zelllinien und alle Gene mit dem Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) und Verwendung von Opti-MEM Medium. Die Zellen wurden 24h vor der Transfektion in 6-well-Platten ausgesät. Aufgrund der unterschiedlichen Proliferationsrate der beiden Zelllinien mussten unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt werden. Von den Caki-2 Zellen wurden 8×10^4 Zellen, von 786-O 3×10^4 Zellen pro Well eingesetzt. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde das FKS-haltige Medium vier Stunden vor Transfektion mit serumfreiem Medium ausgetauscht, um die Zellen hungern zu lassen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz ohne siRNA behandelt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und für jedes Well ein eigener Ansatz vorbereitet. Die siRNA wurde mit einer Endkonzentration von 50nM eingesetzt. Die Transfektionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 11 Mischverhältnisse und verwendete Konzentration der siRNA für die Transfektion mit siRNA

(1) siRNA-Ansatz	(2) Transfektionsmedium-Ansatz
10µl 10µM siRNA	3µl Lipofectamine 2000
+ 190µl Opti-MEM	+ 197µl Opti-MEM

Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Ansätze (1) und (2) durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und erneut 20 Minuten bei RT inkubiert. Dadurch entstehen Komplexe aus

kationischen Liposomen und siRNA, deren Oberfläche positiv geladen ist. Die Zellen in den 6-Well-Platten wurden mit PBS gewaschen und 1600µl Komplettmedium in jedes Well pipettiert. Anschließend wurde unter ständigem leichten Kreisen je 400µl Transfektionsansatz hinzugegeben. Die Zellen wurden für 18h bei 37°C inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und die funktionellen Analysen nach weiteren 24h durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wurde durch qRT-PCR ermittelt.

3.7.2 Proliferation

Die Messung der Proliferation erfolgte unter Verwendung des xCelligence Real-Time-Cell-Analyzer (RTCA) von ACEA Biosciences Inc. Spezielle mit Goldelektroden versehene 16-Well-E-Plates messen die Impedanzänderung am Boden der Zellkammern, die durch Proliferation, veränderte Vitalität oder Formänderung der adhären Zellen entsteht. In Abhängigkeit zur Zeit entsteht daraus eine Funktion die den „Cell Index“ (CI) und damit das Wachstumsverhalten der Zellen angibt. Die Eingesetzte Zellzahl wurde zunächst durch Wachstumskurven bestimmt. Dazu wurden unterschiedliche Zellzahlen in den einzelnen Kulturkammern eingesetzt und die Proliferation über 48h gemessen. Da die Verdopplungszeit von Caki-2 und 786-O unterschiedlich ist, mussten für die Proliferations- und Migrationsversuche entsprechend unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt werden. Von den Caki-2 Zellen wurden für die weiteren Versuche 5×10^3 , von den 786-O-Zellen wurden 2×10^3 Zellen je Well der E-Plates ausgesät. Die entsprechende Zellzahl wurde in 200µl Komplettmedium resuspendiert. Transfizierte Zellen und Mock-Kontrollen wurden jeweils als Duplikate geführt. Als Kontrolle wurde zellfreies Komplettmedium als Duplikat mitgeführt (blank). Während der ersten 4h befinden sich die Zellen noch in der Adhäsionsphase, anschließend erfolgte die Messung der Proliferation für 48h.

3.7.3 Migration

Die Migration wurde unter Verwendung von 16-Well Cell Invasion & Migration (CIM)- Plates mit dem xCelligence RTCA gemessen. Die Zellkammern sind durch eine Membran geteilt, die 8µm große Mikroporen besitzt. Durch diese Poren können die Zellen in die untere Kammer migrieren. An der Unterseite der Membran befinden sich die Elektroden zur Impedanzmessung, welche nur dann eine Signaländerung registrieren, wenn Zellen von der oberen in die untere Kammer wandern. In die untere Kammer wurde serumhaltiges Komplettmedium pipettiert. Die Zellen wurden in 100µl serumfreies Medium aufgenommen und in die obere Kammer gegeben. Der dadurch verursachte FKS-Gradient dient als Lockstoff für die Zellen. Die Messung der Migration erfolgte für 10h.

Sowohl für die Migration als auch für die Proliferation wurde der Zellindex (CI) zu festgelegten Zeitpunkten verglichen. Zunächst wurde dafür der „blank“-Wert von den Messwerten der einzelnen Wells abgezogen und im Anschluss Mittelwerte aus den Mock-Ansätzen gebildet. Die Werte der transfizierten Zellen wurden relativ zu den Mock-Werten berechnet und prozentual angegeben.

3.7.4 Apoptose

Zur Untersuchung der Apoptose wurden zwei Verfahren eingesetzt. Zum einen das Cell Death Detection ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) kit von Roche, welches durch ein photometrisches Enzymassay die Fragmentierung der DNA bei Apoptose qualitativ und quantitativ misst. Zum anderen das Apo-ONE® homogeneous Caspase 3/7 Assay von Promega welches fluorimetrisch die Caspaseaktivität über mehrere Stunden messen kann. Für die ELISA-Apoptose-Messung wurden 20µl Überstände der Zellkulturen oder Zelllysate verwendet, zudem eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Es erfolgte zuerst eine Inkubation der Proben mit einem Anti-Histon-Biotin und einem Anti-DNA-Peroxidaseantikörper für 2h. Anschließend wurde die Antikörperlösung entfernt und die Proben gewaschen. Unter Zugabe der Substratlösung ABTS™ (2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate) bilden sich Immunkomplexe, die mit dem Infinite® 200 PRO-reader (Tecan Trading AG) bei 405nm ausgelesen wurden. Das Caspase Assay verwendet ein Rhodamin gekoppeltes Substrat, welches erst nach Spaltung durch Caspase-3/7 intensiv fluoresziert. In einer opaken 96-Well-Platte wurden je well 5×10^4 transfizierte und nicht-transfizierte (Mock) Zellen, DMSO behandelte Zellen sowie zellfreies Komplettmedium gemessen. Da DMSO (2,5%, 30min Inkubation) zur Induktion von Apoptose führt, wurden DMSO-behandelte Zellen als Positivkontrolle verwendet. 100µl Apo-ONE® Caspase-3/7-Reagenz wurden zu jeder Probe hinzugegeben, vermischt und die Fluoreszenz anschließend im Infinite® 200 PRO-reader bei 530nm gemessen. Die Messung wurde anschließend für 18h jede Stunde durchgeführt. Bei beiden Verfahren wurden die Proben jeweils als Triplikate geführt. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Mittelwerte (t-Test) der transfizierten Zellen in Relation zu den Mock-Zellen.

3.8 TCGA-Datenbank

Die Datenbank des „The Cancer Genome Project“ (TCGA) umfasst genomische Informationen von über 600 Fällen von klarzelligen Nierenzellkarzinomen (Stand 2017). Für die Auswertung wurden die Level 3 Daten der Illumina Hiseq Genexpression und die Copy Number Variation (CNV) Daten verwendet. Als Hilfsmittel stand dazu der UCSC Cancer Browser

(<https://genome-cancer.ucsc.edu>) zur Verfügung. Subgruppen und Statistiken zur Unterscheidung von Genexpression und Kopienzahlveränderungen in pM1 und pM0 Primärtumoren wurden gebildet und mit einem t-Test berechnet.

3.9 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm IBM SPSS Statistics in den Versionen 19 und 24 (IBM-Corp., Armonk, USA) verwendet. Für die Analyse der Genexpression wurde die Software REST 2009 (Qiagen, Hilden, Germany) zusätzlich hinzugezogen.

3.9.1 ROC Analyse

Zur Ermittlung geeigneter Grenzwerte bei quantitativen Variablen wurden ROC-Analysen (engl. receiver operating characteristic) durchgeführt. Bei diesem Test werden Sensitivität und Spezifität gegeneinander aufgetragen, um den Grenzwert zu ermitteln, bei dem beide Werte maximal sind. In einer graphischen Darstellung, der sogenannten ROC-Kurve, wird die Sensitivität gegen 1 minus die Spezifität aufgetragen und die Werte sind bei verändertem Schwellenwert direkt ablesbar. Zur Wahl des bestmöglichen Grenzwertes wird die Fläche unter der durch Auftragung von 1 minus Spezifität und Sensitivität entstandenen Kurve (AUC = engl. area under curve) berechnet. Der Grenzwert mit der größten Fläche und dem höchsten Youden-Index ($Y = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$) wird als Schwellenwert ausgewählt (Metz, 1978).

3.9.2 Kaplan-Meier-Schätzer

Der Kaplan-Meier-Schätzer wurde verwendet, um die Überlebenswahrscheinlichkeit sowie das progressionsfreie Überleben der Patienten abzuschätzen. Dieses nicht parametrische Verfahren kam zum Einsatz, um das Gesamtüberleben (OS, von engl. Overall Survival), das tumorspezifische Überleben (CSS, von engl. Cancer Specific Survival) und das progressionsfreie Überleben (PFS, von engl. Progression Free Survival) darzustellen. Als Progress definiert wurde die Diagnose von Fernmetastasen. Als progressionsfrei wurden die Patienten definiert, die zum Ende des Beobachtungszeitraumes keine Fernmetastasierung aufwiesen. Die graphische Darstellung der Überlebensfunktionen ist eine Treppenfunktion, anhand derer sich die mediane Überlebenszeit ablesen lässt (Kaplan and Meier, 1958). Der Log-Rank-Test dient dem Vergleich zweier oder mehrerer Kaplan-Meier-Kurven über den gesamten Beobachtungszeitraum. Signifikante Unterschiede in der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientengruppen werden so errechnet.

3.9.3 Binomiale logistische Regression

Die logistische Regression dient der Überprüfung des Zusammenhangs zwischen einer abhängigen Variable und einer oder mehreren unabhängigen Variablen. In dieser Arbeit wurde

die multivariable, binomiale logistische Regression verwendet, um den Einfluss dichotomer Variablen auf die Metastasierung zu untersuchen. Das abhängige Ereignis „Metastasierung“ ist „1“ im Fall des Auftretens von Fernmetastasen und „0“ im Fall des Nichtauftretens im Beobachtungszeitraum. Quantitative Variablen, wie der genetische Score, behalten als Ausprägung ihren Wert. Nicht quantifizierbare Variablen, also kategoriale Variablen, wie beispielsweise die T-Kategorie, müssen mit sogenannten Dummy-Variablen dichotomisiert werden. Dabei muss eine Dummy-Variable als Referenz definiert werden, bei der alle Variablen den Wert 0 annehmen und mit denen die Hazard-Rate (HR) der anderen Dummy-Variablen verglichen werden. Im Fall der T-Kategorie wird T1a als Referenz-Kategorie verwendet. Die Einflussvariablen, welche sich als signifikant erweisen, werden in einem Regressionsmodell zusammengefasst, um eine Risikobewertung zu ermöglichen.

Die aus dieser Regressionsanalyse gewonnenen Regressionskoeffizienten werden verwendet, um einen Algorithmus zu erstellen, der zur Risikostratifizierung verwendet werden kann.

Die logistische Regressionsfunktion lautet:

$$P = \frac{e^{\vartheta}}{1+e^{\vartheta}} ,$$

mit P = Wahrscheinlichkeit und ϑ = Logit der unabhängigen Variablen.

Der Logit beschreibt den linearen Zusammenhang der unabhängigen Variablen wie folgt:

$$\vartheta = \beta_0 + \beta_1 \cdot a_1 + \beta_2 \cdot a_2 + \dots + \beta_x \cdot a_x ,$$

mit β_x = Regressionskoeffizient der unabhängigen Variablen und a_x = Wert der unabhängigen Variable.

Der Wert für P liegt als Ergebnis zwischen 0 und 1 und ermöglicht die Angabe des individuellen Risikos eines Patienten in Prozent, sowie die Einteilung einzelner Patienten und Patientenkohorten in Hoch- und Niedrigrisikogruppen. Als Trennwert für die Einteilung wird eine Wahrscheinlichkeit von 0,5 verwendet (Schneider et al., 2015).

3.9.4 Cox-Regressionanalyse

Zur multivariablen Analyse von Einflussfaktoren auf das Überleben wurde das proportionale Hazard-Modell von Cox verwendet (Cox, 1972). Voraussetzung für die Verwendung dieses Modells ist die Annahme, dass die Risikofaktoren über den Beobachtungszeitraum unveränderlich sind. Die Variablen müssen also so gewählt werden, dass sie über den Untersuchungszeitraum einen gleichbleibenden Einfluss auswirken. Dies bedeutet, dass die

Hazard-Rate, welche das Ereignisrisiko beschreibt, in beiden zu untersuchenden Gruppen proportional und zeitunabhängig ist. Daraus ergibt sich, dass auch das Verhältnis der Hazard-Raten zweier Gruppen, die Hazard-Ratio, proportional ist. Die Hazard-Ratio dient dem Vergleich von Überlebenszeiten zwischen zwei Gruppen und gibt an, um wie viel höher die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Ereignis in einer Gruppe auftritt als in der anderen. Ob das Cox-Regressionsmodell verwendet werden darf, lässt sich aus den Kaplan-Meier-Kurven ablesen. Die Proportionalität der Hazard-Raten kann immer dann angenommen werden, wenn eine Gruppe gleichmäßig einer anderen überlegen ist. Wenn sich Kurven kreuzen, ist dies nicht der Fall (Klein and Moeschberger, 2003).

3.9.5 REST© 2009

Der statistische Test zur Unterscheidung der Genexpression zweier Gruppen wurde eigens für das REST©-Programm entwickelt. Bei diesem Test handelt es sich, um einen paarweise fixierten randomisierten Reallokationstest. Dieser Test ist auf Grund seiner höheren Flexibilität besser zur Signifikanzberechnung geeignet als Mann-Whitney-U oder t-Tests (Pfaffl et al., 2002). Die errechnete Effizienz kann für jedes Gen angegeben werden und fließt in die Berechnung ein.

3.9.6 P-Wert

Für diese Arbeit wurde ein Signifikanzwert (p-Wert) von 5% als Grenzwert für die Ablehnung der Nullhypothese verwendet. Ergebnisse der statistischen Tests dieser Arbeit wurden als signifikant bezeichnet, wenn der p-Wert kleiner oder gleich 0,05 war.

3.9.7 Exakter Fisher-Test

Der exakte Fisher-Test ist ein Signifikanztest, der insbesondere bei kleinem Stichprobenumfang zuverlässigere Resultate liefert als der Vierfelder-Chi-Quadrat-Test. Dieser Test wurde daher für die Berechnung der Unabhängigkeit dichotomer Variablen verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Patientenkollektive

Beide Kohorten (Tabelle 5) bestanden aus jeweils 100 Fällen. Kohorte 1 (Homburg) ist ein retrospektives Kollektiv, bestehend aus frisch gefrorenen Tumorgewebepräparaten mit einem Anteil metastasierter Fälle von 50%. Von diesen sind 44% in einem Zeitraum von 3 Monaten bis zu 6 Jahren metachron metastasiert. Der Lymphknotenstatus ist in 15% der Fälle positiv. Der Großteil (79%) ist als G2-Tumor klassifiziert. Mehr als die Hälfte (58%) der Tumore sind nach UICC organbegrenzt (T1a-T2), wobei 24% dieser Tumore metastasiert sind, der Großteil davon metachron. Die konsekutive Kohorte 2 (Erlangen), bestehend aus formalinfixierten TMA-Gewebeschnitten mit Stanzzyllindern (Durchmesser 1 mm), enthält 32% metastasierte Tumore, von welchen etwa die Hälfte in einem Zeitraum von 3 bis 75 Monaten metachron metastasierten. Die Graduierung G2 ist mit 60% am häufigsten vertreten. Zwei Drittel der Kohorte bestehen aus organbegrenzten Tumoren, von welchen 22,6% metastasiert sind. Die Kategorien T3c und T4 sowie ein abgeklärter Lymphknotenstatus fehlen in Kohorte 2.

4.2 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung

Die präparierten und hybridisierten Primärtumore von 200 Patienten wurden unter einem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet und statistisch erfasst. Pro Tumorprobe wurden 100 Zellkerne auf spezifische Zugewinne der chromosomalen Regionen 1q21.3, 7q36.3 und 20q12 und Verluste des Lokus 9p21.3 analysiert. Als Aberration wurden Abweichungen von der Anzahl an Signalen der Ploidiekontrolle (Chromosom 2) gewertet. Bei regionenspezifischen Zugewinnen bedeutet dies, dass in einem Zellkern mindestens 1 Signal mehr als Signale von Chromosom 2 zu finden sind. Verluste wurden analog gewertet, wenn weniger Signale als in der Kontrollsonde zu finden waren. Bei Verwendung der Schnittpräparate diente zusätzlich die Zentromersonde von Chromosom 9 als Referenz für Verluste. Verluste der Region 9p21.3 wurden nur gewertet, wenn zwei Signale der Zentromerregion detektierbar waren, oder wenn in mehr als 70% der Zellkerne ein homozygoter Verlust von Chromosom 9 feststellbar war.

4.2.1 Berechnung und Verwendung des TNSA-Wertes

Um individuellen Bewertungsfehler bei der Auswertung der FISH-Ergebnisse zu umgehen, wurde in Kohorte 1 mit den durch Sanjmyatav et al. 2014 publizierten Schwellenwerten für die Bestimmung des Metastasierungsrisikos gearbeitet, da die Präparation der isolierten Zellkerne auf dieselbe Weise erfolgte. Für Kohorte 2 mussten neue Cut-Offs ermittelt werden, da es sich bei dem Probenmaterial um Gewebeschnitte handelte (Kapitel 5.5) Die Berechnung dieser Werte wurde mittels ROC-Kurven für jede Sonde einzeln durchgeführt. Dabei wurde der

Schwellenwert errechnet, der die bestmögliche Vorhersage für das Auftreten von Metastasen anzeigt. In der ROC-Kurvenanalyse weist der TNSA eine deutlich größere Fläche unter der Kurve (AUC= engl. area under curve) sowie einen geringeren p-Wert auf als die einzelnen aberranten Chromosomen für sich oder die möglichen Kombinationen aus den vier Regionen.

4.3 Zusammenhang zwischen Metastasierung und TNSA in Kohorte 1

Die in Vorarbeiten errechneten Cut-Off-Werte sind auch in der Homburger Kohorte hoch signifikant (Tabelle 12). Zugewinne der Region 1q21.3 sind am stärksten mit dem Auftreten von Metastasen assoziiert (p-Wert= $1,1 \cdot 10^{-7}$, HR= 13,037), gefolgt von Zugewinnen der Region 20q11.21q12 (p-Wert= $4,06 \cdot 10^{-6}$, HR= 8,566). Der TNSA-Wert besitzt eine deutlich größere AUC als die einzelnen veränderten Loci und ist höchst signifikant mit dem Auftreten von Metastasen assoziiert (p-Wert= $1 \cdot 10^{-8}$). Das Metastasierungsrisiko steigt mit jeder hinzukommenden Aberration um das 4,07-fache (CI= 2,44-6,77).

Tabelle 12 Cut-Off-Werte für die Abschätzung des Metastasierungsrisikos (ROC-Kurven Analyse) und Korrelation der CNVs und des TNSA mit dem Metastasierungsstatus der Kohorte 1 (Fisher's exact test, univariate Regression)

CNVs	Cut off %	AUC (ROC-Kurve)	p-Wert (Fisher's Exact test)	Odds ratio (95% CI)
1q21.3	15	0,760	$1,1 \cdot 10^{-7}$	13,037 (4,654-36,52)
7q36.3	30	0,710	$4,6 \cdot 10^{-5}$	6,147 (2,565-14,729)
9p21.3	15	0,680	$1,5 \cdot 10^{-4}$	6,769 (2,447-18,726)
20q11.21q12	25	0,730	$4,06 \cdot 10^{-6}$	8,566 (3,321-22,093)
TNSA	-	0,867	$1 \cdot 10^{-8}$	4,067 (2,44-6,77)

4.3.1 Häufigkeiten der Veränderungen

Es wurde ein deutlicher Unterschied in der Häufigkeitsverteilung zwischen metastasierten und nicht metastasierten Tumoren beobachtet. Synchron metastasierte Tumore sowie Tumore mit später auftretenden Metastasen wiesen prozentual wesentlich häufiger genetische Aberrationen auf. Am häufigsten zu detektieren war ein Verlust der 9p21.3 Region. 70% der gesamten Kohorte wiesen einen Verlust auf. Hierbei entfielen 88% auf M1-Tumore. In M0-Tumoren war ein Verlust dieser Region in etwas mehr als der Hälfte (52%) der Proben feststellbar. Zugewinne auf Chromosom 1q21.3 und 20q11.21-q12 waren in M1-Tumoren wesentlich häufiger als in M0-Tumoren (64% bzw. 62% zu 12% bzw. 16%). Zugewinne der 7q36.3-Region waren insgesamt in 45% der Kohorte detektierbar. Davon entfielen 24% auf M0 und

66% auf M1 Tumore. Insgesamt lagen in 39% Zugewinne der Region 20q11.21 und in 38% der Fälle Zugewinne der Region 1q21.3 vor.

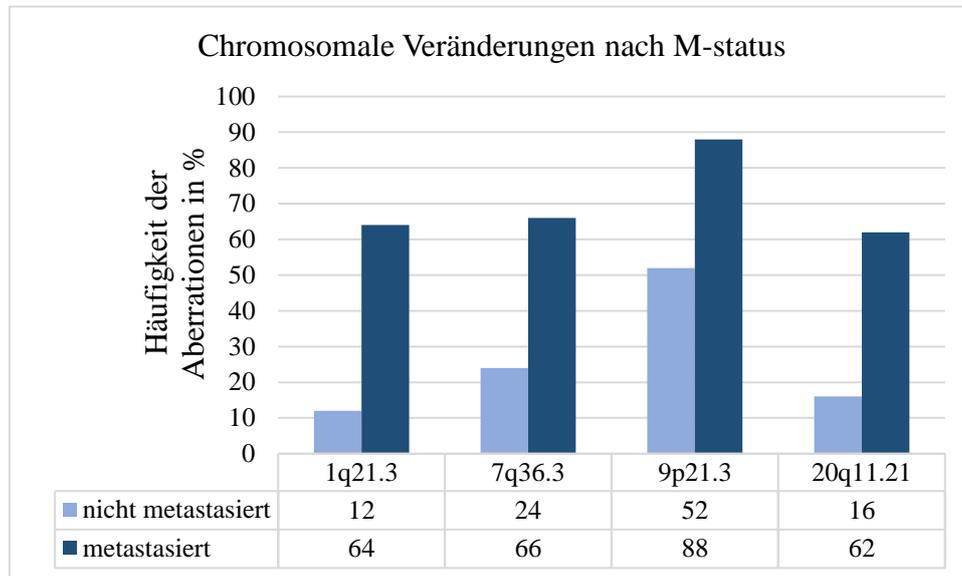


Abbildung 5 Häufigkeiten der chromosomalen Aberrationen in Kohorte 1

4.3.2 Regressionsanalyse zum Vergleich von klinischen Parametern und TNSA

Beim Vergleich mit klinischen und pathologischen Parametern, die bisher der Prognosebewertung des Nierenzellkarzinoms dienen, wurde die Aussagekraft des genetischen TNSA-Scores überprüft. Zunächst wurde eine univariate Analyse durchgeführt. Die T-Kategorie und der TNSA-Score stehen signifikant mit dem Auftreten von Metastasen in Verbindung (Tabelle 13). Das Grading war in dieser Analyse nicht statistisch relevant. Zu beachten ist, dass die Fallzahl für pT4 und G4 nicht ausreichend für eine Regressionsanalyse ist. Dadurch kommt der p-Wert 0,999 zu Stande, obwohl in beiden Fällen von einer Signifikanz ausgegangen werden kann. Für den Lymphknotenstatus lagen nicht in ausreichend vielen Fällen Daten vor, um pN in die Auswertung mit einzubeziehen. Im multivariaten Vergleich zeigt sich, dass Tumore ab pT3a mit einem signifikant erhöhten Metastasierungsrisiko assoziiert werden können (Tabelle 13). Der genetische TNSA-Score konnte in dieser Analyse als unabhängiger Prognosemarker bestätigt werden und ist mit einem p-Wert von $5,9 \cdot 10^{-5}$ hochsignifikant. Das Metastasierungsrisiko steigt in Kohorte 1 mit jeder hinzukommenden chromosomalen Aberration um das 3,8-fache (Odds ratio 3,789; CI=1,977-7,252).

Tabelle 13 Uni- und multivariate logistische Regression für die Vorhersage des Metastasierungsrisikos in Kohorte 1

Faktoren	p-Wert		Odds ratio (95% CI)	
	univariat	multivariat	univariat	multivariat
pT1a (Referenz)	-	-	-	-
pT1b	0,036	0,390	4,8(1,104-20,863)	2,277(0,349-14,849)
pT2	0,018	0,217	13,5(1,572-115,935)	6,235(0,342-113,670)
pT3a	5*10⁻⁶	0,003	42,75(5,563-213,419)	19,372(2,763-135,848)
pT3b/c	2,9*10⁻⁵	0,014	58,5(8,683-394,114)	15,741(1,766-140,335)
pT4	0,999	0,999	1,454*10 ⁷ (-)	2*10 ⁹ (-)
G1 (Referenz)	-	-	-	-
G2	0,788	0,419	0,681(0,041-11,286)	0,265(0,011-6,628)
G3	0,157	0,809	12,0(0,384-374,837)	0,583(0,007-46,227)
G4	0,999	0,999	1,61*10 ⁷ (-)	7,9*10 ⁶ (-)
TNSA	4,77*10⁻⁸	5,9*10⁻⁵	4,498(2,622-7,718)	3,786(1,977-7,252)

4.3.3 Einführung eines Risikostratifizierungsmodells

Ausgehend von dem Ergebnis der multivariaten Regression wurde ein statistisches Prognosemodell erarbeitet, welches den genetischen TNSA-Wert sowie die pT-Kategorie inkludiert. Da das Grading in Kohorte 1 kein unabhängiger prognostischer Faktor ist, wurde eine weitere Analyse mit den beiden verbleibenden prognoserelevanten Faktoren durchgeführt. Aus den durch diese Analyse erhaltenen Daten wurde ein Algorithmus entwickelt, welcher sowohl für die individuelle Prognosebewertung einzelner Patienten als auch für die Stratifizierung größerer Patientenkohorten in Hoch- und Niedrigrisikopatienten geeignet ist.

Für die Vereinfachung des Stratifizierungsmodells wurden die Regressionskoeffizienten der Gleichung aus Tabelle 14, mit Ausnahme der Kategorie pT4, als ganzzahlige Variablen für die T-Kategorien verwendet (pT1b=1, pT2=2, pT3=3, pT4=4; vgl. dazu (Frank et al., 2002)). Der T-Kategorie pT1a wurde der Wert 0 zugewiesen, da sie als Referenzkategorie dient. Für die weitere Berechnung des Algorithmus und für zukünftige Anwendungen werden für die T-Kategorien ausschließlich die ganzzahligen Variablen verwendet. Tumore kleiner 4 cm werden in diesem Modell also ausschließlich durch den TNSA klassifiziert.

Tabelle 14 Multivariate logistische Regression zur Berechnung der Regressionskoeffizienten für die T-Kategorien

Faktoren	Regressionskoeffizient	p-Wert
pT1a (Referenz)	-	-
pT1b	0,893	0,320
pT2	1,760	0,232
pT3a	3,105	0,001
pT3b/c	3,066	0,005
pT4	21,961	0,999
TNSA	1,353	2,3*10⁻⁵

Die Formel des Algorithmus ergibt sich direkt aus der anschließend durchgeführten Regressionsanalyse (Tabelle 15) und beinhaltet die Regressionskonstante sowie die Regressionskoeffizienten der Rechnung.

Tabelle 15 Multivariate logistische Regression für die Etablierung eines Risikostratifizierungsalgorithmus für die Vorhersage des Metastasierungsrisikos in Kohorte 1

Faktoren	Regressionskoeffizient	p-Wert	Odds ratio (95% CI)
T-Kategorie	1,051	<0,001	2,859(1,697-4,817)
TNSA	1,353	<0,001	3,868(2,096-7,138)
Konstante	-4,211	-	-

In diese Formel können der TNSA-Wert sowie der definierte Zahlenwert für die T-Kategorie eingesetzt werden. Der daraus erhaltene Wert \mathcal{g} wird dann in die Formel für die Wahrscheinlichkeit P eingegeben (Kapitel 3.8.3).

Daraus ergibt sich:

$$P = \frac{e^{\mathcal{g}}}{1+e^{\mathcal{g}}},$$

mit $\mathcal{g} = -4,221 + 1,353 * \text{TNSA} + 1,051 * \text{T-Kategorie}$

Das Ergebnis ist eine Zahl zwischen null und eins, die die Metastasierungswahrscheinlichkeit als einen in Prozent ausdrückbaren Wert anzeigt. Die Unterteilung der Patienten in eine Hoch-

und eine Niedrigrisikogruppe kann durch die Verwendung des Wertes 0,5 als Schwellwert erreicht werden. Patienten mit einem Wahrscheinlichkeitswert P unter 0,5 sind demnach Niedrigrisikopatienten. Überschreitet der Wert P 0,5, so können die Patienten der Hochrisikogruppe zugeordnet werden.

In Kohorte 1 werden durch dieses Modell 50 Patienten als Hoch- und 50 Patienten als Niedrigrisikofälle eingeordnet. In der Hochrisikogruppe finden sich 44 M1-Fälle, die durch den Algorithmus richtig eingeordnet wurden. In der Regressionsanalyse wird eine Genauigkeit von 88% (Sensitivität=88%, Spezifität=88%) errechnet. Im Folgenden wird dieser Algorithmus „Risikoscore“ genannt.

4.3.4 Analyse der organbegrenzten Tumore aus Kohorte 1

In Kohorte 1 waren rund ein Viertel der organbegrenzten Tumore metastasiert. Da in der Gruppe der organbegrenzten Tumore nur G2-Tumore enthalten sind, entfällt das Fuhrman-Grading in dieser Analyse als Prognosefaktor.

Alle chromosomalen Aberrationen sind auch in den organbegrenzten Tumoren signifikant mit der Metastasierung korreliert (Tabelle 16). Der Verlust der Region 9p21.3 weist den stärksten Zusammenhang mit dem Auftreten von Fernmetastasen (p-Wert = 0,00029) auf. Der TNSA-Wert bildet in der ROC-Analyse die größte Fläche unter der Kurve (p-Wert=0,000017).

Tabelle 16 Cut-Off-Werte für die Abschätzung des Metastasierungsrisikos (ROC-Kurven Analyse) und Korrelation der CNVs und des TNSA mit dem Metastasierungsstatus in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 1 (Fisher's exact test, univariate Regression)

CNVs	Cut off %	AUC (ROC-Kurve)	p-Wert (Fisher's Exact test)	Odds ratio (95% CI)
1q21.3	15	0,729	0,001	10,4 (2,54-42,585)
7q36.3	30	0,685	0,023	4,8 (1,336-17,243)
9p21.3	15	0,779	0,00029	12,467 (2,9-53,593)
20q11.21q12	25	0,744	0,002	8,5 (1,945-33,021)
TNSA	-	0,881	1,7*10⁻⁵	3,976 (1,945-8,13)

Regressionsanalysen der organbegrenzten Tumore zeigten nur univariat eine statistische Signifikanz für die prognostische Wertigkeit der T-Kategorien und der Tumorgöße auf. In einer multivariaten Analyse kann für die T-Kategorie und Tumorgöße kein Einfluss auf die Prognose nachgewiesen werden. Einzig der TNSA-Wert ist ein unabhängiger Prognosefaktor für Tumore, deren Wachstum auf die Niere beschränkt ist (Tabelle 17).

Tabelle 17 Uni- und multivariate logistische Regression für die Vorhersage des Metastasierungsrisikos organbegrenzter Tumore in Kohorte 1

Faktoren	Univariat		Multivariat	
	p-Wert	Odds ratio (95% CI)	p-Wert	Odds ratio (95% CI)
pT1a (Referenz)	-	-	-	-
pT1b	0,036	4,8(1,104-20,863)	0,536	1,903(0,248-14,616)
pT2	0,018	13,5(1,572-115,935)	0,520	3,474(0,078-154,618)
Tumor Größe (2-10cm)	0,011	1,556(1,106-2,19)	0,625	1,166(0,63-2,156)
TNSA	1,5*10⁻⁴	3,976(1,945-8,130)	0,001	3,436(1,66-7,11)

An dieser Stelle wurde der Risikoscore mit einer Einteilung der Patienten ausschließlich nach TNSA verglichen. Die Vorhersagegenauigkeit des TNSA-Scores beträgt 77,6% mit einer Sensitivität von 78,6% und einer Spezifität von 77,3%. Durch den Risikoscore wurden 10 Fälle als Hochrisikopatienten definiert, von welchen 8 Fälle tatsächlich M1-Fälle waren. 47 Patienten wurden der Gruppe der Niedrigrisikopatienten zugeordnet, wovon 41 Fälle richtig klassifiziert waren. In 6 Fällen lag jedoch eine Metastasierung vor. Der Risikoscore hat damit eine Sensitivität von 57,1%, jedoch eine Spezifität von 95,3% (Genauigkeit 86%). Die Odds Ratio beträgt für den Risikoscore 27,33, für den TNSA 12,47 (Tabelle 18).

Tabelle 18 Univariate Analyse zum Vergleich von Risikoscore und TNSA

Faktoren	Univariat	
	p-Wert	Odds ratio (95% CI)
TNSA	0,001	12,467(2,9-53,593)
Risikoscore	2,8*10⁻⁴	27,33(4,653-160,558)

4.3.5 Analyse der organüberschreitende Tumore aus Kohorte 1

In der Subgruppe der T3-T4-Tumoren befinden sich insgesamt 42 Fälle, von denen 36 Fälle metastasiert sind. Die einzelnen chromosomalen Aberrationen sowie der TNSA-Wert wurden zur Metastasierung korreliert. Nur Zugewinne der Regionen 1q21.3 und 7q36.3 sind in dieser Subgruppe signifikant mit dem Metastasierungsstatus korreliert (Tabelle 19).

Der TNSA-Wert ist auch in dieser Gruppe den einzelnen Aberrationen überlegen. Da der Verlust von 9p21.3 und der Zugewinn von 20q11.21q12 nicht signifikant sind, ist fraglich, ob

sie für die Prognose dieser Kohorte eine relevante Rolle spielen. Dazu wurde der Gesamtwert (TNSA) mit einem Wert bestehend nur aus 1q21.3 und 7q36.3 Zugewinnen verglichen. Der Wert aus Zugewinnen der Regionen 1q21.3 und 7q36.3 war statistisch signifikant mit der Metastasierung assoziiert ($p=0,002$), brachte allerdings im Vergleich zum Gesamt-TNSA-Score keine verbesserte Aussagekraft.

Tabelle 19 Cut-Off-Werte für die Abschätzung des Metastasierungsrisikos (ROC-Kurven Analyse) und Korrelation der CNVs und des TNSA mit dem Metastasierungsstatus in organüberschreitenden Tumoren der Kohorte 1 (Fisher's exact test, univariate Regression)

CNVs	Cut-Off %	AUC (ROC-Kurve)	p-Wert (Fisher's Exact test)	Odds ratio (95% CI)
1q21.3	15	0,75	0,032	10,0 (1,048-95,457)
7q36.3	30	0,833	0,004	807737421,4(-)
9p21.3	15	0,528	>0,05	1,3 (0,205-8,247)
20q11.21q12	25	0,78	>0,05	6 (0,936-38,445)
TNSA	-	0,863	0,002	4,565 (1,433-14,539)

Weiterführende Regressionsanalysen waren aufgrund der Fallzahlen (nur 6 Fälle mit M0) statistisch nicht möglich. Jedoch konnte der Risikoscore 2 der 6 M0-Fälle in den Tumoren $pT \geq 3a$ richtig als Niedrigrisikofälle erkennen. Alle M1-Fälle wurden in die Hochrisikogruppe klassifiziert. Aufgrund der unzureichenden Menge an Fällen je Variable, wurde für diese Subgruppe auf Überlebensanalysen verzichtet.

4.3.6 Vergleich des Risikostratifizierungsmodells mit dem Leibovich-Score

Um die Qualität des neuen Risikostratifizierungsmodells zu überprüfen, wurde der Leibovich-Score der initial nicht-metastasierten Patienten erhoben und mit den Daten der genetischen Risikostratifizierung verglichen. Für 71 Patienten der Kohorte 1 lagen alle Parameter für diese Analyse vor. In der univariaten Analyse waren Tumorgröße, T-Kategorie, Leibovich-Score und der Risikoscore signifikante Prädiktoren der Metastasierung. Einer multivariaten Überprüfung hielt nur der Risikoscore als unabhängiger Prognosefaktor stand (Tabelle 20).

In Kohorte 1 wurden 42 Patienten als Niedrig-, 25 als Intermediär- und 4 als Hochrisikopatienten nach Leibovich eingestuft. Zu einer metachronen Metastasierung kam es in 14% der Niedrigrisikopatienten, wovon die Hälfte durch den genetischen Risikoscore richtig erkannt werden konnte (3 von 6). In der Gruppe der Patienten mit intermediärem Risiko entwickelten 52% metachrone Metastasen. Der Risikoscore teilte in dieser Risikogruppe 12 der

13 Patienten (\cong 92%) mit Metastasenentwicklung richtig ein. Im Vergleich ist der Risikoscore der einzige unabhängige prognostische Faktor für die Metastasierung in dieser Subgruppe (p-Wert=0.047, OR= 20.17, 95% CI= 1.038-391.935). In der durch den Leibovich-Score als Hochrisikopatienten klassifizierten Gruppe, kam es bei 3 der 4 Patienten zu einer metachronen Metastasierung. Der genetische Risikoscore identifizierte diese 3 Patienten richtig als Hochrisiko- sowie den nicht-metastasierten Fall richtig als Niedrigrisikopatienten.

Tabelle 20 Vergleich des Leibovich-Scores mit anatomischen Faktoren und dem Risikoscore

Tumore mit M0 zum Diagnosezeitpunkt (n=71)				
Faktoren	Univariat			
	p-Wert	Odds ratio (95% CI)		
Tumorgröße	0,001	1,589(1,2-2,107)		
Grade	0,106	4,238(0,735-24,444)		
T-Kategorie	8,8*10⁻⁴	2,314(1,521-3,52)		
Leibovich-Score	0,001	5,415(2,569-11,84)		
Risikoscore	8,03*10⁻⁷	32,25(8,12-128,14)		
Tumore mit intermediärem Risiko nach Leibovich-Score (n=25)				
Faktoren	univariat		multivariat	
	p-Wert	Odds ratio (95% CI)	p-Wert	Odds ratio (95% CI)
Tumorgröße	0,078	1,493(0,957-2,33)	0,164	1,594(0,827-3,071)
Grade	0,584	1,965(0,176-21,971)	0,312	0,192(0,008-4,704)
Risikoscore	0,018	16,8(1,617-174,52)	0,047	20,17(1,04-391,94)

4.4 Überlebensanalysen für Kohorte 1

4.4.1 Progressionsfreies Überleben nach TNSA

Als Endpunkt für die Analyse des progressionsfreien Überlebens wurde das Auftreten von Fernmetastasen definiert. Von den 72 Patienten der Kohorte ohne synchrone Metastasierung erlitten 22 Patienten einen Progress. Tabelle 21 zeigt die Häufigkeit eines Progresses in Abhängigkeit vom TNSA-Wert. Alle Tumoren mit TNSA= 4 metastasierten im Beobachtungszeitraum, sowie 76,5% der Tumoren mit TNSA= 3. Die Kaplan-Meier-Analyse

des progressionsfreien Überlebens ist für diese Kohorte hoch-signifikant (Abb.8, Log-Rank $p=4,3*10^{-9}$).

Tabelle 21 Anzahl und Häufigkeit einer metachronen Metastasierung nach initialem pM0 Befund in Kohorte 1

TNSA	n	n = metachrone Metastasierung	Anteil in %
0	23	0	0
1	17	3	17,6
2	11	2	18,2
3	17	13	76,5
4	4	4	100

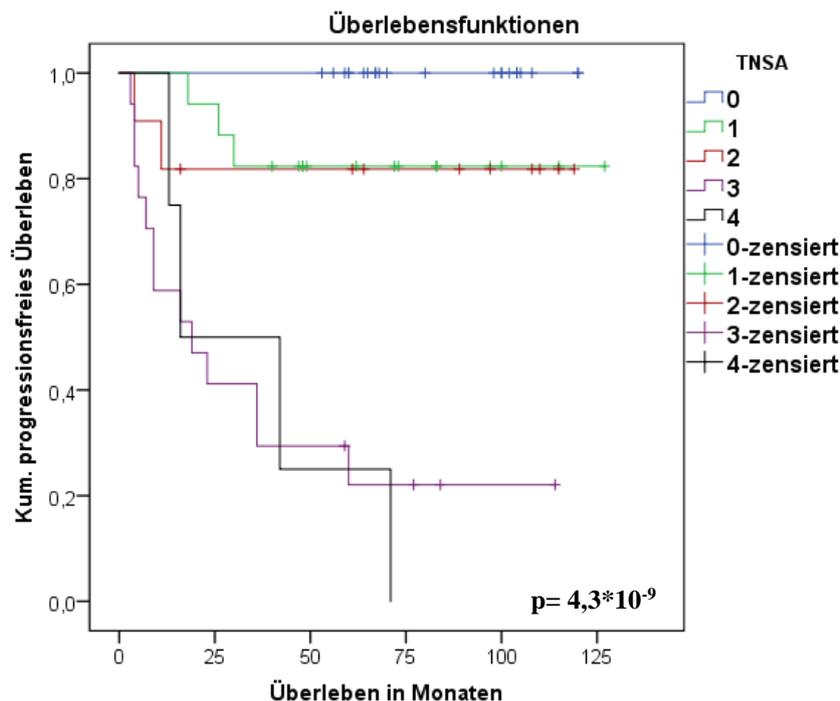


Abbildung 6 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das progressionsfreie Überleben in Kohorte 1

4.4.2 Gesamtüberleben und tumorspezifisches Überleben nach TNSA

In Kohorte 1 verstarben insgesamt 34 Patienten, davon 26 tumorbedingt im Beobachtungszeitraum (Tabelle 22). Die Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens und des tumorspezifischen Überlebens zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem TNSA-Wert und dem Überleben (Log-Rank-Test $p=0,002$ bzw. $p=0,001$). Die Grafik (Abb. 7) verdeutlicht, dass Patienten mit TNSA=0 eine sehr gute Prognose aufweisen. Keiner der Patienten verstarb an den Folgen der Tumorerkrankung. Patienten mit TNSA=4 und TNSA=2 zeigen hingegen den schlechtesten Verlauf. Liegt der TNSA bei 1 oder 3 verlaufen die Graphen des Kaplan-Meier-Diagrammes überkreuzend mit sehr ähnlichem Ergebnis. Aufgrund der sich

überkreuzenden Graphen ist eine Cox-Regression für das Überleben für den TNSA nicht zulässig und entfällt.

Tabelle 22 Anzahl und Häufigkeiten der Todesfälle und tumorbedingten Todesfälle in Kohorte 1

TNSA	n	n =Tod gesamt	Anteil in %	n =Tod durch Tumor	Anteil in %
0	23	1	0,4	0	0
1	22	8	36	5	23
2	19	10	52	9	47
3	21	7	33	5	24
4	15	8	53	7	47

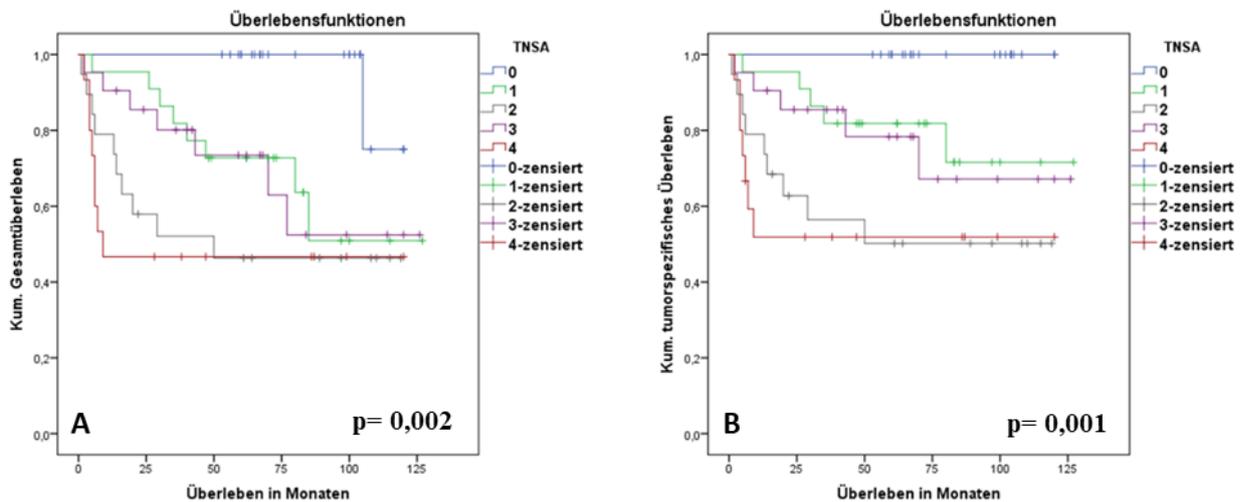


Abbildung 7 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das Gesamtüberleben (A) und das tumorspezifische Überleben (B) der Patienten in Kohorte 1

Tumore mit einem TNSA-Wert von 1-2, die initial nicht metastasiert waren, wiesen einen Progress nur in etwa 18% der Fälle auf. Das geschätzte progressionsfreie 5-Jahres-Überleben liegt für Patienten mit TNSA=1-2 bei rund 82%. Bei Patienten mit einem TNSA-Wert von 3 oder 4 liegt das 5-Jahres-Überleben ca. 24%. Der genetische Score kann somit zur Abschätzung einer metachronen Metastasierung verwendet werden.

4.4.3 Progressionsfreies Überleben nach Anwendung des Risikoscores

Von den 72 Patienten mit einer M0-Diagnose zum Operations-Zeitpunkt werden durch den Risikoscore 48 Patienten in die Niedrigrisikogruppe und 24 Patienten in die Hochrisikogruppe klassifiziert. In der Hochrisikogruppe erlitten 18 Patienten (75%) eine metachrone Fernmetastasierung, in der Niedrigrisikogruppe waren es nur 4 Patienten (8%). Das geschätzte progressionsfreie 5-Jahres-Überleben liegt für Niedrigrisikopatienten bei 91%, für

Hochrisikopatienten hingegen bei 25% (Abb.9). Die Kaplan-Meier-Kurven des progressionsfreien Überlebens nach Verwendung des Risikoscores zeigen eine hochsignifikante Trennung der Hoch- und Niedrigrisikogruppen (Log-Rank $p= 2,2*10^{-10}$). Die Hazard Rate der Cox-Regression gibt ein über 15-fach erhöhtes Metastasierungsrisiko der Hochrisikogruppe an (HR= 14,913; CI=4,991-44,559; p-Wert= $1*10^{-6}$).

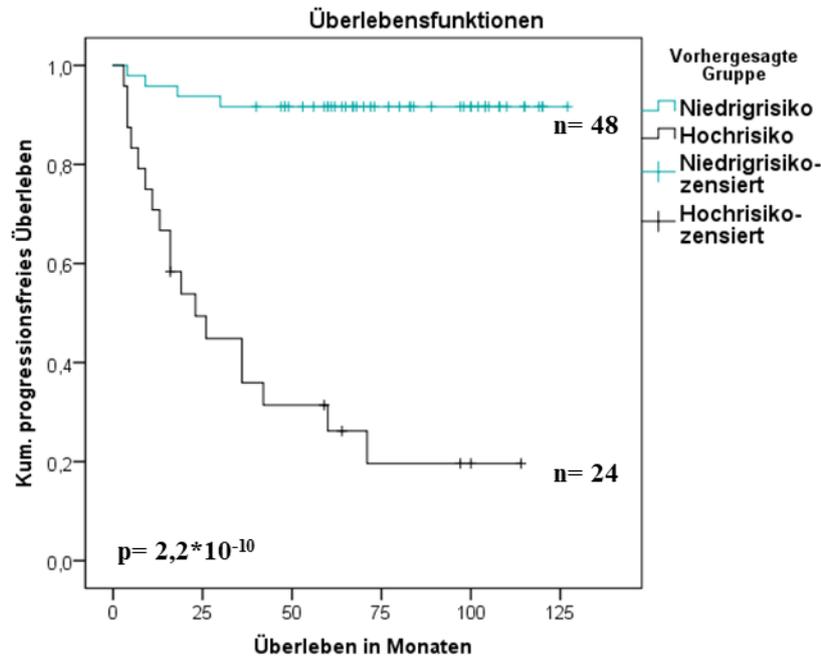


Abbildung 8 Kaplan-Meier-Kurve des progressionsfreien Überlebens nach Anwendung des Risikoscores in Kohorte 1

4.4.4 Gesamtüberleben und tumorspezifisches Überleben nach Anwendung des Risikoscores

Durch den Risikoscore wird Kohorte 1 in 50 Hoch- und 50 Niedrigrisikofälle eingeteilt (Abb. 10). In den Kaplan-Meier-Analysen erweist sich dieses Modell als hoch signifikant (Gesamtüberleben Log-Rank $p= 0,000038$; tumorspezifisches Überleben Log-Rank $p= 0,000005$). Die Wahrscheinlichkeit innerhalb von 5 Jahren tumorbedingt zu versterben liegt in der Niedrigrisikogruppe bei 8% und in der Hochrisikogruppe bei 44%. Da eine klare Trennung der Kurven besteht, ist eine Cox-Regression zur Überlebensanalyse möglich. Auch diese Analysemethode zeigt einen hoch-signifikanten Unterschied im Überleben der beiden Gruppen (Gesamtüberleben p-Wert= $0,000159$; tumorspezifisches Überleben p-Wert= $0,000123$). Die Hochrisikogruppe der Kohorte hat demnach ein mehr als 8-fach erhöhtes Risiko an ihren Tumoren zu versterben (HR= 8,164; CI= 2,796-23,842).

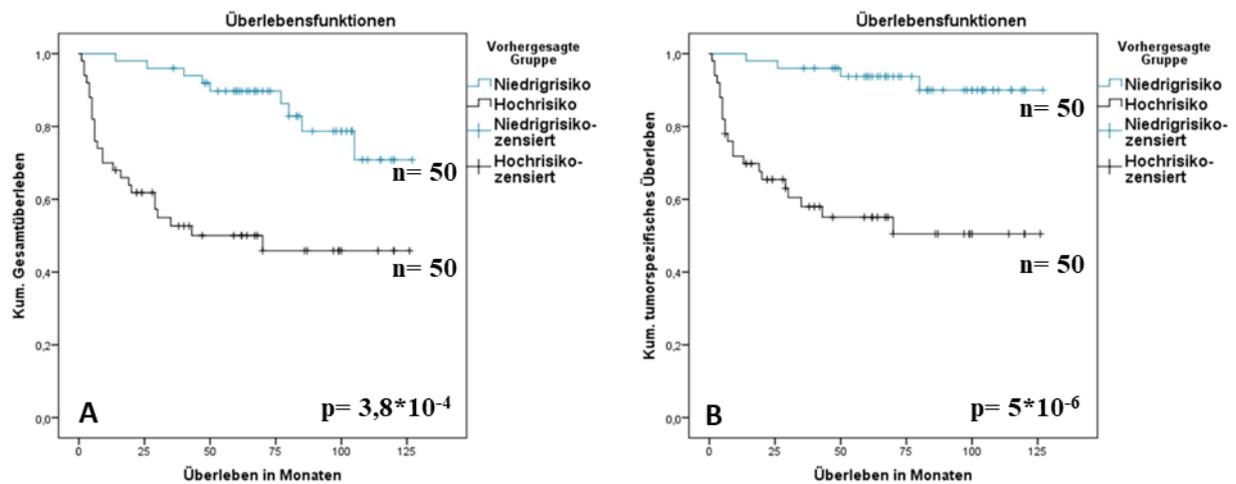


Abbildung 9 Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben (A) und das tumorspezifische Überleben (B) der nach Risikoscore eingeteilten Kohorte 1

4.4.5 Überlebensanalysen in organbegrenzten Tumoren

4.4.5.1 Progressionsfreies Überleben

Bei 10 Patienten (19%) mit organbegrenzten Tumoren kam es zu einer metachronen Metastasierung. Dabei nimmt der Anteil der metastasierten Fälle mit steigendem TNSA-Wert zu (Tabelle 23). Es besteht dabei ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl an chromosomalen Aberrationen und dem progressionsfreien Überleben der Patienten (Log-Rank $p=4,9 \cdot 10^{-5}$; Abb. 11).

Tabelle 23 Anzahl und Häufigkeiten einer metachronen Metastasierung in den organbegrenzten Tumoren der Kohorte 1

TNSA	n	n = metachrone Metastasierung	Anteil in %
0	21	0	0
1	15	2	13
2	6	1	16,6
3	8	4	50
4	3	3	100

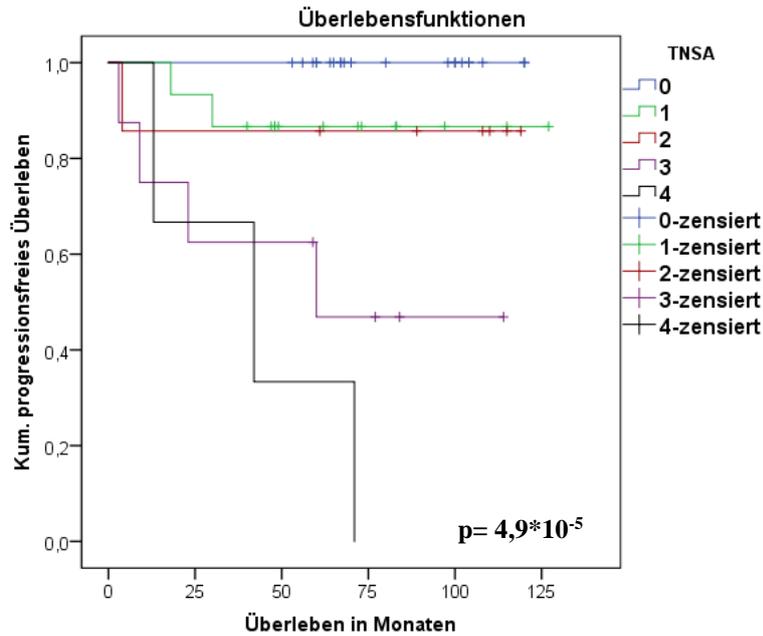


Abbildung 10 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das progressionsfreie Überleben in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 1

Unter Verwendung des Risikoscores werden 45 Patienten als Niedrigrisikopatienten und 8 als Hochrisikopatienten klassifiziert. Zu einem Progress kam es in 8% der Niedrigrisiko- und 75% der Hochrisikopatienten. In der Kaplan-Meier-Analyse zeigt sich eine signifikante Trennung der Kurven (Abb. 12, Log-Rank $p = 3 \cdot 10^{-6}$). Der signifikante Unterschied im zeitlichen Verlauf der beiden Risikogruppen konnte durch eine Cox-Regression bestätigt werden ($p = 1,8 \cdot 10^{-4}$). Das Risiko einer metachronen Metastasierung steigt in der Hochrisikogruppe um das 11,4-fache an ($HR = 11,366$; $CI = 3,181-40,609$).

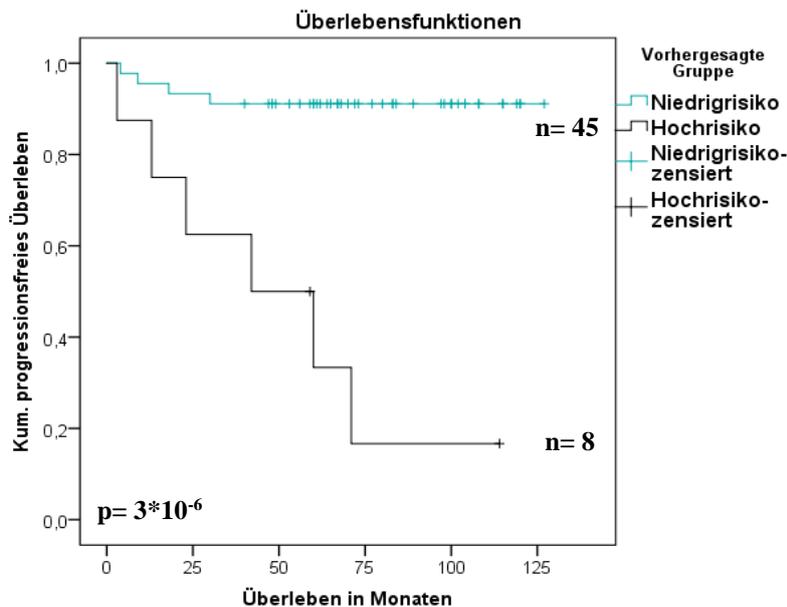


Abbildung 11 Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben der nach Risikoscore eingeteilten organbegrenzten Tumoren in Kohorte 1

4.4.5.2 Gesamt- und tumorspezifisches Überleben

In der Gruppe der organbegrenzten Tumore (T1a-T2) verstarben 9 von 57 Patienten, allerdings lediglich 4 (7%) davon tumorbedingt (Tabelle 24). Aufgrund der geringen Fallzahlen ist eine statistische Auswertung in diesem Fall wenig aussagekräftig. Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem TNSA-Wert und dem Überleben der Patienten (Abb. 13, Log-Rank $p= 0,073$). Keiner der 4 Patienten mit TNSA=4 verstarb. Die meisten tumorbedingten Todesfälle traten in der Gruppe mit zwei genetischen Veränderung auf (28,5%), jedoch ist auch diese Analyse nicht statistisch signifikant (log rank $p= 0,1$).

Tabelle 24 Anzahl und Häufigkeiten der Todesfälle und tumorbedingten Todesfälle organbegrenzter Tumore in Kohorte 1

TNSA	n	n =Tod gesamt	Anteil in %	n =Tod durch Tumor	Anteil in %
0	21	0	0	0	0
1	16	5	31	2	12,5
2	7	2	28,5	2	28,5
3	9	2	22	0	0
4	4	0	0	0	0

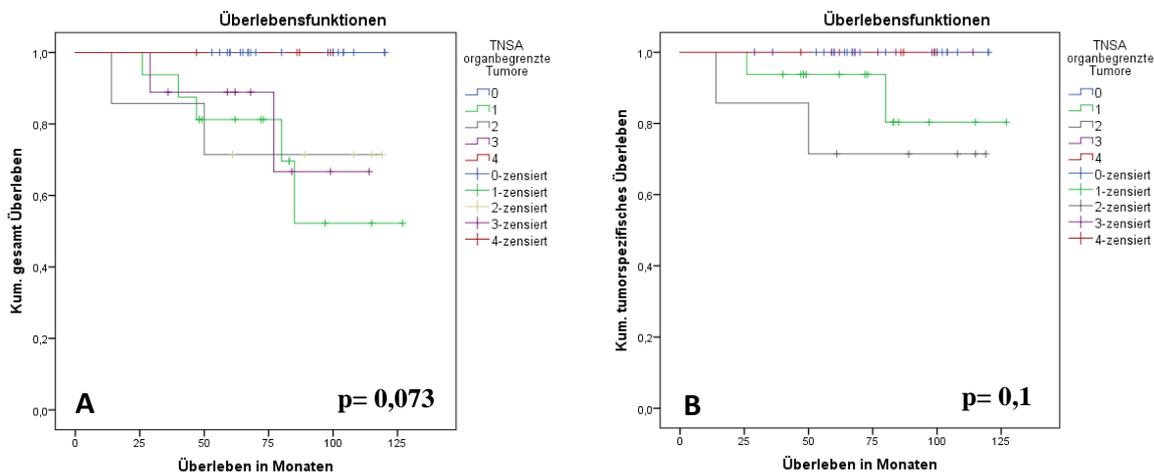


Abbildung 12 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das Gesamtüberleben (A) und das tumorspezifische Überleben (B) der organbegrenzten Tumore der Kohorte 1

Unter Verwendung des Risikoscores verbessert sich die Aussagekraft der Überlebensanalysen nicht (Gesamtüberleben Log-Rank $p= 0,647$; tumorspezifisches Überleben Log-Rank $p=0,575$).

4.5 Etablierung des genetischen Prognosescores auf formalinfixierten Gewebsschnitten

(Kohorte 2, Tissue Micro Arrays)

Die FISH-Analyse ist ein gut etabliertes, robustes, schnelles Verfahren für die Bestimmung genetischer Veränderungen in Zellen. Für die Umsetzung des TNSA-Scores in der Routine muss eine eindeutige Ermittlung der FISH-Signale auf fixierten Gewebeschnitten möglich und zuverlässig sein. Hierfür wurde ein Tissue Micro Array (TMA) verwendet, welches 4µm dicke Schnitte von NZKs enthielt. Die Fluoreszenzmarkierung der Chromosomen war mit den verwendeten Sonden auf Gewebeschnitten von ähnlicher Qualität wie in isolierten Zellkernen und für eine Auswertung sehr gut geeignet (Abb. 14 Beispiel FISH auf Schnitt).

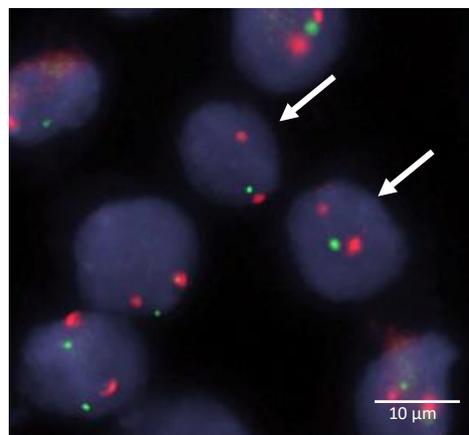
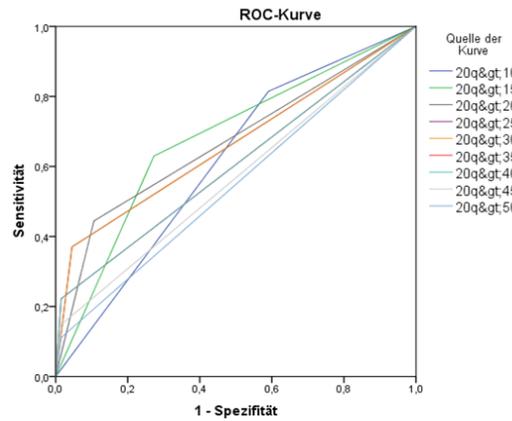
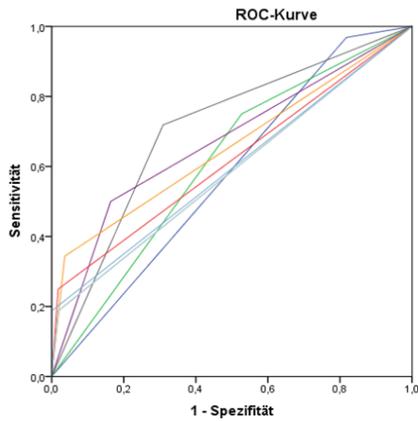
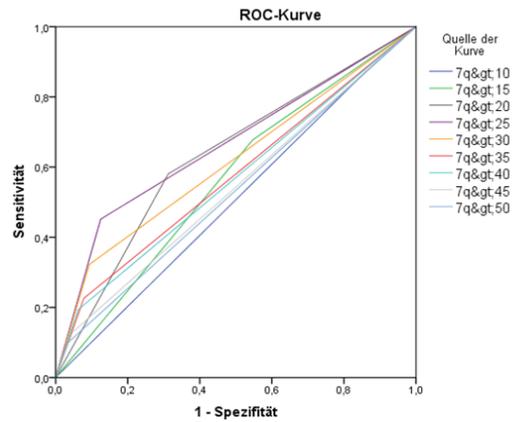
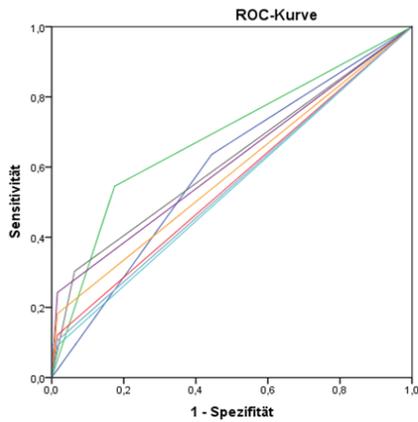


Abbildung 13 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines FFPE-Gewebeschnittes (4µm dick) eines kNZK; FISH-Sonden für 9p21.3 (grün) zeigen einen Verlust in Tumorzellen (Pfeile); CEN 9- Sonden (rot) dienen der Ploidiekontrolle

4.5.1 Bestimmung der Cut-Off-Werte für die Verwendung der FISH-Sonden auf Schnittpräparaten

Da in Gewebeschnitten die Zellkerne durch das Anschneiden nicht in ihrer Vollständigkeit erfasst werden können, mussten zunächst neue Schwellenwerte für die Dichotomisierung der FISH-Ergebnisse ermittelt werden. Dies wurde anhand der 100 ausgewerteten Fälle mittels ROC-Kurven-Analyse umgesetzt. Zunächst wurde die Anzahl an gezählten Veränderungen in 5-Schritt-Intervalle aufgeteilt und anschließend für jede Sonde ROC-Kurven erstellt (Abb. 15). Der Wert mit der größten Fläche unter der Kurve (AUC) und der besten Übereinstimmung mit dem Metastasierungsstatus wurde als Cut-Off-Wert definiert und für die Berechnung des TNSA verwendet. Für jede FISH-Sonde konnte ein Cut-Off ermittelt werden, der signifikant mit dem Metastasierungsstatus der Patienten korreliert.



Variable(n) für Testergebnis	Fläche	Asymptotische Signifikanz ^b
1q>10	,596	,124
1q>15	,685	,003
1q>20	,620	,055
1q>25	,613	,069
1q>30	,583	,183
1q>35	,553	,398
1q>40	,538	,547
1q>45	,545	,466
1q>50	,545	,466

Variable(n) für Testergebnis	Fläche	Asymptotische Signifikanz ^b
7q>10	,506	,927
7q>15	,565	,304
7q>20	,634	,035
7q>25	,663	,010
7q>30	,614	,072
7q>35	,574	,245
7q>40	,566	,302
7q>45	,541	,518
7q>50	,533	,606

Variable(n) für Testergebnis	Fläche	Asymptotische Signifikanz ^b
9p>10	,575	,243
9p>15	,611	,084
9p>20	,705	,002
9p>25	,668	,009
9p>30	,654	,017
9p>35	,616	,073
9p>40	,585	,190
9p>45	,585	,190
9p>50	,594	,146

Variable(n) für Testergebnis	Fläche	Asymptotische Signifikanz ^b
20q>10	,612	,091
20q>15	,678	,007
20q>20	,669	,011
20q>25	,662	,014
20q>30	,662	,014
20q>35	,604	,118
20q>40	,604	,118
20q>45	,566	,316
20q>50	,548	,469

Abbildung 14 ROC-Kurven für die Ermittlung des besten Schwellenwertes der FISH-Sonden und tabellarische Darstellung der Flächenwerte (AUC) und Signifikanzen der unterschiedlichen getesteten Schwellenwerte für FFPE-Schnitte

4.5.2 Korrelation der CNVs und des TNSA mit der Metastasierung

Die einzelnen CNVs stehen signifikant mit dem Auftreten von Metastasen in Zusammenhang (Tabelle 25). In Kohorte 2 ist ein Verlust der Region 9p21.3 der beste Prädiktor für die Metastasierung (p -Wert= $3 \cdot 10^{-6}$; OR=9,0; CI=3,411-23,749), gefolgt von Zugewinnen der Region 1q21.3 (p -Wert= $1,7 \cdot 10^{-5}$; OR=8,429; CI=3,132-22,679). Der Gesamtwert der Veränderungen (TNSA) beschreibt wie auch in Kohorte 1 die größte AUC und ist als Prädiktor der Metastasierung hochsignifikant (Abb. 16; p -Wert= $8,7 \cdot 10^{-11}$). Das Metastasierungsrisiko steigt in dieser Kohorte mit jeder hinzukommenden Aberration um das 6,5-fache (OR=6,504; CI=3,1-13,647).

Tabelle 25 Cut-Off Werte für die Abschätzung des Metastasierungsrisikos (ROC-Kurven Analyse) und Korrelation der CNVs und des TNSA mit dem Metastasierungsstatus in Kohorte 2 (Fisher's exact test, univariate Regression)

CNVs	Cut-Off %	AUC (ROC-Kurve)	p-Wert (Fisher's Exact test)	Odds ratio (95% CI)
1q21.3	15	0,715	$1,7 \cdot 10^{-5}$	8,429 (3,132-22,679)
7q36.3	25	0,660	0,001	5,833 (2,112-16,11)
9p21.3	20	0,750	$3 \cdot 10^{-6}$	9,0 (3,411-23,749)
20q11.21q12	15	0,656	0,003	3,857 (1,587-9,377)
TNSA	-	0,889	$8,7 \cdot 10^{-11}$	6,504 (3,1-13,647)

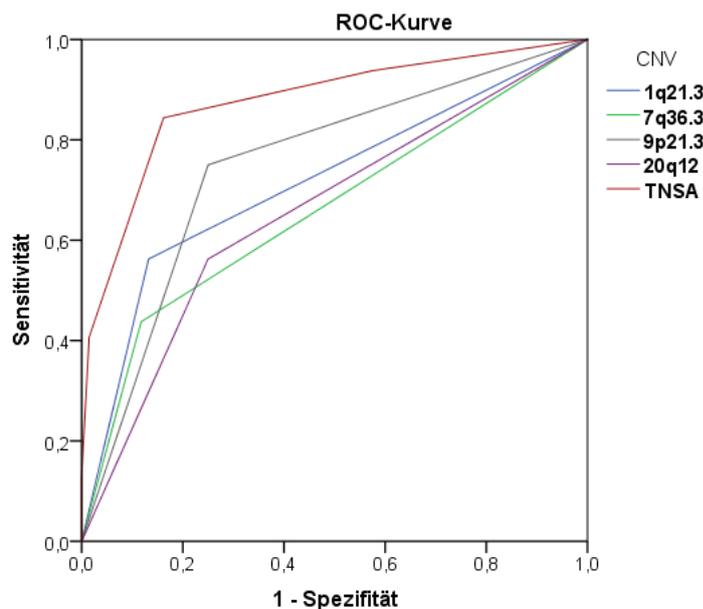


Abbildung 15 ROC-Kurven der einzelnen FISH-Sonden sowie des TNSA-Wertes in Abhängigkeit zum Metastasierungsstatus in Kohorte 2

4.5.3 Häufigkeiten der chromosomalen Aberrationen in Kohorte 2

Wie aus Abbildung 17 zu erkennen ist, sind die Aberrationen der Chromosomen in den metastasierten Tumoren deutlich häufiger detektierbar als in den nicht metastasierten Primärtumoren. Am häufigsten finden sich mit 41% Verluste der Region 9p21.3. Davon entfallen 75% auf metastasierte Tumore und 21% auf nicht metastasierte Tumore. Am zweithäufigsten sind Zugewinne der Region 20q11.21, was insgesamt in 35% der Fälle feststellbar war, gefolgt von Zugewinnen der Region 1q21.3 (27%). Am seltensten waren Zugewinne der Subtelomerregion 7q36.3 in insgesamt 22% der untersuchten Kohorte. In 30% der Kohorte waren keine spezifischen chromosomalen Veränderungen detektierbar.

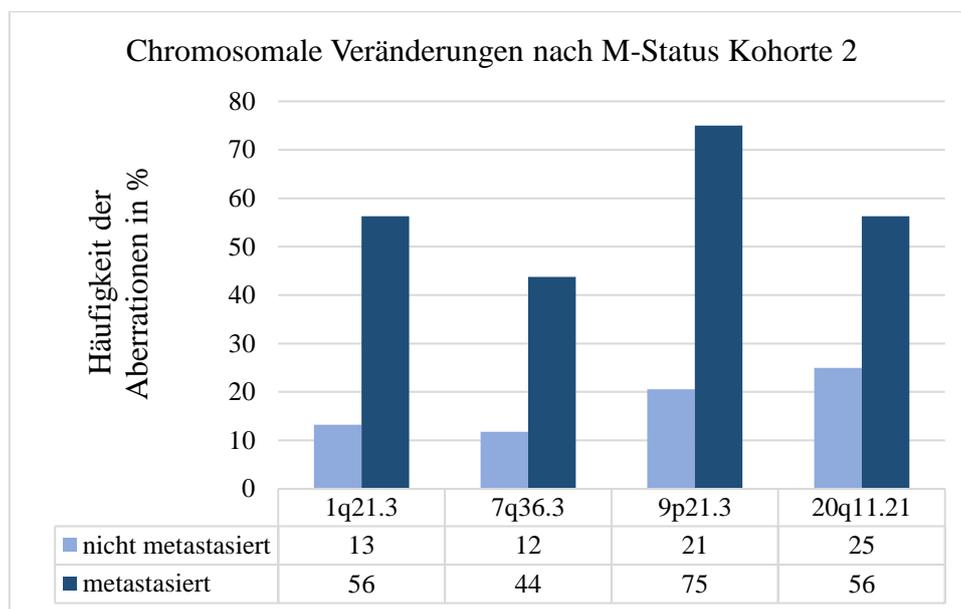


Abbildung 16 Häufigkeiten der chromosomalen Aberrationen in Kohorte 2

4.5.4 Regressionsanalysen zum Vergleich von klinischen Prognoseparameter und TNSA in Kohorte 2

Auch in Kohorte 2 wurde der ermittelte TNSA-Wert mit den zur Verfügung stehenden prognostischen Parametern verglichen. Aus der zunächst univariat durchgeführten logistischen Regression ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Metastasierung und den T-Kategorien (T1a als Referenz), der nach Risikoscore eingeteilten T-Kategorie (vgl. Kapitel 5.3.3), einem G3-Grading sowie dem TNSA Score (Tabelle 26). Das Metastasierungsrisiko steigt mit jeder hinzukommenden spezifischen chromosomalen Aberration um das 7,6-fache an (OR=7,66; CI=3,424-17,136). In der multivariaten Analyse erwiesen sich der TNSA-Score (p-Wert=0,000024), die Einteilung der T-Kategorie nach Kohorte 1 (p-Wert=0,004) sowie Tumore der Kategorie pT3b (p-Wert=0,012) als unabhängige Prognosefaktoren.

Tabelle 26 Uni- und multivariate logistische Regressionsanalyse für die Vorhersage des Metastasierungsrisikos in Kohorte 2

Faktoren	Univariat		Multivariat	
	p-Wert	Odds-ratio (95% CI)	p-Wert	Odds ratio-(95% CI)
pT1a (Referenz)	-	-	-	-
pT1b	0,96	2,878(0,829-9,999)	0,915	0,887(0,097-8,069)
pT2	0,012	6,167(1,486-25,586)	0,617	1,949(0,142-26,751)
pT3a	0,043	4,405(1,048-18,511)	0,459	2,71(0,194-37,958)
pT3b	0,001	16,444(3,378-80,048)	0,012	30,109(2,1-431,647)
T-Kategorie (1-4)	1,7*10⁻⁴	2,039(1,405-2,959)	-	-
G1 (Referenz)	-	-	-	-
G2	0,757	0,83(0,254-2,711)	0,73	0,687(0,081-5,79)
G3	0,006	7,0(1,739-28,174)	0,485	2,621(0,176-39,06)
TNSA	7,2*10⁻⁷	7,66(3,424-17,136)	2,4*10⁻⁵	10,922(3,604-33,098)

4.5.5 Validierung des Risikoscores

Zur Validierung des Risikoscores wurde der Algorithmus, der aus Kohorte 1 errechnet wurde, auf die Fälle der Kohorte 2 angewandt. Es wurden 73 Fälle als Niedrigrisikofälle und 27 als Hochrisikofälle definiert. In der Hochrisikogruppe lag in 74% der Patienten eine Metastasierung vor. In der Niedrigrisikogruppe wurden 84% richtig klassifiziert (M0). Die Risikoeinteilung korreliert damit hochsignifikant mit der Metastasierung (p-Wert=7,54*10⁻⁷). Die Genauigkeit des Risikoscores liegt bei 81% für Kohorte 2 (Sensitivität 62,5%, Spezifität 89,7%). Das Metastasierungsrisiko der Hochrisikogruppe ist um das 14,5-fache höher als das der Niedrigrisikogruppe (Tabelle 27). Da nicht alle Daten zur Berechnung des Leibovich-Scores für Kohorte 2 vorlagen, wurde zur Betrachtung der initial nicht-metastasierten Fälle der Risikoscore dem TNSA gegenüber gestellt. Wird der Risikoscore nur auf die Fälle angewendet, die zum Diagnosezeitpunkt als M0 bewertet wurden, zeigt sich, dass der Algorithmus für die Einschätzung der Prognose validiert werden kann (p-Wert= 0,001). Das Metastasierungsrisiko steigt bei Einteilung in die Hochrisikogruppe um das 7,7-fache im Vergleich zur Niedrigrisikogruppe an. In diesen Fällen liegt die Genauigkeit des Risikoscores bei 81,2% (Sensitivität 47,1%; Spezifität 89,7). Für metachron metastasierte Fälle liegt die Sensitivität des TNSA jedoch lediglich bei 17,6% (Spezifität 98,5%).

Tabelle 27 Univariate logistische Regressionsanalysen des Risikoscores und des TNSA in der gesamten Kohorte und in Fällen mit initialer pM0 Diagnose

Faktor	p-Wert	Odds-ratio (95% CI)
Risikoscore	7,54*10⁻⁷	14,524(5,031-41,928)
TNSA	7,2*10⁻⁷	7,66 (3,424-14,136)
Risikoscore in initial pM0 (n=85)	0,001	7,746(2,259-26,564)
TNSA in initialpM0 (n=85)	1,2*10⁻⁴	5,63(2,328-19,613)

4.5.6 Analyse der organbegrenzten Tumore aus Kohorte 2

In die Subgruppenanalyse der organbegrenzten Tumore in Kohorte 2 wurden 77 Fälle eingeschlossen. Von diesen blieben 58 Patienten im Beobachtungszeitraum ohne Progress. Bei 19 Patienten kam es zu einer Metastasierung, wobei dies in 12 Patienten metachron geschah.

Zunächst wurden die einzelnen CNVs in ROC-Analysen mit dem Metastasierungsstatus verglichen und Korrelationsanalysen durchgeführt. Der Verlust der 9p21.3-Region korreliert am stärksten mit der Metastasierung (p-Wert=4,2*10⁻⁵), gefolgt von einem Zugewinn des 1q21.3 Locus sowie des 7q36.3 Locus (Tabelle 28). Der Zugewinn der chromosomalen Region 20q11.21 konnte in dieser Analyse nicht signifikant mit der Metastasierung korreliert werden. Der TNSA-Wert weist die größte Fläche unter der Kurve in der ROC-Analyse auf und ist hochsignifikant mit der Metastasierung korreliert (p-Wert=6*10⁻⁹). Aus der Odds-ratio geht hervor, dass das Metastasierungsrisiko mit jeder CNV um das 13,9-fache steigt.

Tabelle 28 Cut-Off-Werte für die Abschätzung des Metastasierungsrisikos (ROC-Kurven Analyse) und Korrelation der CNVs und des TNSA mit dem Metastasierungsstatus in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2 (Fisher's exact test, univariate Regression)

CNVs	CutOff %	AUC (ROC-Kurve)	p-Wert (Fisher's Exact test)	Odds-ratio (95% CI)
1q21.3	15	0,755	9*10⁻⁵	11,458(3,3-39,737)
7q36.3	25	0,675	0,004	6,476(1,879-22,321)
9p21.3	20	0,782	4,2*10⁻⁵	13,378(3,37-53,097)
20q11.21q12	15	0,606	0,088	2,548(0,832-7,803)
TNSA	-	0,920	6*10⁻⁹	13,973(3,364-58,038)

Für die univariate Analyse der organbegrenzten Tumore zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Metastasierung und T-Kategorie, Grading oder Tumorgröße. Lediglich der TNSA-Wert korrelierte signifikant mit dem Auftreten von Metastasen und konnte auch in dieser Analyse im multivariaten Vergleich als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt werden (Tabelle 29).

Tabelle 29 Uni- und multivariate logistische Regressionsanalyse für die Vorhersage des Metastasierungsrisikos der organbegrenzten Tumore in Kohorte 2

Faktoren	Univariat		Multivariat	
	p-Wert	Odds-ratio (95% CI)	p-Wert	Odds-ratio (95% CI)
pT1a (Referenz)	-	-	-	-
pT1b	0,96	2,878(0,829-9,990)	0,824	0,688(0,025-18,617)
pT2	0,07	4,11(0,889-19,01)	0,831	2,117(0,002-2108,019)
G1 (Referenz)	-	-	-	-
G2	0,328	0,525(0,144-1,911)	0,716	0,612(0,044-8,592)
G3	0,072	5,0(0,806-28,861)	0,656	0,384(0,006-26,061)
Tumorgröße(2-8cm)	0,146	1,229(0,931-1,623)	0,851	1,104(0,39-3,125)
TNSA	1,7*10⁻⁴	15,384(3,688-64,164)	0,001	11,266(2,610-48,626)

4.5.7 Anwendung der Risikostratifizierung in der organbegrenzten Kohorte 2

Der Risikoscore wurde speziell auf die Subgruppe der organbegrenzten Tumore aus Kohorte 2 angewendet. Durch den Risikoscore wurden 13 Patienten als Hochrisikopatienten eingestuft. Von diesen 13 Fällen wurden in 11 Fällen Metastasen nachgewiesen. In die Niedrigrisikogruppe wurden 64 Fälle kategorisiert. In dieser Gruppe blieben 56 Patienten ohne Progress. Die Genauigkeit des Risikoscores liegt in den organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2 bei 87% mit einer Sensitivität von 57,9% und einer Spezifität von 96,6%. Der TNSA besitzt im Vergleich eine Sensitivität von nur 36,8% (Spezifität 98,3%).

Bei Betrachtung der initial als M0 klassifizierten, organbegrenzten Tumore sind sowohl Risikoscore als auch TNSA signifikante Prognoseparameter (Tabelle 30). Die Sensitivität des Risikoscores liegt in diesem Fall bei 50% (Spezifität 96,6%, Genauigkeit 88,6%). Die des TNSA nur bei 16,7% (Spezifität 98,3, Genauigkeit 84,3%).

Tabelle 30 Univariate Regressionsanalysen des Risikoscores und des TNSA in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2 und in organbegrenzten Fällen mit initialer pM0 Diagnose

Faktor	p-Wert	Odds ratio (95% CI)
Risikoscore	2*10⁻⁵	38,5 (7,183-206,348)
TNSA	1,7*10⁻⁴	15,384(3,688-64,164)
Risikoscore in initial pM0 (n=70)	3*10⁻⁴	28 (4,59170,796)
TNSA in initial pM0 (n=70)	0,001	11,437 (2,378-48,853)

4.6 Überlebensanalysen für Kohorte 2

4.6.1 Progressionsfreies Überleben nach TNSA

In die Analyse des progressionsfreien Überlebens wurden 75 Patienten eingeschlossen. In Kohorte 2 wurde in 17 Patienten eine metachrone Metastasierung diagnostiziert. Aus Tabelle 31 und Abb. 18 ist abzulesen, dass Tumore mit einem hohen TNSA früher und häufiger metastasieren als Tumore mit einem niedrigen TNSA. Der Anteil der progredienten Fälle lag bei Tumoren ohne spezifische chromosomale Veränderungen bei 4% (1 Fall) und stieg mit jeder weiteren chromosomalen Aberration an (Tabelle 21). Das progressionsfreie 5-Jahres-Überleben lag bei Patienten mit einem TNSA von 2 oder 3 bei etwa 50%. In Fällen mit einem TNSA von 0 oder 1 bei rund 90%. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt den hochsignifikanten Zusammenhang zwischen der Summe der Aberrationen und dem Auftreten metachroner Metastasen (Log-Rank $p=4*10^{-6}$).

Tabelle 31 Anzahl und Häufigkeiten einer metachronen Metastasierung nach initial pM0-Befund in Kohorte 2

TNSA	n	n = metachrone Metastasierung	Anteil in %
0	25	1	4
1	28	3	11
2	18	10	55,5
3	3	2	66,6
4	1	1	100

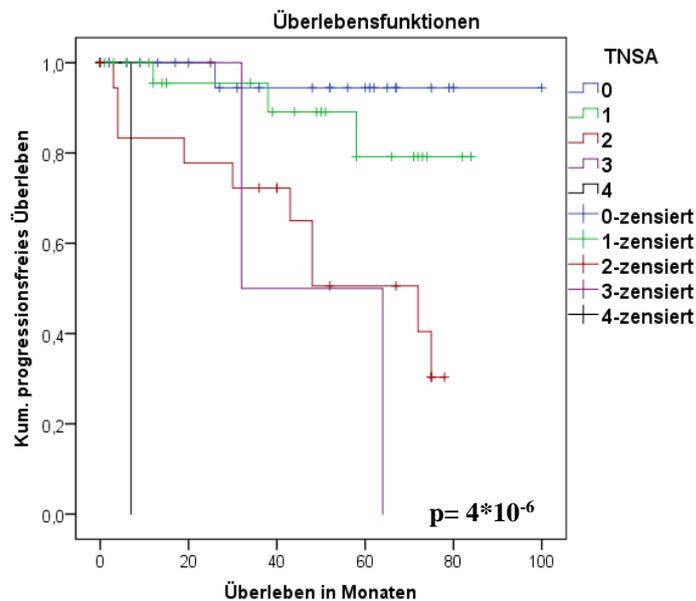


Abbildung 17 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das progressionsfreien Überleben in Kohorte 2

4.6.2 Gesamtüberleben und tumorspezifisches Überleben nach TNSA

In Kohorte 2 verstarben im Beobachtungszeitraum 23 Patienten, 17 Patienten davon tumorbedingt. Für die Überlebenszeitanalysen konnten nur 89 der 100 Fälle einbezogen werden, da die Nachsorge für 11 Patienten nicht den Anforderungen entsprach. Aus den Kaplan-Meier-Diagrammen geht hervor, dass sowohl das Gesamtüberleben als auch das tumorspezifische Überleben durch das Auftreten mehrerer chromosomaler Veränderungen stark verkürzt wird (Abb. 19). Patienten mit einem TNSA von 0 oder 1 verstarben seltener an ihrer Tumorerkrankung (3-4%) als Patienten mit 2 (23%) oder mehr Veränderungen (70-75%; Tabelle 32). Der Mantel-Cox-Log-Rank-Test beweist einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl an spezifischen chromosomalen Veränderungen und der Überlebensdauer der Patienten (Gesamtüberleben $p=1*10^{-6}$; tumorspezifisches Überleben $p=9,8*10^{-11}$).

Tabelle 32 Anzahl und Häufigkeiten der Todesfälle und tumorbedingten Todesfälle in Kohorte 2

TNSA	n	n =Tod gesamt	Anteil in %	n =Tod durch Tumor	Anteil in %
0	24	4	16	1	4
1	29	3	10	1	3
2	22	6	27	5	23
3	10	7	70	7	70
4	4	3	75	3	75

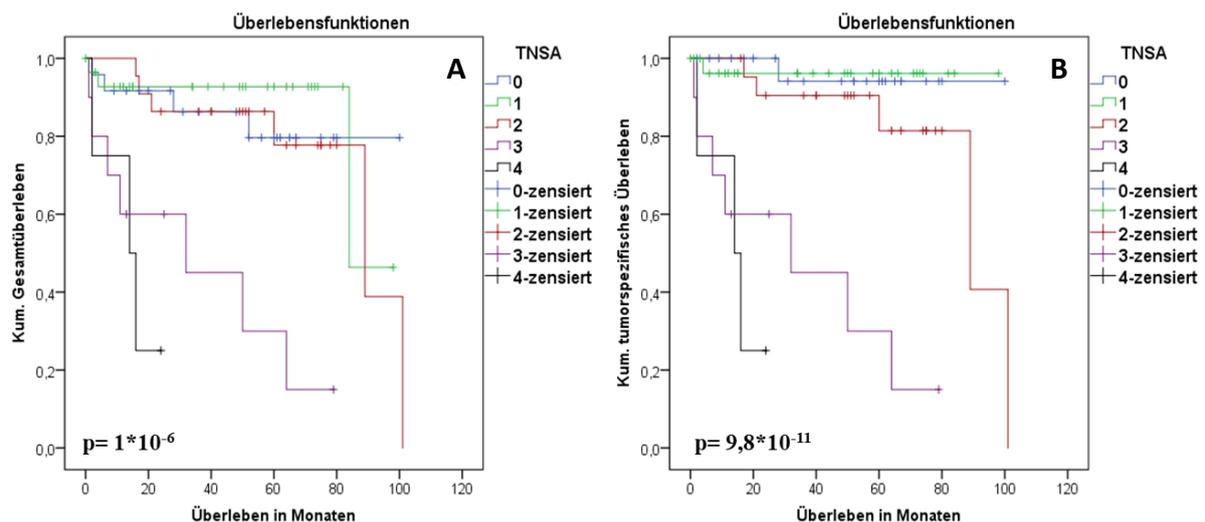


Abbildung 18 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das Gesamtüberleben (A) und das tumorspezifische Überleben (B) in Kohorte 2

4.6.3 Progressionsfreies Überleben nach Risikoscore

Von den 75 Fällen für die Analyse des progressionsfreien Überlebens wurden durch den Risikoscore 61 Patienten als Niedrigrisikopatienten klassifiziert und 14 Fälle als Hochrisikopatienten. Die durch den Risikoscore als Hochrisikogruppe definierten Fälle hatten

in Kohorte 2 ein signifikant erhöhtes Risiko einen Progress zu erleiden (Log-Rank $p=4 \cdot 10^{-4}$). Insgesamt kam es in 57% der Hochrisikopatienten zu einer metachronen Metastasierung und in 14,7% der Niedrigrisikopatienten. Das geschätzte progressionsfreie 5-Jahres-Überleben liegt in der Gruppe der Hochrisikopatienten bei 38%, das der Niedrigrisikopatienten bei 82,5% (Abb. 20). Das Metastasierungsrisiko war in der Hochrisikogruppe 4,77-fach erhöht im Vergleich zur Niedrigrisikogruppe (Cox-Regression $p=0,001$; HR=4,771; 95% CI=1,832-12,426).

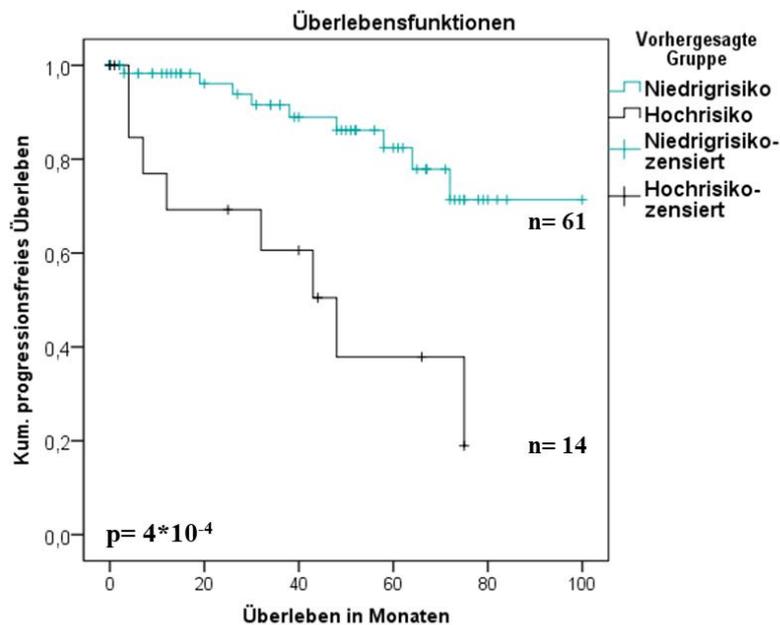


Abbildung 19 Kaplan-Meier-Kurven des progressionsfreien Überlebens nach Einteilung mittels Risikoscore in Kohorte 2

4.6.4 Gesamt- und tumorspezifisches Überleben nach Anwendung des Risikoscore

Die Unterteilung der Kohorte 2 in Hoch- und Niedrigrisikopatienten nach dem in Kohorte 1 entwickelten Algorithmus ist sowohl für die Vorhersage des Gesamtüberlebens als auch des tumorspezifischen Überlebens hochsignifikant (Log-Rank von Gesamtüberleben $p=1,6 \cdot 10^{-4}$; tumorspezifisches Überleben $p=2 \cdot 10^{-5}$). In der Hochrisikogruppe verstarben 50% der Patienten an ihrer Erkrankung (insgesamt verstarben 57,7%). In der Niedrigrisikogruppe verstarben 12,7% der Patienten, 6% tumorbedingt (Abb. 15). Die Analyse des Gesamtüberlebens mittels Cox-Regression ergab eine Signifikanz von 0,001 mit einer Hazard-Rate von 4,628 (95% CI=1,93-11,093). Für das tumorspezifische Überleben ergab sich eine Signifikanz von 0,00318 mit einem 8-fach erhöhten Risiko an der Tumorerkrankung zu versterben für die Hochrisikogruppe (HR=8,06; 95% CI=2,588-25,106).

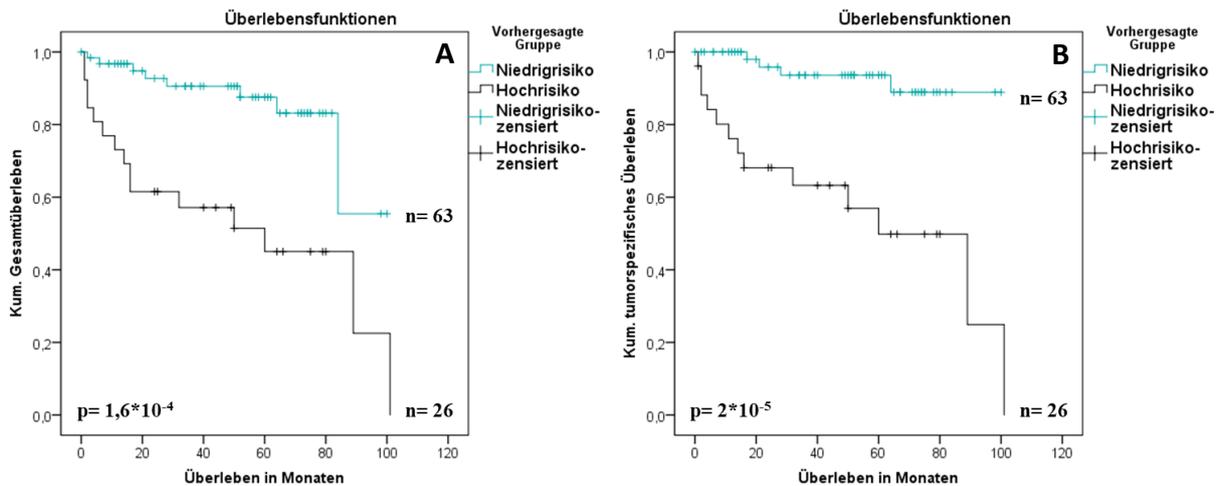


Abbildung 20 Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens (A) und tumorspezifischen Überlebens (B) nach Einteilung mittels Risikoscore in Kohorte 2

4.6.5 Überlebensanalysen in organbegrenzten Tumoren in Kohorte 2

4.6.5.1 Progressionsfreies Überleben nach TNSA in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2

Von den initial nicht-metastasierten Tumoren der organbegrenzten Subgruppe kam es in 12 Fällen (20%) zu einem Progress. In keinem der Patienten, die einen unauffälligen Befund in der FISH-Analyse hatten (TNSA=0), wurde eine Metastasierung festgestellt. Lediglich ein Patient mit TNSA=1 wies einen Progress auf. Die Prognose verschlechtert sich deutlich für Patienten mit einem TNSA von 2 oder höher. Insgesamt kam es in 58% der Patienten mit 2 oder mehr chromosomalen Veränderungen zu einer metachronen Metastasierung (Tabelle 33). In der Kaplan-Meier-Analyse zeigt sich auch hier die signifikante Korrelation des TNSA mit dem Auftreten metachroner Metastasen (Log-Rank $p=5 \cdot 10^{-6}$; Abb. 22).

Tabelle 33 Anzahl und Häufigkeiten einer metachronen Metastasierung in organbegrenzten Tumoren in Kohorte 2

TNSA	n	n = metachrone Metastasierung	Anteil in %
0	20	-	0
1	22	1	4,5
2	16	9	56
3	2	1	50
4	1	1	100

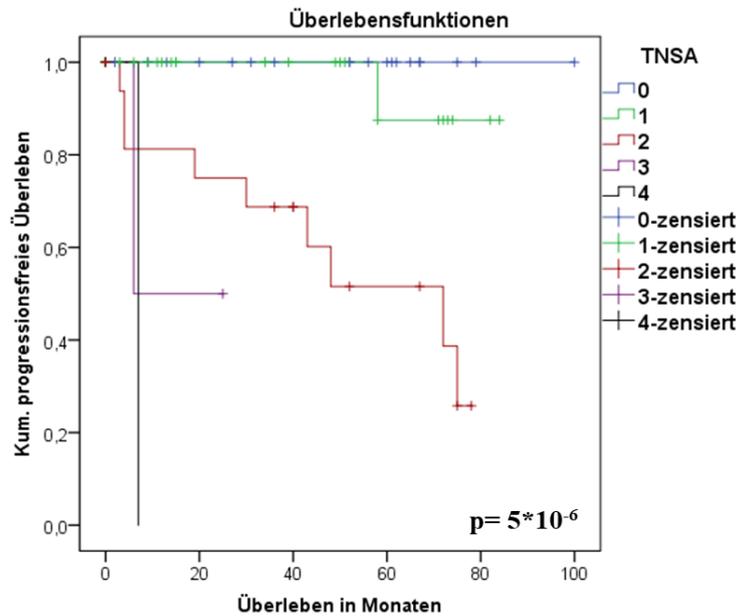


Abbildung 21 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das progressionsfreien Überleben der organbegrenzten Tumore aus Kohorte 2

4.6.5.2 Gesamtüberleben und tumorspezifisches Überleben nach TNSA in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2

In der Subgruppe der organbegrenzten Tumore aus Kohorte 2 verstarben im Beobachtungszeitraum 13 Patienten, davon 9 tumorbedingt. Insgesamt konnten in die Analyse 67 Patienten eingeschlossen werden (Tabelle 34). Die Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens ergab einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl an spezifischen chromosomalen Aberrationen und der Überlebenszeit der Patienten (Abb. 23; Log rank $p=3,9*10^{-5}$).

Tabelle 34 Anzahl und Häufigkeiten der Todesfälle und tumorbedingten Todesfälle in organbegrenzten Tumoren in Kohorte 2

TNSA	n	n =Tod gesamt	Anteil in %	n =Tod durch Tumor	Anteil in %
0	19	2	10,5	-	0
1	22	1	4,5	-	0
2	18	5	28	4	22
3	5	3	60	3	60
4	3	2	66,6	2	66,6

Noch deutlicher ist die Kaplan-Meier-Auswertung für das tumorspezifische Überleben. Keiner der Patienten mit einem TNSA von 0 oder 1 verstarb an seiner Tumorerkrankung. Von den 18 Patienten mit TNSA=2 verstarben 22% tumorbedingt. Im Vergleich dazu erlagen Patienten mit TNSA von 3 oder 4 signifikant häufiger und früher ihrer Erkrankung (Abb. 23; Log rank $p=2,36*10^{-8}$).

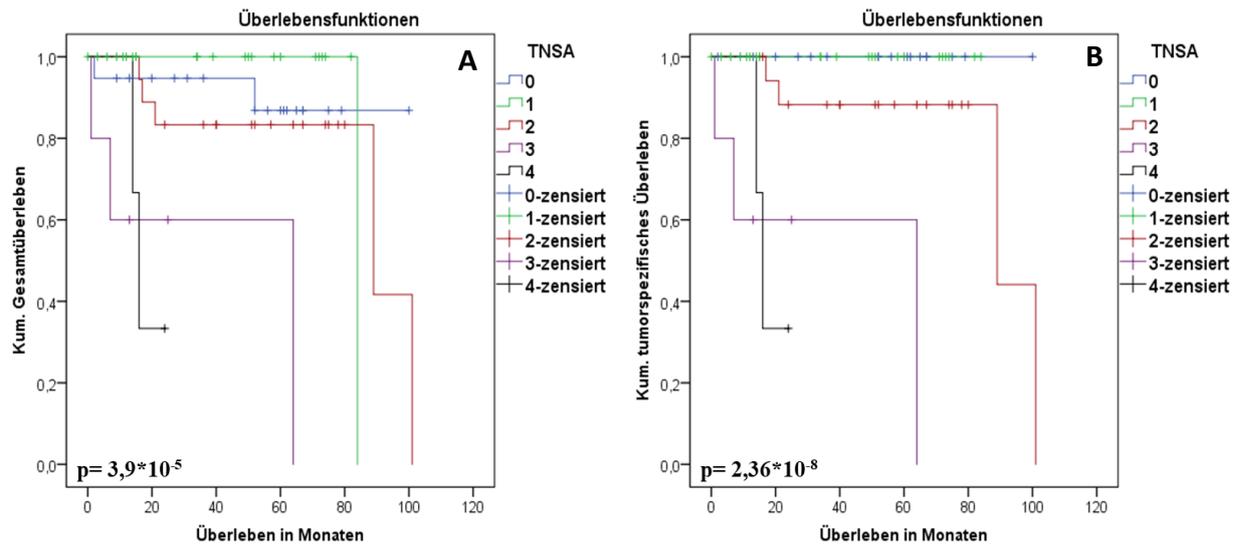


Abbildung 22 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das Gesamtüberleben (A) und das tumorspezifische Überleben (B) der organbegrenzten Tumore aus Kohorte 2 nach TNSA

4.6.5.3 Progressionsfreies Überleben in organbegrenzten Tumoren nach Risikoscore

Der Risikoscore wurde im Anschluss in der Subgruppe der organbegrenzten Tumore validiert. Von den 12 Patienten, die nach initialer M0-Diagnose eine Fernmetastasierung aufwiesen, befanden sich 6 Patienten in der Hochrisikogruppe und 6 Patienten in der Niedrigrisikogruppe. Da in die Hochrisikogruppe jedoch nur 8 Fälle eingeordnet wurden, entsprach der Anteil an metachron metastasierten Fällen 75% dieser Gruppe. In der Niedrigrisikogruppe kam es im Vergleich nur in 11% zu einer Fernmetastasierung. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt einen hochsignifikanten Unterschied für das progressionsfreie Überleben der beiden Gruppen (Log-Rank $p = 1 \cdot 10^{-6}$; Abb. 24). Das Risiko einer metachronen Metastasierung steigt bei Einteilung in die Hochrisikogruppe um das 10-fache im Vergleich zur Niedrigrisikogruppe (Cox-Regression $p = 8,2 \cdot 10^{-5}$; HR=10,318; 95% CI=3,228-32,974).

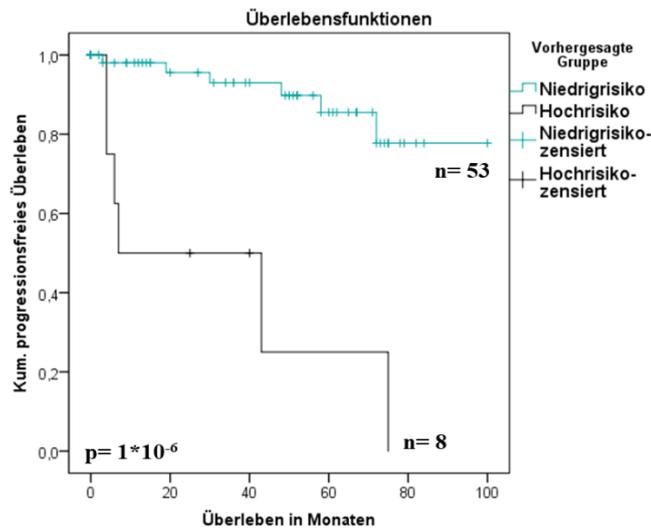


Abbildung 23 Kaplan-Meier-Kurven des progressionsfreien Überlebens in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2 nach Einteilung mittels Risikoscore

4.6.5.4 Gesamt- und tumorspezifisches Überleben in organbegrenzten Tumoren nach Risikoscore

Als Niedrigrisikopatienten wurden nach dem Risikoscore 54 Fälle klassifiziert. In dieser Gruppe verstarben insgesamt 5 Patienten, davon 2 (\cong 4%) als Folge ihrer Tumorerkrankung. In die Hochrisikogruppe wurden 13 Patienten eingeordnet. Von diesen verstarben 7 Patienten (54%) tumorbedingt. Die Trennung der Hoch- und Niedrigrisikogruppen ist sowohl für das Gesamtüberleben (Log-Rank $p=0,002$) als auch das tumorspezifische Überleben (Log-Rank $p=0,00019$) signifikant (Abb. 25). Dies konnte auch mit einer Cox-Regression bestätigt werden. Für das Gesamtüberleben ergibt sich eine Risikozunahme um das 5,4-fache in der Hochrisikogruppe ($p=0,006$; HR=5,436; 95% CI=1,644-17,975). Das Risiko tumorbedingt zu versterben erhöht sich um das 12-fache für die Hochrisikogruppe ($p=0,002$; HR=12,409; 95% CI=2,427-63,451).

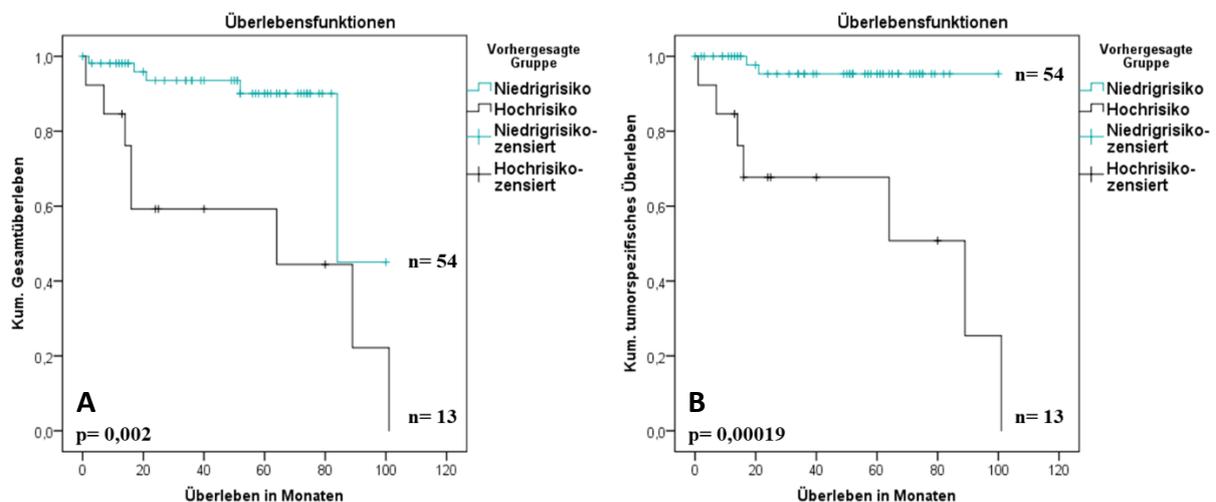


Abbildung 24 Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens (A) und tumorspezifischen Überlebens (B) nach Einteilung mittels Risikoscore in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2

4.7 Validierung der untersuchten chromosomalen Regionen durch die Analyse des TCGA-Datensatzes.

Die Datenbank des The Cancer Genome Atlas wurde als zusätzliche Kohorte für die Validierung der Aussagekraft der untersuchten chromosomalen Regionen herangezogen. Die Level 3-Daten der sequenzierten klarzelliger Nierenzellkarzinome enthielten 495 Proben von Primärtumoren, die zur Auswertung genutzt werden konnten. Aufgrund der Datenlage wurden nur Fälle miteingeschlossen, die primär M0 oder M1 waren. Die Aufteilung der Kohorte in die Gruppen „metastasiert“ und „nicht metastasiert“ erlaubt einen Vergleich der Sequenzierungsdaten hinsichtlich signifikanter Veränderungen die als CNVs oder differentielle Genexpressionen auftreten. Zunächst wurde die gesamte Kohorte nach CNVs überprüft, die metastasierte und nicht metastasierte Fälle unterscheiden. Abbildung 26 zeigt farblich markiert Zugewinne (grün) und Verluste (rot) der einzelnen Chromosomen, die in metastasierten Tumoren signifikant häufiger ($p < 0,05$) sind als in nicht metastasierten Tumoren. Zu erkennen sind Zugewinne auf Chromosom 3, 7, 12 und 20 sowie Verluste der Chromosomen 4, 9, 14, 18 und einzelner kleinerer Regionen auf Chromosom 6, 15 und 17.

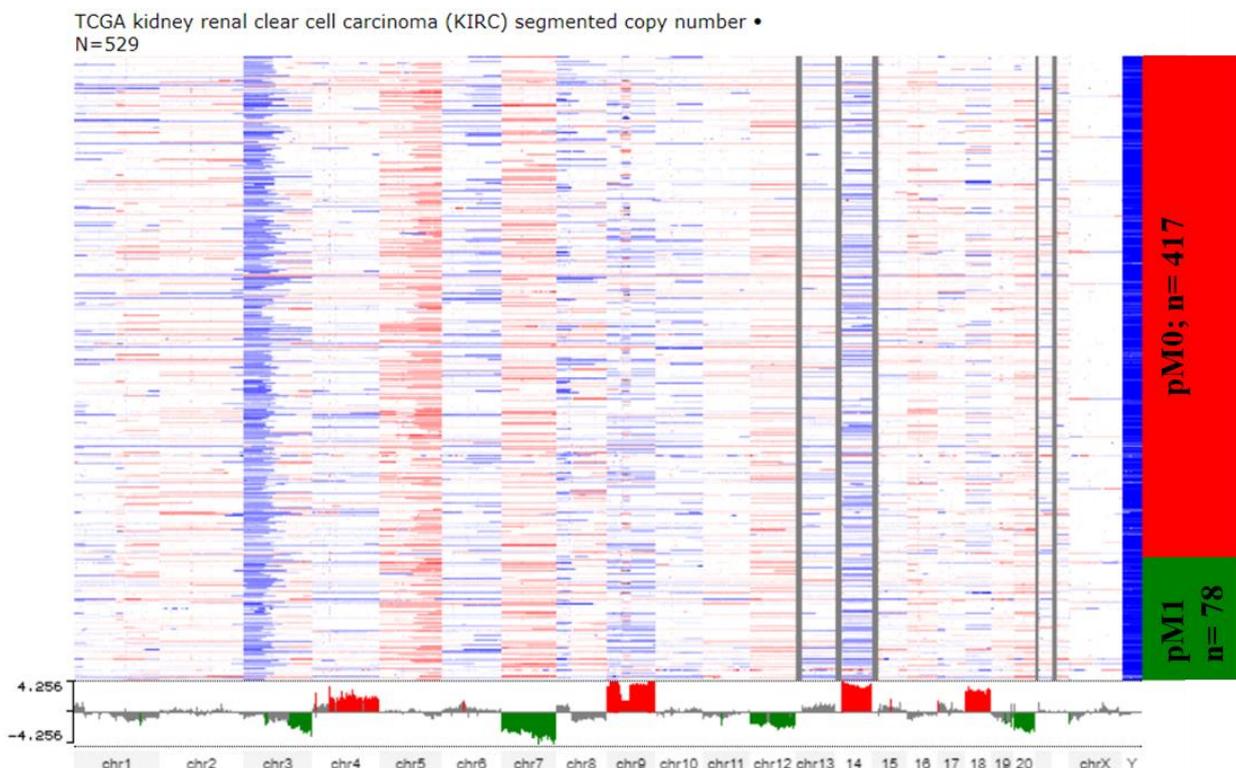


Abbildung 25 TCGA-Datenanalyse der durch Sequenzierung ermittelten CNVs in nicht-metastasierten (rot) und metastasierten (grün) Tumoren.

Um Veränderungen, die in organbegrenzten beziehungsweise organüberschreitenden Tumoren eine Unterscheidung metastasierter und nicht metastasierter Tumore erlauben würden, zu analysieren, wurden die TCGA-Daten dementsprechend nach T-Kategorien unterteilt und die Analyse einmal in Tumoren der Kategorien pT1-pT2 und einmal in Tumoren mit pT3-pT4 wiederholt.

Für die Auswertung standen in der Gruppe der metastasierten Tumore nur 14 Fälle in organbegrenzten Tumoren zur Verfügung. Signifikante Zugewinne auf Chromosom 1q, 5q und Chromosom X sowie Verluste des Chromosom 9 und 14 unterscheiden in dieser Kohorte metastasierte und nicht metastasierte Tumore (Abb. 27).

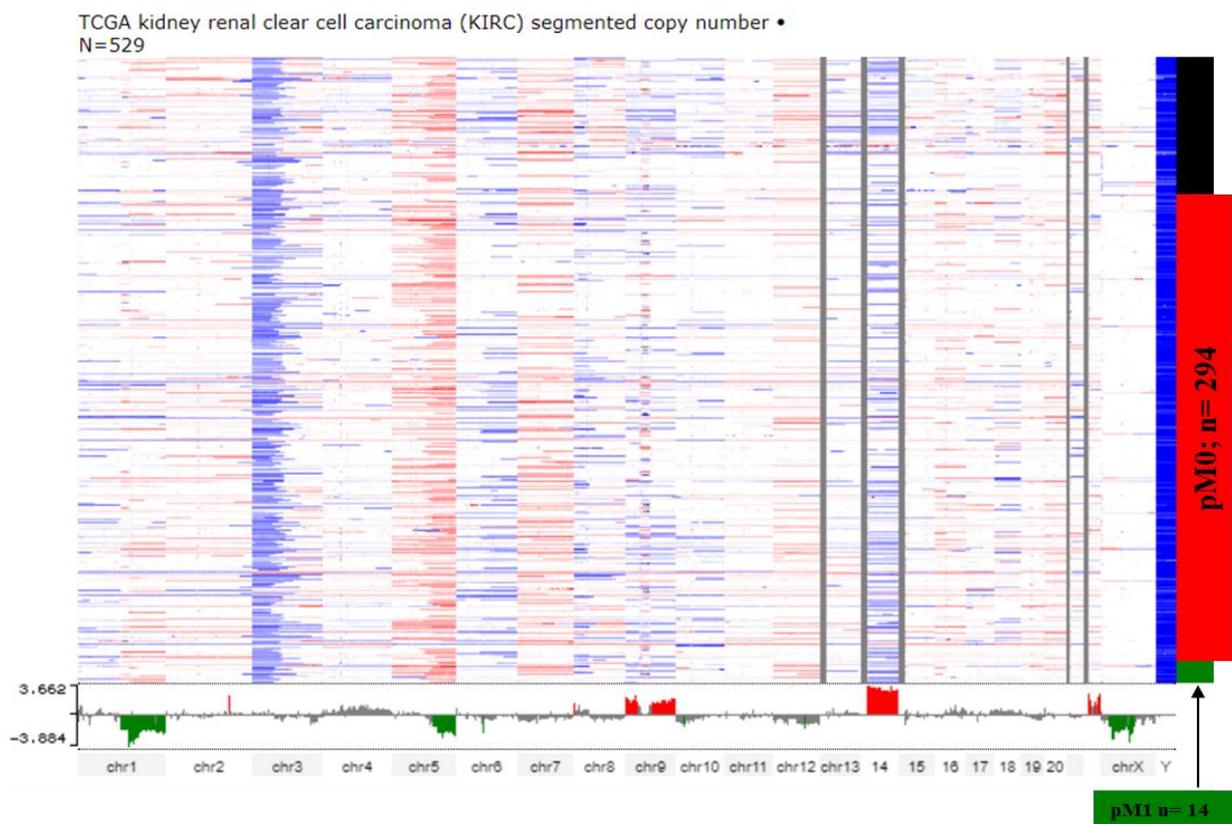


Abbildung 26 TCGA-Datenanalyse der durch Sequenzierung ermittelten CNVs in nicht-metastasierten (rot) und metastasierten (grün) Tumoren der T-Kategorien pT1-pT2

In der Analyse der organüberschreitenden Tumore enthielt die Gruppe der metastasierten Tumore 64 Fälle. Nicht metastasierte Tumore wurden 123 Fälle eingeschlossen. Es wurde vor allem ein signifikanter Zugewinn von Chromosom 7 deutlich, der in metastasierten Tumoren überwiegt (Abb. 28). Fokale Amplifikationen auf Chromosom 3 und 11 sowie fokale Deletionen auf den Chromosomen 2, 4, 6, 18, 19 und 21 erreichten ebenfalls das Signifikanzniveau.

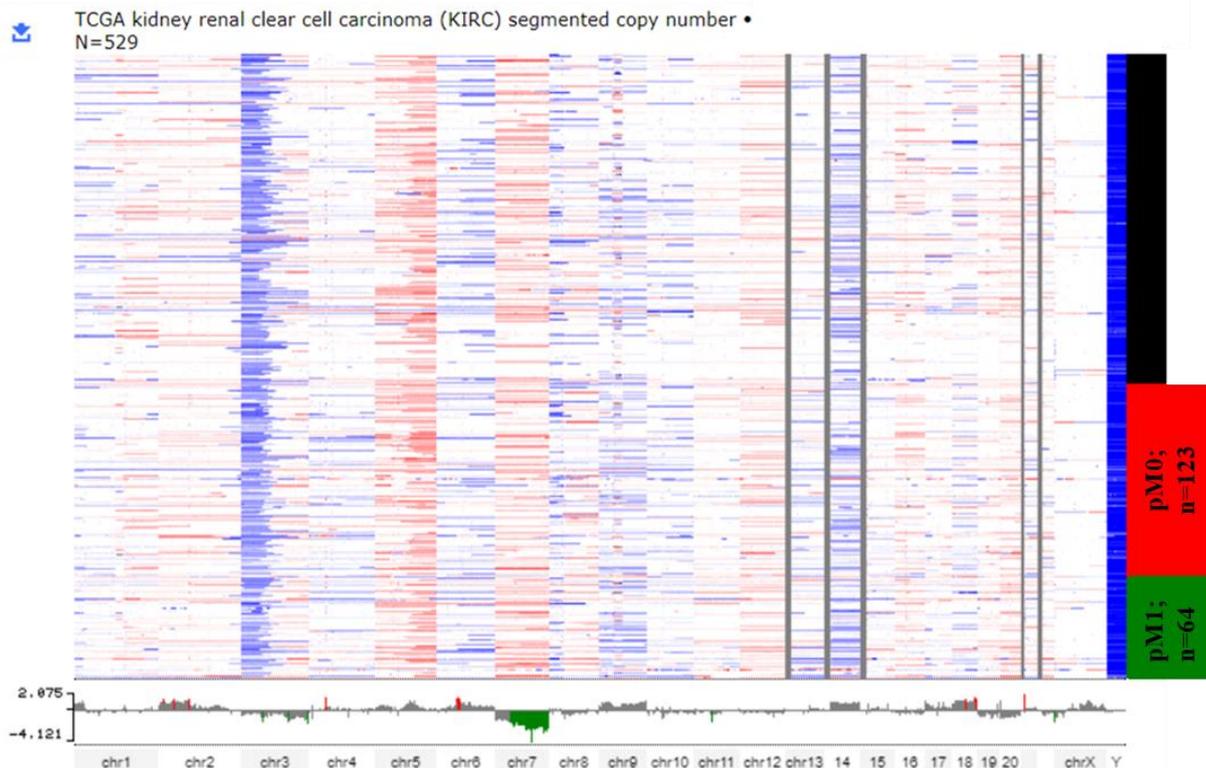


Abbildung 27 TCGA-Datenanalyse der durch Sequenzierung ermittelten CNVs in nicht-metastasierten (rot) und metastasierten (grün) Tumoren der T-Kategorien pT3-pT4

4.8 Genexpressionsanalysen

4.8.1 Selektion von Kandidatengenen

Für die Selektion interessanter Kandidatengene der untersuchten Chromosomenregionen wurden die KIRC-TCGA-Daten (Stand 2014) mit Hilfe des UCSC-Cancer-browsers analysiert. In die Subgruppenanalyse flossen die Genexpressionsdaten (IlluminaHiSeq NGS) von insgesamt 500 Primärtumoren ein. Die Subgruppen wurden nach M-Status getrennt, wobei 421 Fälle in die M0 und 79 Fälle in die M1-Gruppe sortiert wurden. Die Expressionsunterschiede der Gene, welche in den Chromosomenregionen 1q21.3, 7q36.3, 9p21.3 und 20q11.21 lokalisiert sind, sowie alle Gene, welche jeweils im Abstand von einer Megabase in Telomer- sowie Zentromer-Richtung vom exakten Lokus der Hybridisierung der FISH-Sonden liegen, wurden statistisch ermittelt (Wilcoxon-Test). Alle signifikant deregulierten Gene wurden anschließend mit publizierten Daten verglichen, um mögliche metastasierungsassoziierte Gene zu identifizieren. Tabelle 35 enthält die vollständige Liste der für die Untersuchungen ausgewählten Gene.

Tabelle 35 Ausgewählte Gene für die Genexpressionsanalyse mit qRT-PCR

Gen (Synonym)	Lokalisation	Bekannte Funktion
<i>S100A10</i>	1q21	Calcium binding protein, intrazellulärer Proteintransport
<i>ECM1</i>	1q21	Fördert die Angiogenese und Proliferation von Endothelzellen
<i>ARNT (HIF-1β)</i>	1q21	HIF-1 β , Transkriptionsfaktor
<i>CDKN2A</i>	9p21	Zellzykluskontrolle, Tumorsuppressorgen
<i>MTAP</i>	9p21	Methylthioadenosin Phosphorylase
<i>B7H1 (PD-L1 oder CD274)</i>	9p24	Inhibitorischer Ligand des T-Zell Co-Rezeptors PD1
<i>EZH2</i>	7q36.1	Histon Methyltransferase
<i>SHH</i>	7q36.3	Morphogen, wichtig in der Organogenese
<i>DNAJB6</i>	7q36.3	Hsp40 family member, Aktinskelett Aufbau
<i>BCL2L1 (BCL-xL)</i>	20q11.21	Antiapoptotisches Protein der BCL Familie
<i>TPX2</i>	20q11.21	Aufbau des Spindelapparates
<i>E2F1</i>	20q11.22	Transkriptionsfaktor

Die ausgewählten Gene sind zum Teil in der TCGA-Datenauswertung nicht signifikant zwischen den Gruppen metastasiert und nicht-metastasiert dereguliert. Aufgrund zahlreicher publizierter Daten zu diesen Genen (*BCL-xL* und *CDKN2A*) oder aufgrund ihrer für das NZK interessanten Rolle in bestimmten Signalwegen (*HIF-1 β* , *PD-L1*) wurden sie dennoch mit in die Analyse eingeschlossen.

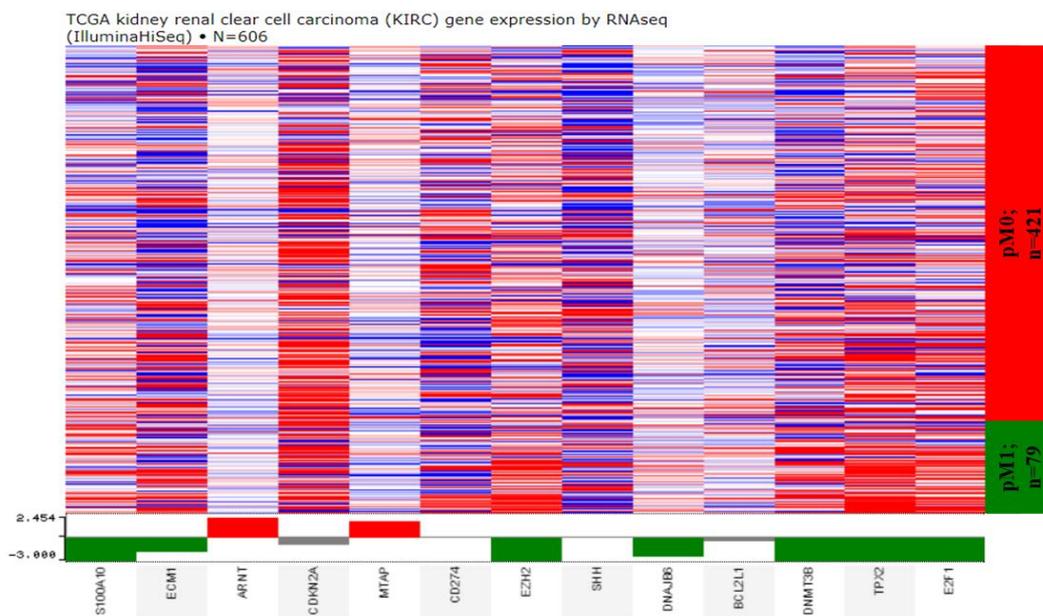


Abbildung 28 Deregulation der Genexpression zwischen pM1(grün) und pM0 (rot) der ausgewählten Gene in der TCGA-Kohorte

4.8.2 Messung der mRNA-Expression in primärem Nierentumorgewebe

Die Expression der 12 selektierten Gene wurde an 60 kryokonservierten Nierentumorgeweben (30 metastasiert, 30 nicht-metastasiert) bestimmt, die zuvor bereits genetisch untersucht wurden. Anhand von Verdünnungsreihen wurde zunächst die Effizienz der jeweils eingesetzten Primer bestimmt und in der Berechnung der Genexpression einkalkuliert. Die Expressionsunterschiede zwischen den metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren sind in den Box-Plots Abb. 30 sowie in Tabelle 36 dargestellt. Sechs der ausgewählten Gene (*ECM1*, *MTAP*, *PD-L1*, *DNAJB6*, *TPX2* und *E2F1*) wiesen keinen signifikanten Unterschied auf.

Tabelle 36 Signifikanzen und Fold-change der mRNA-Konzentration der deregulierten Gene in Nierentumorgeweben

Gen	p-Wert	Fold-change
Hochreguliert in metastasierten Nierentumoren		
<i>BCL2L1</i>	0,002	1,407
<i>HIF1β</i>	0,005	1,356
<i>S100A10</i>	<0,001	1,572
<i>EZH2</i>	0,005	1,724
<i>SHH</i>	0,001	2,264
Runterreguliert in metastasierten Nierentumoren		
<i>CDKN2A</i>	0,013	0,674

Von den 5 in metastasierten Tumoren hochregulierten Genen, wies *SHH* (Sonic Hedgehog) den größten Unterschied zur Expression im Gewebe der Tumore ohne Metastasenbildung auf (Fold-change= 2,264). Den deutlichsten Expressionsunterschied ($p < 0,001$) zeigte *S100A10*. Lediglich *CDKN2A* ist signifikant herunterreguliert ($p = 0,013$). In Gewebe von metastasierten Tumoren wird *CDKN2A* weniger stark exprimiert als in nicht-metastasierten Tumoren (Fold-change= 0,674).

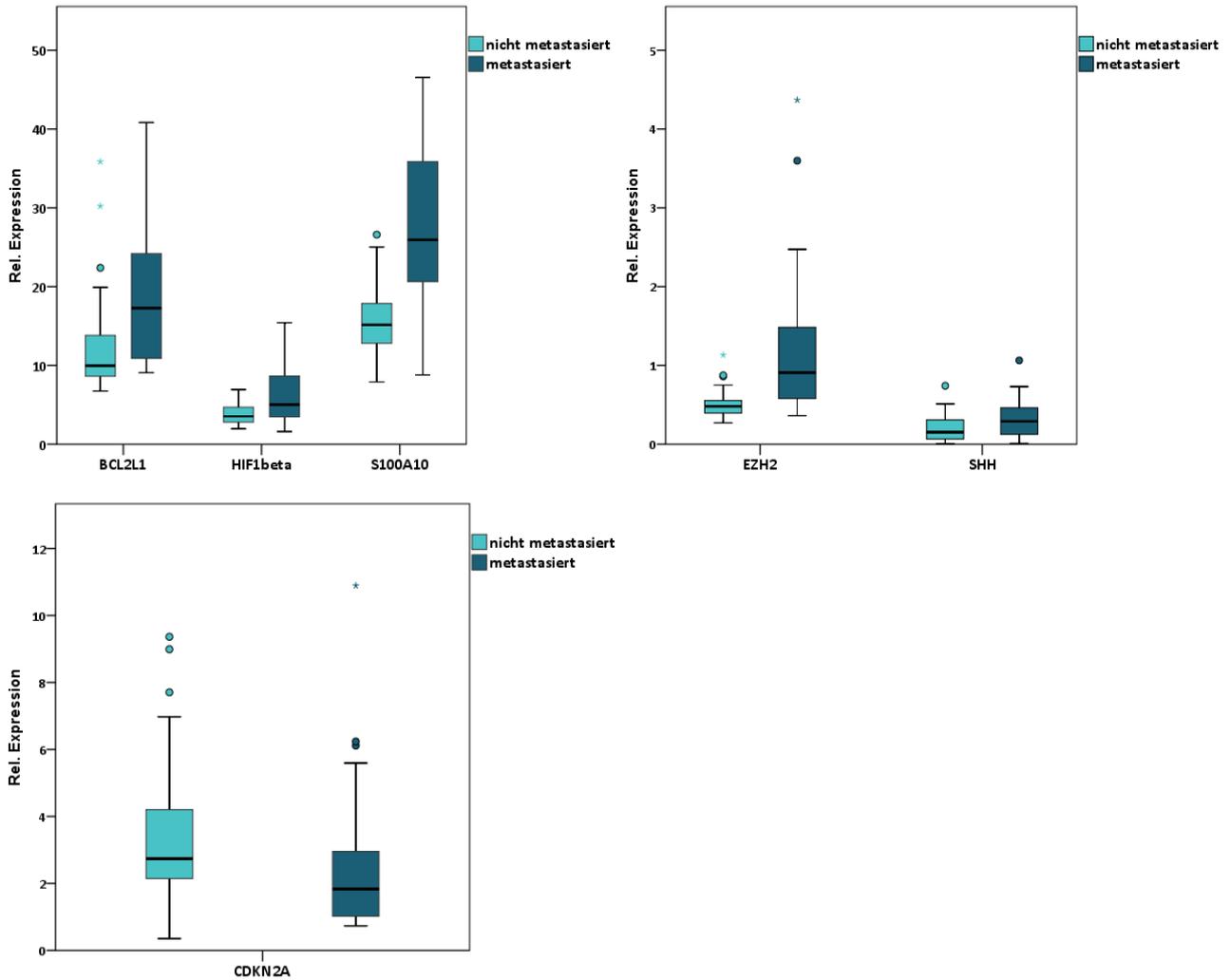


Abbildung 29 Unterschiede der mRNA-Expression von *BCL2-xL*, *HIF1 β* , *S100A10*, *EZH2*, *SHH* und *CDKN2A* in Geweben von metastasierten und nicht-metastasierten Nierentumoren

4.8.3 Korrelation der Genexpression zur genetischen Charakterisierung der Tumorgewebe

Da die selben Gewebeproben sowohl für die FISH- als auch die Genexpressionsanalysen verwendet wurden, war eine Korrelation der relativen Expressionsniveaus zu den Ergebnissen der genetischen Untersuchung möglich. Ziel dieser Analyse war es zu ermitteln, ob ein Zusammenhang zwischen fokalen Amplifikationen und Deletionen der Chromosomen und der Expression der auf ihnen befindlichen Gene besteht. Durch einen nicht-parametrischen Test wurden die gepaarten Proben analysiert.

Der Zugewinn der 1q21.3-Region korreliert signifikant mit einer erhöhten *S100A10*- ($p < 0,001$) und *HIF1 β* -Expression ($p = 0,039$). Zugewinne der Subtelomerregion 7q36.3 korrelieren mit einer signifikant höheren Expression des *EZH2*-Gens ($p = 0,012$), jedoch nicht mit der Expression von *SHH* ($p = 0,437$). Die *BCL-xL*-Expression korreliert signifikant mit

einem Zugewinn der 20q12 Region ($p = <0,001$) und der Verlust der 9p21.3-Region korreliert mit einer niedrigeren Expression von *CDKN2A* ($p = 0,009$; Tabelle 37 und Abb.31).

Tabelle 37 Korrelation der Genexpression zu den Ergebnissen der FISH-Analyse

Gen	p-Wert
<i>BCL2L1</i>	<0,001
<i>HIF1β</i>	0,039
<i>S100A10</i>	<0,001
<i>EZH2</i>	0,012
<i>SHH</i>	0,437
<i>CDKN2A</i>	0,009

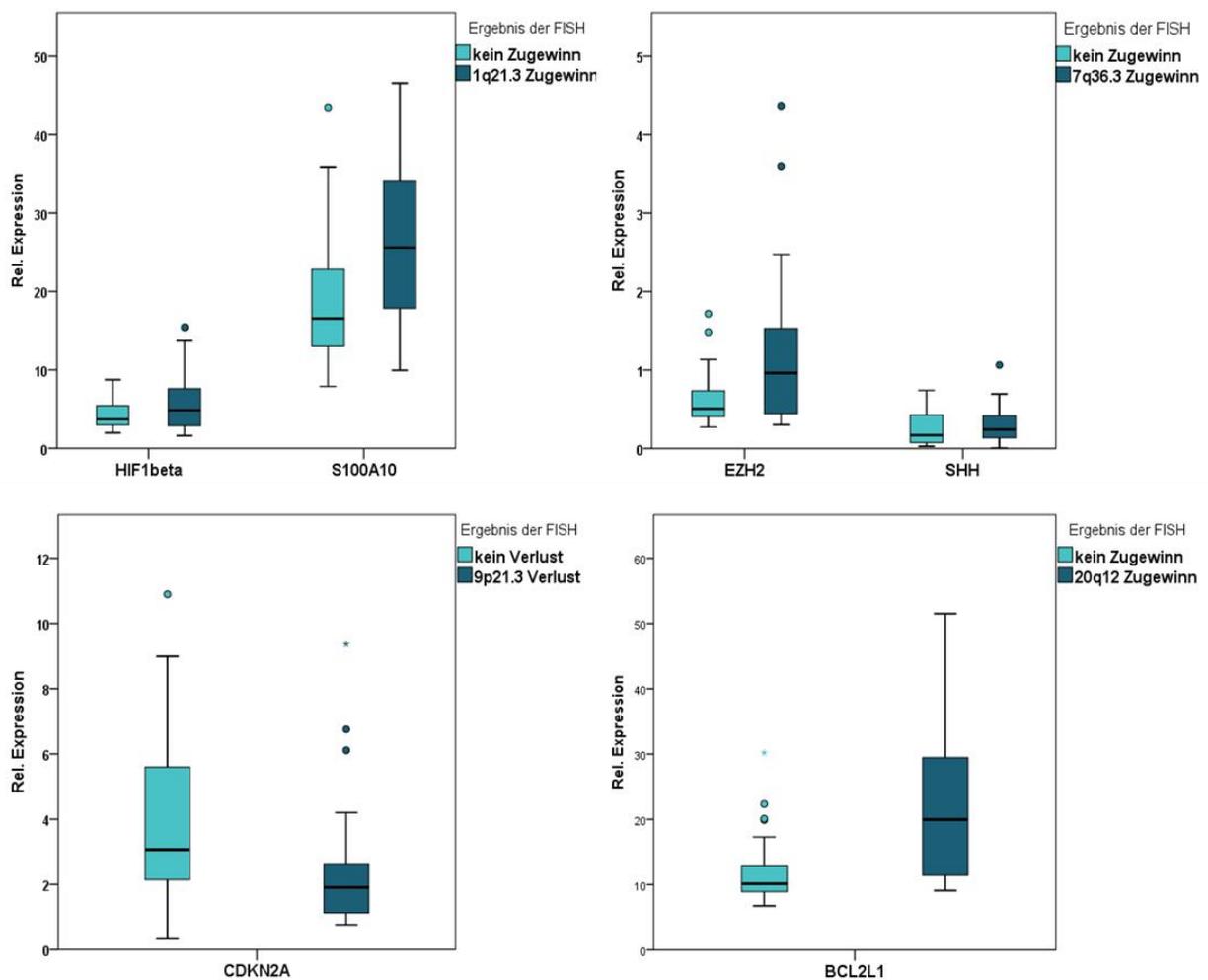


Abbildung 30 Unterschiede in der relativen Expression der untersuchten Gene in Korrelation zu den mittels FISH detektierten chromosomalen Aberrationen

4.8.4 Korrelation der mRNA-Expression zum tumorspezifischen Überleben und zur metachronen Metastasierung

Zur Untersuchung des Einflusses der deregulierten mRNA-Expression auf das Überleben der Patienten wurden zunächst Schwellenwerte ermittelt, anhand dieser die Proben in hoch und niedrig exprimierte Fälle unterteilt werden konnten. Dazu wurde die Kohorte in metastasierte und nicht-metastasierte Fälle unterteilt und der Mittelwert jeder berechnet. Daraus ergaben sich Unter- und Obergrenzen für jedes Gen. Der Mittelwert der M1-Expressionslevel abzüglich der zweifachen Standardabweichung (SD) ergab die Grenzwerte für die überexprimierten Gene. Für *CDKN2A* wurde die 2-fache SD zu dem Mittelwert aus den metastasierten Fällen addiert. Diese Cut-Off-Werte dienen der Einteilung in hohe beziehungsweise niedrige Expressionsniveaus. Tumorbedingt verstarben 14 Patienten in der Kohorte. In ebenfalls 14 Fällen kam es zu einer metachronen Metastasierung.

Tabelle 38 Korrelation des tumorspezifischen Überlebens und des progressionsfreien Überlebens zur Genexpression der signifikant deregulierten Gene

	Relative Expression (Cut-Off = Mittelwert aus Obergrenze – 2x SD)	Tumorbedingter Tod (Log-Rank)	Metachrone Metastasierung (Log- Rank)
<i>BCL-xL</i>	16	0,029	0,001
<i>HIF1β</i>	5	0,003	0,273
<i>S100A10</i>	24	3,3*10⁻⁵	1,8*10⁻⁵
<i>EZH2</i>	0,8	1,5*10⁻⁴	4*10⁻⁴
<i>SHH</i>	0,25	0,111	0,011
<i>CDKN2A</i>	3,2	0,651	0,268

Für 5 Gene zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zum tumorspezifischen Überleben und für 4 Gene eine signifikante Korrelation zur metachronen Metastasierung (Tabelle 38). Die beiden Gene *S100A10* und *EZH2* weisen für beide Untersuchungen die höchste Signifikanz auf und sind deshalb in Abb. 32 graphisch in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Durch die Verwendung der Genexpression mit den errechneten Schwellenwerten ist eine sehr gute Trennung der Gruppen mit prognostischer Aussagekraft möglich. Im Anschluss wurde eine univariate Cox-Regression für die Bestimmung der Hazard-Rate durchgeführt. Das Risiko einer metachronen Metastasierung steigt mit hoher *S100A10*-Expression um das 7,5-fache und

tumorbedingt zu versterben um das 8,4-fache (Tabelle 39). Weitere Werte sind in Tabelle 39 gelistet.

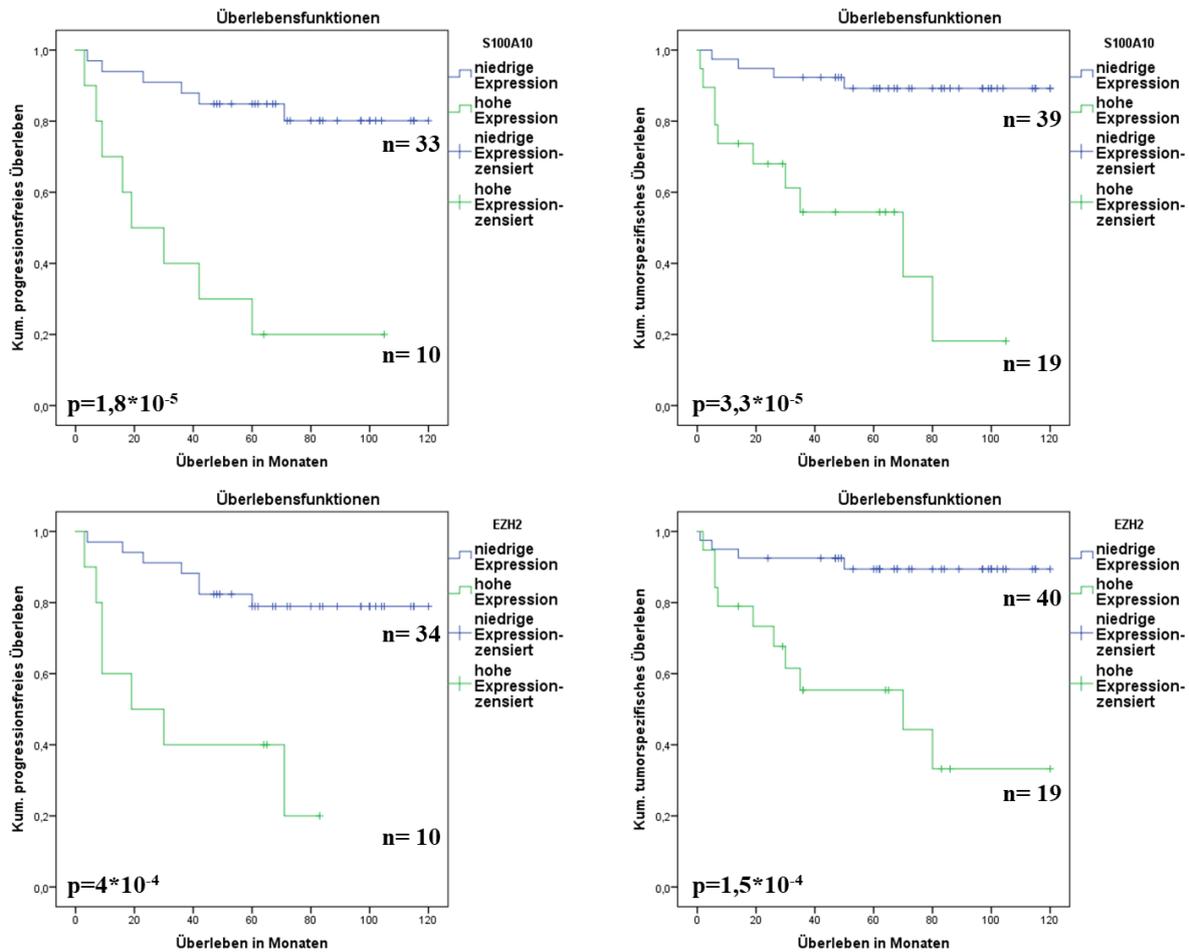


Abbildung 31 Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie und tumorspezifische Überleben nach Unterteilung anhand der S100A10 oder EZH2 Expressionslevel

Tabelle 39 Univariate Cox-Regression für das tumorspezifische und progressionsfreie Überleben bei signifikant deregulierter Genexpression

	Tumorbedingter Tod		Metachrone Metastasierung	
	p-Wert	Hazard-ratio (95% CI)	p-Wert	Hazard-ratio (95% CI)
<i>BCL-xL</i>	0,039	3,085 (1,06-8,976)	0,003	6,239 (1,897-20,511)
<i>HIF1β</i>	0,007	4,643 (1,517-14,211)	0,282	1,829 (0,609-5,498)
<i>S100A10</i>	$4,3 \cdot 10^{-4}$	8,421 (2,573-27,555)	$2,5 \cdot 10^{-4}$	7,574 (2,565-22,365)
<i>EZH2</i>	0,001	7,0 (2,178-22,527)	0,002	5,48 (1,899-15,813)
<i>SHH</i>	0,123	2,371 (0,792-7,1)	0,019	4,02 (1,257-12,854)
<i>CDKN2A</i>	0,352	0,769 (0,245-2,415)	0,28	0,494 (0,138-1,773)

4.8.5 Korrelation der mRNA Deregulation der TCGA-Kohorte zum Überleben

Die mRNA-Sequenzierungsdaten der TCGA-Kohorte bestehend aus 537 Fällen, wurde für eine externe Validierung der Überlebensanalysen verwendet. Die Auswertung erfolgte auf der Online-Plattform des cBio Cancer Genomics Portal (<http://www.cbioportal.org>). Von den Tumoren lagen in 534 Fällen mRNA-Sequenzierungsdaten vor. Insgesamt wurde in 126 Patienten ein Progress festgestellt und 165 Patienten verstarben im Beobachtungszeitraum. Die 12 ursprünglich ausgewählten Gene wurden mit dem Überleben der Patienten und dem Auftreten einer Progression korreliert. Von den untersuchten Genen waren *ARNT*, *SHH*, *BCL-xL* und *E2F1* nicht signifikant mit dem Überleben oder einem Progress in den Kaplan-Meier-Analysen korreliert. Alle anderen Gene wiesen unterschiedlich signifikante Übereinstimmungen auf. Die Gene waren im Kollektiv unterschiedlich häufig verändert. Die häufigste Veränderung wurde als mRNA-Hoch- bzw. Herunterregulierung beschrieben und trat bei *EZH2*, *CDKN2A* und *DNAJB6* mit 10% am öftesten auf. Punktmutationen, die zu missense- oder nonsense-Veränderungen führen wurden nicht oder sehr selten (<0,01%) detektiert. Die Ergebnisse der Log-Rank Tests sind in Tabelle 40 zusammengefasst.

Tabelle 40 Kaplan-Meier-Analysen zum Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben bei deregulierter Genexpression in der TCGA Kohorte

	Expression verändert in %	Überleben (log rank)	Progress (log rank)
<i>S100A10</i>	6	0,00261	0,0251
<i>EZH2</i>	10	7,55*10⁻⁸	0,00315
<i>CDKN2A</i>	10	2,58*10⁻⁸	4,3*10⁻⁵
<i>ECM1</i>	5	3,4*10⁻⁴	0,00106
<i>MTAP</i>	8	1,7*10⁻⁴	0,0297
<i>PD-L1</i>	4	0,0169	0,968
<i>DNAJB6</i>	10	0,0129	0,0014
<i>TPX2</i>	5	1,7*10⁻⁸	0,0049

Eine Hochregulierung von *S100A10*, *EZH2*, *ECM1*, *PD-L1*, *DNAJB6* und *TPX2* sowie Herunterregulation von *CDKN2A* und *MTAP* korrelieren in der Analyse der TCGA-Daten signifikant mit dem Überleben und einer Progression (ausgenommen *PD-L1*). Direkte Korrelationen zum Metastasierungsstatus waren anhand dieser Daten nicht möglich.

Sechs der 12 untersuchten Gene, nämlich *ARNT*, *CDKN2A*, *EZH2*, *SHH*, *BCL-xL* und *E2F1*, können trotz ihrer sehr unterschiedlichen Funktionen in einem zusammenhängenden Netzwerk dargestellt werden (Abb. 33). Zentrale Punkte dieses Netzwerks sind *AKT1*, *TP53*, *CDKN2A* und β -Catenin (*CTNNB1*).

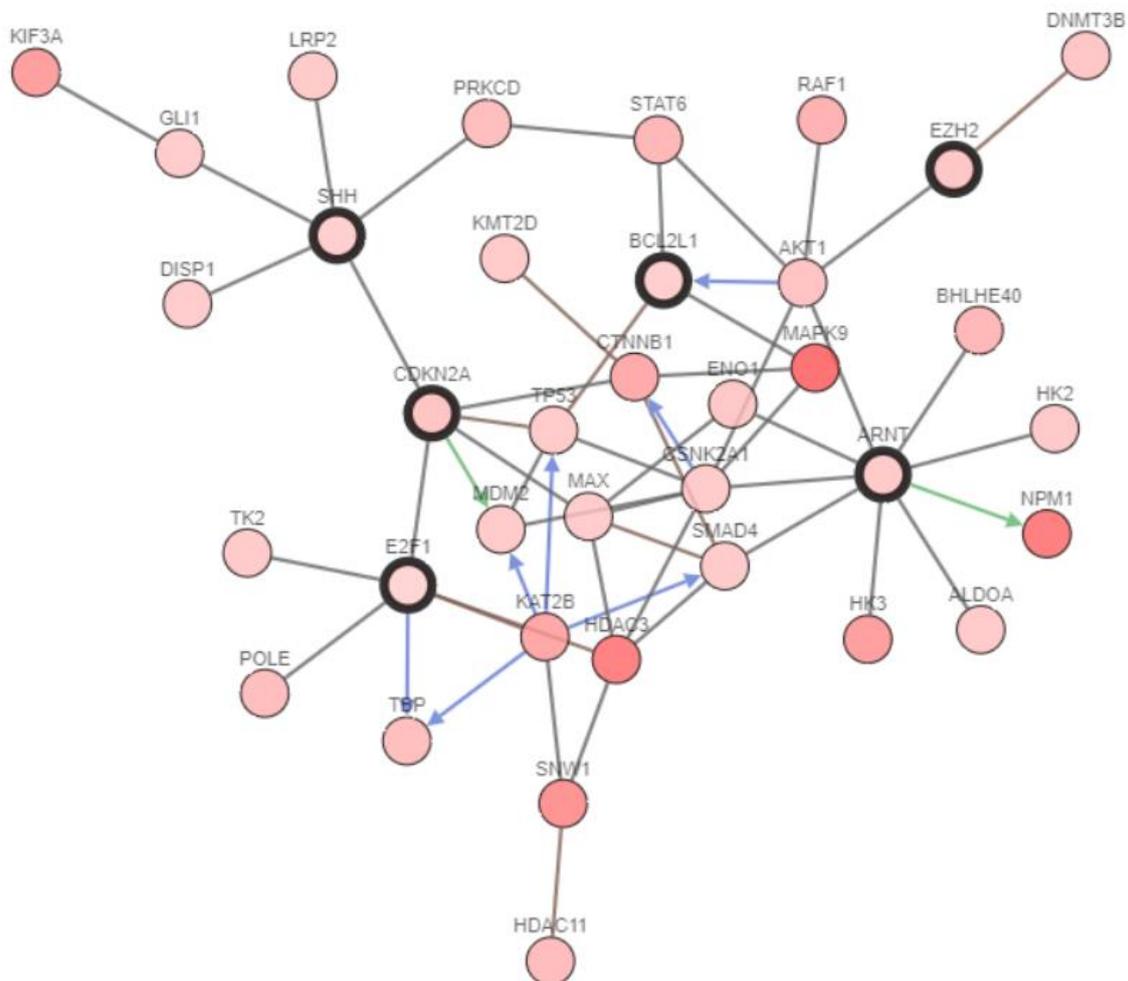


Abbildung 32 Netzwerkdarstellung der Gene *EZH2*, *CDKN2A*, *SHH*, *BCL-xL*, *ARNT* und *E2F1* im kNZK

4.9 Funktionelle Analysen

4.9.1 Transiente Inhibierung der Genexpression in Zelllinien

Durch die transiente Inhibierung mittels siRNA sollte der Einfluss von *EZH2* und *BCL-xL* auf den Metastasierungsprozess in Zelllinien untersucht werden. Die Transfektion wurde über 48h vollzogen bevor die funktionellen Analysen durchgeführt wurden.

Um die Effizienz der Transfektion zu ermitteln, wurde die Expression der *EZH2* und *BCL-xL* mRNA in den Nierenkarzinomzelllinien Caki2 und 786-O mittels qRT-PCR gemessen. Die Expression von *BCL-xL* war in Caki2-Zellen höher als in 786-O-Zellen. 786-O-Zellen

exprimieren mehr *EZH2* als Caki2-Zellen (Abb. 34). Die Transfektion führte in beiden Zelllinien für beide Gene zu einer signifikant niedrigeren mRNA-Expression (Abb. 34 und Tabelle 41). Durch die siRNA wurde eine Runterregulierung der Genexpression in 786-O-Zellen um das fast 3,9fache für *EZH2* und das 3,6-fache für *BCL-xL* erreicht. In den Caki2-Zellen wurde die Expression der beiden Gene um das etwa 3-fache reduziert.

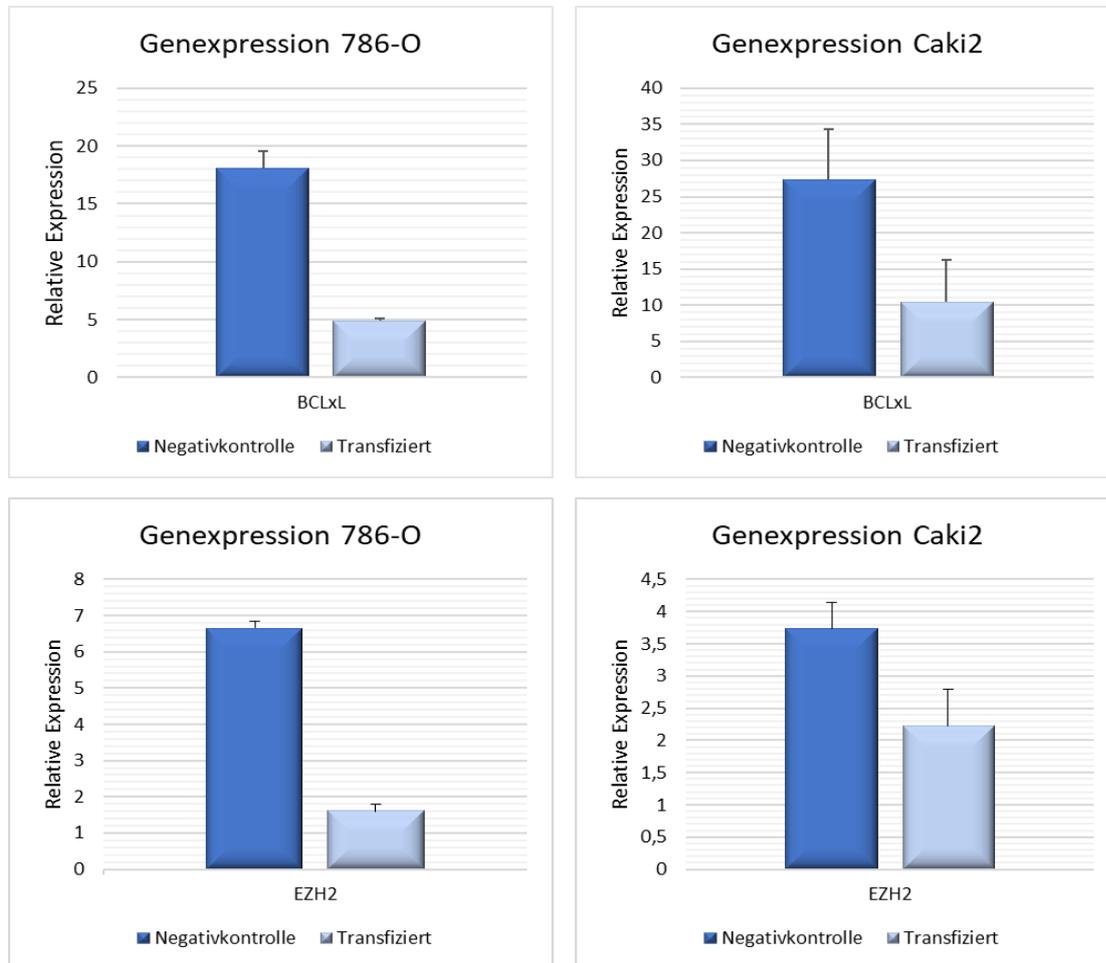


Abbildung 33 Relative Genexpression von *EZH2* und *BCL-xL* in Mock- und mit siRNA transfizierten Caki2 und 786-O-Zellen

Tabelle 41 Signifikanzen (t-Test) und Fold-changes der siRNA-transfizierten Zelllinien im Vergleich zum Mock (Negativkontrolle)

Transfizierte siRNA	Zelllinie (p-Wert nach t-Test)		Fold-change (Mittelwert)	
	786-O	Caki-2	786-O	Caki-2
siEZH2	5*10⁻⁵	0,005	-3,896	-3,03
siBCL-xL	1,6*10⁻⁶	7,6*10⁻⁷	-3,638	-3,05

4.9.2 Proliferation

Nachdem die Reduktion der mRNA-Expression der beiden Gene durch die siRNA-Transfektion nachgewiesen werden konnte, wurden Analysen zum Einfluss der verminderten Expression auf das Proliferations- und Migrationsverhalten sowie die Apoptose durchgeführt.

Die Proliferation wurde, nach Bestimmung der optimalen Zellzahl mittels Wachstumskurven, mit dem Real-Time-Cell-Analyzer (RTCA) gemessen. Die Adhäsionsphase von 4h wurde berücksichtigt und vom Zellindex der jeweiligen Zeitpunkte der Proliferationsmessung subtrahiert.

Für siBCL-xL-transfizierte Zellen konnten keine Proliferations- und Migrationsversuche durchgeführt werden, da durch die RNA-Interferenz Apoptose in den Zellen induziert wird (siehe Kapitel 5.9.4).

Nach 24h ist die Proliferation in 786-O-Zellen im Mittel um 21% höher in den transfizierten Zellen als in den Kontrollzellen, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Zum Zeitpunkt $t=48h$ ist kein Unterschied mehr feststellbar (Tabelle 42).

In transfizierten Caki2-Zellen ist die Proliferation nach 24h um 24% gesteigert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Nach 48h betrug dieser Wert 4,7%. Für beide Zeitpunkte wurde das Signifikanzniveau ($p=0,05$) nicht erreicht (Tabelle 42).

Graphisch dargestellt ist die Messung der Proliferation in Abbildung 35.

Tabelle 42 Auswertung des Einflusses der Transfektion auf die Proliferation in 786-O und Caki2-Zelllinien

Zeitpunkt der Proliferationsmessung	Zelllinie (p-wert nach Mann-Whitney-U-Test)	
siEZH2 transfiziert	786-O	Caki-2
24h	0,455	0,051
48h	0,652	0,315

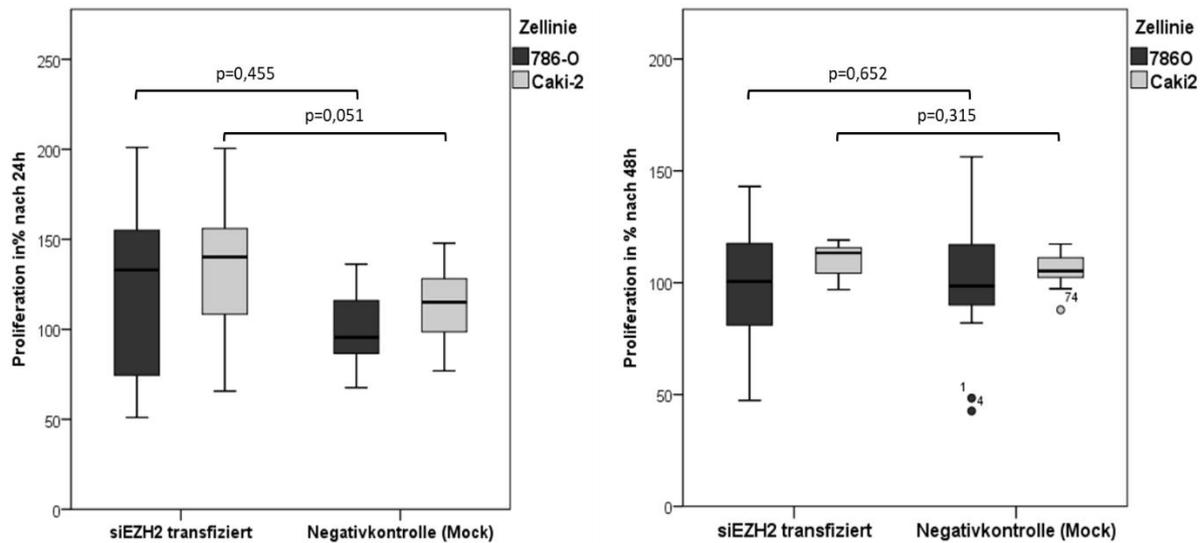


Abbildung 34 Proliferationsrate nach 24h und 48h in transfizierten 786-O und Caki2-Zellen sowie in den Negativkontrollen

4.9.3 Migration

Die Migration wurde in siEZH2-transfizierten Zellen der Zelllinien 786-O und Caki2 nach 10h und 24h gemessen. Die Migrationsrate ist sowohl nach 10h als auch nach 24h in den transfizierten 786-O-Zellen um etwa 50% im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant gesteigert (Abb. 36, Tabelle 43).

In Caki2-Zellen wird durch siRNA-Transfektion eine Steigerung der Migrationsrate um ca. 20% induziert (Abb. 36). Diese Veränderung ist jedoch nicht signifikant.

Tabelle 43 Auswertung des Einflusses der Transfektion auf die Migration der 786-O und Caki2-Zelllinien

Zeitpunkt der Migrationsmessung	Zelllinie	
	786-O	Caki-2
siEZH2 transfiziert		
10h	0,008	0,089
24h	0,01	0,089

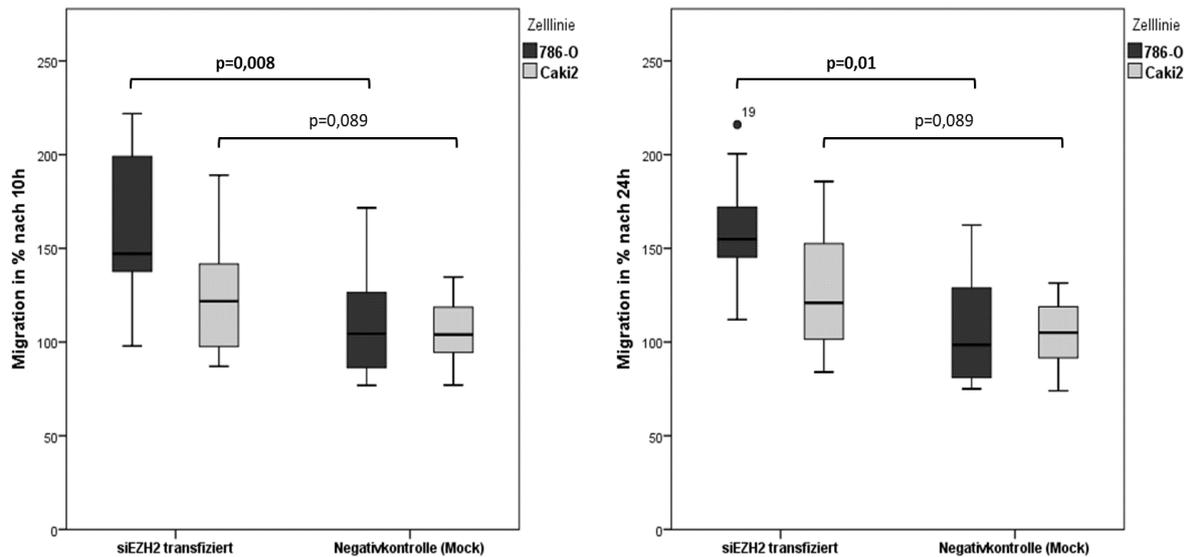


Abbildung 35 Migrationsrate siRNA-transfizierten 7680- und Caki2-Zelllinien sowie der Mock-Zellen

4.9.4 Apoptose

Da die Transfektion mit spezifischer *BCL-xL*-siRNA zum Absterben der Zellen führte, wurden Apoptose-Assays durchgeführt, um zu überprüfen, ob durch die Herunterregulierung von *BCL-xL* Apoptose in den Zellen induziert wird.

In einem ersten Schritt wurde das ELISA-Cell-death-kit verwendet um photometrisch die Induktion der Apoptose zu messen. Als Kontrolle wurden die Negativkontrolle (Mock), die siEZH2-transfizierten Zellen sowie Zellen, welche mit spezifischer *SEPT9* siRNA transfiziert wurden, verwendet. *SEPT9* wurde als Negativkontrolle mitgeführt, da aus Versuchen von Beatrice Stubendorff bekannt war, dass durch die transiente Inhibierung der *SEPT9*-Expression keine Apoptose in den Zellen induziert wurde (Stubendorff, 2014).

Im Vergleich zu den Mock-Zellen, welche zur Normierung dienten, wird durch Transfektion der Zellen mit siBCL-xL die Apoptose im Mittel um 40% gesteigert. Zellen, welche mit siEZH2-transfiziert wurden, wiesen keine Steigerung der Apoptoseaktivität auf. Selbiges gilt für Zellen, welche mit siSEPT9 transfiziert wurden (Abb. 37).

Für eine aussagekräftige statistische Analyse konnten mit diesem Assay nicht genügend Ansätze analysiert werden, weshalb auf ein Caspase3/7-Assay umgestiegen wurde.

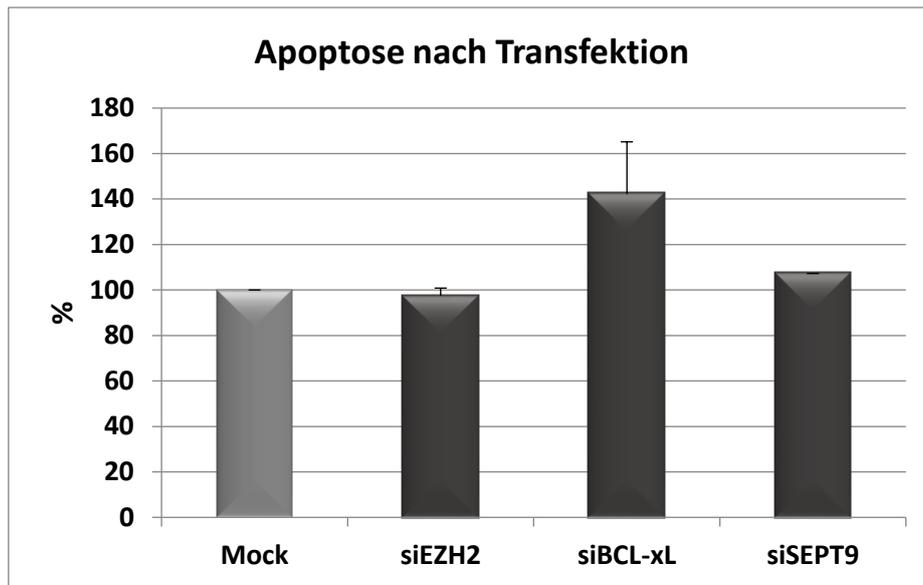


Abbildung 36 Apoptoserate nach Transfektion mit siRNAs in 786-O Zellen

Für das Caspase3/7-Assay wurden $1 \cdot 10^4$ Caki-2-Zellen und $5 \cdot 10^4$ 786-O-Zellen verwendet. Auch durch die fluorimetrische Bestimmung der Caspaseaktivität wurde eine um durchschnittlich 42% erhöhte Apoptose in siBCL-xL-transfizierten 786-O-Zellen gemessen (Abb. 38). Der Unterschied zum Mock ist dabei signifikant ($p=0,0023$).

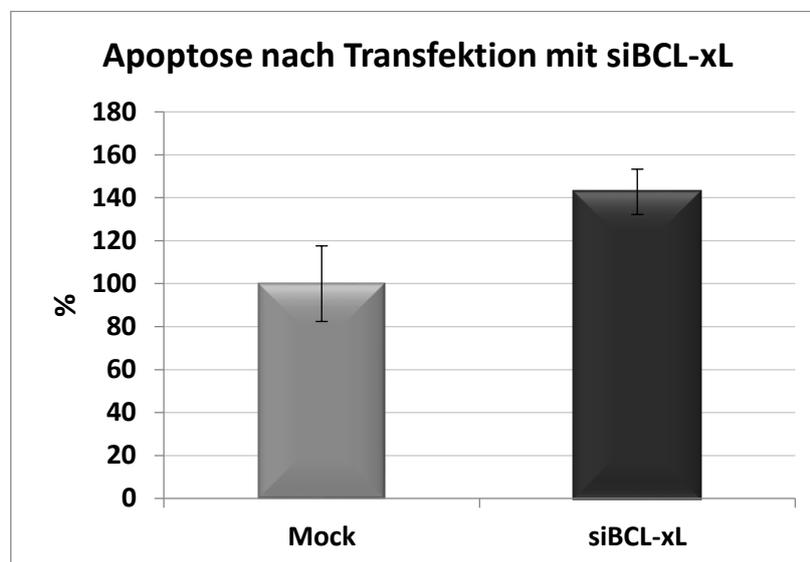


Abbildung 37 Apoptoserate nach Transfektion mit BCL-xL-siRNA in 786-O Zellen

Durch das fluorimetrische Caspase-Assay war es möglich, die Caspaseaktivität im zeitlichen Verlauf zu messen. Als Positivkontrolle wurden Zellen 30min mit 2,5% DMSO behandelt, da die Zytotoxizität dieses Stoffes bekannt ist. Abbildung 39 zeigt den Verlauf der gemessenen Caspaseaktivität in 786-O-(A) und Caki-2-(B)-Zellen über einen Zeitraum von 18h. Die

Caspaseaktivität nimmt zu Beginn der Messung in beiden Zelllinien noch zu, flacht im Verlauf der Messung dann aber ab.

In 786-O-(A)-Zellen wird durch Transfektion mit *BCL-xL*-siRNA durchschnittlich eine um 34% gegenüber dem Mock erhöhte Caspaseaktivität gemessen, was eine signifikante Steigerung der Apoptose in den transfizierten Zellen widerspiegelt ($p=0,025$). Die Caspaseaktivität bleibt über den gesamten Zeitraum erhöht. DMSO induziert eine Caspaseaktivität von durchschnittlich 48% in 786-O-Zellen und ist somit als Positivkontrolle geeignet.

In Caki-2-Zellen wird durch siBCL-xL-Transfektion durchschnittlich eine Steigerung der Caspaseaktivität um 17% erreicht. Die Aktivität bleibt über den Zeitraum von 18h messbar, jedoch ist der Unterschied zu den Mock transfizierten Zellen nicht signifikant ($p=0,06$). Durch DMSO (2,5%) wird eine signifikante Caspaseaktivitätssteigerung von durchschnittlich 34% erreicht. Eine Induktion von Apoptoseaktivität durch Zellen, welche mit siEZH2 transfiziert wurden, ist nicht feststellbar.

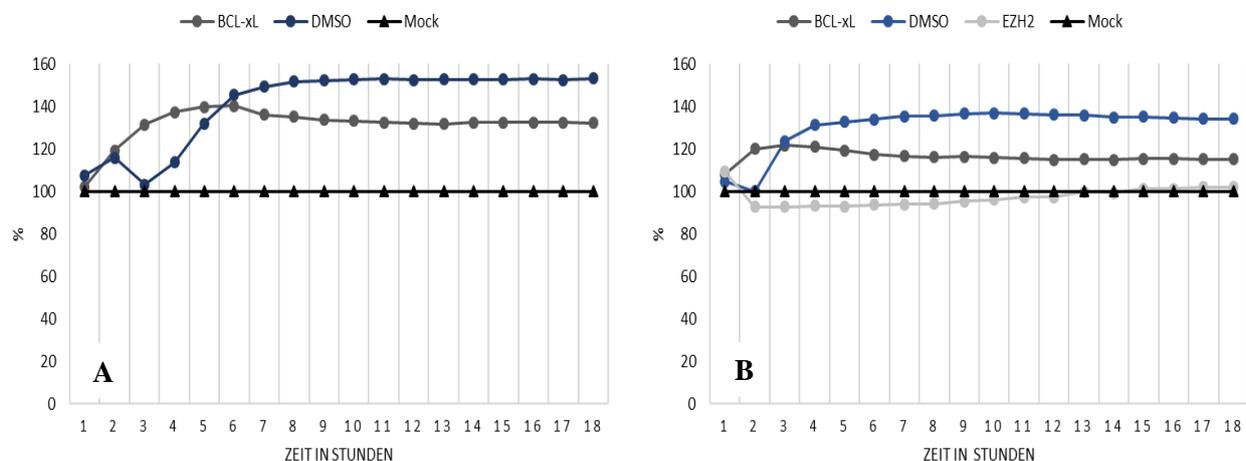


Abbildung 38 Apoptoserate nach Transfektion mit *BCL-xL* und *EZH2* siRNA in A: 786-O und B: Caki-2-Zellen; DMSO 2,5% als Positivkontrolle, Mock als Negativkontrolle

5. Diskussion

Die Metastasierung ist für das kNZK der wichtigste Prognosefaktor. Welche genetischen Aberrationen den Prozess der Metastasierung einleiten oder vorantreiben konnte bisher nicht geklärt werden. Eine Identifikation der beteiligten chromosomalen Regionen, Gene oder Signalwege würde zu einer Verbesserung der Prognosestellung, der Nachsorge und der Therapiemöglichkeiten führen. Chromosomale Schäden, die in Form von Kopienzahlveränderungen, Translokationen oder Chromosome-Shattering auftreten, tragen einen großen Teil zur chromosomalen Instabilität und folglich zu gesteigerten Mutationsraten in Tumoren bei. Dabei können Tumorsuppressorgene durch Deletionen ausgeschaltet oder Onkogene durch Amplifikationen oder durch die Entstehung von Fusionsproteinen bei Translokationen aktiviert werden (Bayani et al., 2007). Durch die Häufung genetischer und molekularer Veränderungen nimmt die Aggressivität der Tumorzellen zu. In Arbeiten von Sanjmyatav et al. wurden durch aCGH-Analysen metastasierter und nicht metastasierter Tumore chromosomale Veränderungen identifiziert, welche die Überlebensdauer und das Metastasierungsrisiko der Patienten widerspiegeln. Die Regionen 1q21.3, 7q36.3, 9p21.3 und 20q11-q12 konnten in weiterführenden Analysen mittels FISH an einem retrospektiven Kollektiv bestätigt und ein prognostischer Score bestehend aus der Anzahl an spezifischen Veränderungen in kNZKs erstellt werden. In der vorliegenden Arbeit sollten diese Ergebnisse zunächst an einer unabhängigen Kohorte validiert werden. Im Anschluss sollte das Verfahren auf in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten etabliert werden, um die Anwendbarkeit in der Routinediagnostik zu ermöglichen. Zudem sollten potentiell metastasierungsassoziierte Gene aus den untersuchten Regionen identifiziert und deren Expressionsunterschiede im Gewebe nachgewiesen werden.

5.1 Methodik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die meisten chromosomalen Aberrationen entstehen durch mangelhafte Reparatur von Chromosomenbrüchen, durch fehlerhafte Rekombination oder durch Fehlsegregation der Chromosomen während der Mitose oder Meiose. Chromosomale Veränderungen können somatisch oder in der Keimbahn verankert sein. Es gibt hauptsächlich 2 Arten von Veränderungen - numerische und strukturelle (Bayani et al., 2007). In Tumorzellen tritt häufig extreme Aneuploidie mit vielfältigen Verlusten und Zugewinnen auf. Je nachdem in welcher Phase des Zellzyklus die Brüche auftreten sind entweder ein oder beide Chromatiden betroffen. Wenn diese Brüche inkorrekt repariert werden, kommt es zu Deletionen, Inversionen, Translokationen, Duplikationen oder zur Bildung von Ringchromosomen (Strachan and Read, 2011). Durch die FISH können je nach verwendeten Sonden numerische Aberrationen oder

Translokationen nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden numerische Veränderungen einzelner spezifischer Chromosomenregionen untersucht. Dazu ist es wichtig eine geeignete Kontrollsonde mitzuführen, die verlässliche Aussagen über die Ploidie der Zellen angibt. Hierfür wurde eine Mikrosatellitensonde für Chromosom 2 verwendet, welche an die repetitiven Sequenzen des Zentromerbereichs bindet. Ausgewählt wurde diese Kontrollsonde ausgehend von den Ergebnissen der vorangegangenen aCGH-Analyse (Sanjmyatav et al., 2011a), in welcher gezeigt werden konnte, dass beim Vergleich von metastasierten mit nicht metastasierten Primärtumoren das Chromosom 2 am seltensten verändert ist. Der Vorteil der FISH im Vergleich zur aCGH (Weiss et al., 1999), aber auch im Vergleich zur PCR oder zu Microarrays, besteht darin, dass Veränderungen auf Einzellzebene beobachtet werden können und nicht nur die im untersuchten Bereich absolut häufigsten Kopienzahlveränderungen oder Genexpressionsunterschiede nachgewiesen werden. Durch die Verwendung von Schwellenwerten zur Dichotomisierung der Ergebnisse, welche anhand der klinischen Verläufe der Patienten bestimmt werden, können relevante chromosomale Veränderungen auch dann erkannt werden, wenn nur 15-20% der Tumorzellen des untersuchten Areals diese Veränderungen aufweisen. Durch die vergleichsweise hohe Sensitivität dieser Methode, wird die FISH seit Jahren in der Diagnostik eingesetzt (Caraway et al., 2010; Chyhai et al., 2010; Gowrishankar et al., 2014) und kann für die Prognoseeinschätzung verwendet werden (Bayani and Squire, 2007; Pestova et al., 2018). Da die Interphase-FISH (I-FISH) auch auf eingebettetem, geschnittenem Gewebe durchgeführt werden kann, ist es möglich einen hohen Durchsatz an Proben durch die Verwendung von TMAs zu erlangen. Außerdem ist es dadurch möglich die Zellkerne im Gewebeverband zu untersuchen und die Tumorzellen klar von infiltrierenden Immunzellen oder normalen Zellen abzugrenzen (Bayani et al., 2007).

5.1.1 Validierung des TNSA-Scores an kryokonserviertem Gewebe (Kohorte 1)

Kohorte 1 diente der Validierung der prognostischen Wertigkeit der einzelnen aberranten Regionen und des TNSA-Scores. Dazu wurde ein unabhängiges Patientenkollektiv aus Homburg verwendet, dessen Tumore als kryokonservierte Gewebeproben vorlagen. Das Protokoll sowie die errechneten Cut-Off-Werte von Sanjmyatav et al., 2014 für die FISH wurden übernommen. Dadurch konnte überprüft werden, ob die errechneten Schwellenwerte für die Dichotomisierung auf andere Patientenkohorten übertragbar sind. Dieser Schritt ist wichtig, um die datengesteuerte Ermittlung der Schwellenwerte, wie sie bei der ROC-Kurven-Analyse durchgeführt wird, zu validieren und Richtlinien vorzugeben, anhand derer eine Einschätzung der Tumore im Rahmen einer pathologischen Untersuchung möglich ist. Die

Verwendung der vorgegebenen Cut-Off-Werte führte zur hochsignifikanten Korrelation der einzelnen chromosomalen Regionen mit dem M-Status der Patienten. Damit wurden die einzelnen CNVs in ihrer prognostischen Aussagekraft und die verwendeten Schwellenwerte validiert. Im Unterschied zu den von Sanjmyatav et al. 2014 publizierten Daten ist in Kohorte 1 ein Zugewinn der Region 1q21.3 mit dem größten Metastasierungsrisiko verbunden. Bei Sanjmyatav war dies die Region 20q11.21q12, welche in der aktuellen Validierung an zweiter Stelle (bezogen auf den p-Wert) auftauchte. Alle Aberrationen wurden häufiger in metastasierten als in nicht-metastasierten Tumoren gefunden. Dies entspricht der Annahme, dass die Akkumulation von genetischen Veränderungen zu einer erhöhten Aggressivität der Tumore führt (Elfving et al., 1997). Die Häufigkeit der Detektion einer Aberration ist maßgeblich an die verwendeten Cut-Off-Werte, das Patientenkollektiv und die Methode gebunden, weshalb ein Vergleich dieser Werte mit publizierten Angaben schwierig ist.

Ein Verlust der 9p21.3-Region war die häufigste Aberration und wurde auch in 52% der nicht-metastasierten Tumore nachgewiesen. In der Literatur wird eine Deletion des kurzen Armes von Chromosom 9 häufig im Zusammenhang mit dem Auftreten von Metastasen (Gunawan et al., 2001; Klatte et al., 2009b; La Rochelle et al., 2010; Moch et al., 1996) oder einem verkürzten Überleben beschrieben (Brunelli et al., 2007; Schraml et al., 2001). Bissig et al. zeigten, dass ein 9p-Verlust in Metastasen häufiger zu finden ist als in den zugehörigen Primärtumoren (Bissig et al., 1999). Diese Beobachtungen weisen auf eine wichtige Funktion dieses Lokus im Metastasierungsprozess hin. Auch in multivariaten Modellen, welche weitere chromosomale Veränderungen sowie klinisch-pathologische Faktoren mit einschlossen, wurde der 9p-Verlust als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert (Köhn et al., 2015). Ein Zugewinn von 7q war mit insgesamt 45% die zweithäufigste chromosomale Veränderung der Kohorte 1. Sato et al. fanden Amplifikationen von 7q in 41% ihrer Kohorte, konnten diese jedoch nicht mit dem Überleben korrelieren. Aus dem Prostatakarzinom (Alcaraz et al., 1994), dem Plattenepithelkarzinom der Lunge (Boelens et al., 2009) sowie dem Magenkarzinom (Morohara et al., 2005) ist bekannt, dass Zugewinne des langen Arms von Chromosom 7 mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Morohara et al. zeigten, dass speziell die Region 7q36 mit dem Auftreten peritonealer Metastasen korreliert und dass auch Zugewinne der Chromosomenarme 1q und 20q12 in metastasierten Primärtumoren häufiger, jedoch nicht signifikant vermehrt, zu finden sind als in nicht metastasierten Tumoren. Zugewinne der Region 1q21 waren im Nierenzellkarzinom bei Gronwald et al. signifikant häufiger in Metastasen als in ihren Primärtumoren zu finden (Gronwald et al., 1997). Wie auch in der Arbeit von Bissig et al. weist diese Häufung von Aberrationen in Metastasen darauf hin, dass dieser Lokus in der

Metastasierungskaskade eine wichtige Rolle spielt. Zugewinne des Chromosomenarms 20q sind als negativer prognostischer Faktor im Kolorektal- und Magenkarzinom beschrieben (Kimura et al., 2004; Korn et al., 1999). Die Assoziation der CNVs mit dem Auftreten von Fernmetastasen legt nahe, dass sie auch einen Einfluss auf das Überleben haben. In einer Vielzahl an Studien wurden alle vier aberranten Chromosome mit einem verkürzten Überleben korreliert (Arai et al., 2008; Girgis et al., 2012; Klatter et al., 2009b; Köhn et al., 2015; Monzon et al., 2011; Sanjmyatav et al., 2011a). Vor allem Verluste der 9p-Region fielen dabei in unterschiedlichen Entitäten auf. Zuletzt publizierten Turajlic et al. eine umfassende Analyse zum evolutionären Prozess der Metastasierung. Durch die Untersuchung mehrerer Tumorproben mit zugehörigen Metastasen pro Patient konnten sie jene Veränderungen identifizieren, welche die Progression vorantreiben. Dabei erwies sich ein Verlust des 9p-Arms als wichtigster prognostischer Faktor. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an somatischen Kopienzahlveränderungen mit einer Fernmetastasierung assoziiert sind, nicht jedoch die aus den Next-Generation-Sequencing-Daten (NGS) errechnete Mutationslast der Tumore (Turajlic et al., 2018).

Die Kombination der 4 spezifischen chromosomalen Aberrationen zum TNSA-Wert lieferte in der Kohorte der Universität Jena eine noch spezifischere Korrelation zum M-Status der Patienten als die einzelnen CNVs für sich (Sanjmyatav et al., 2014). Anhand der Kohorte 1 konnte der TNSA-Wert somit extern validiert werden. In der vorliegenden Arbeit vergrößert sich die AUC bei der ROC-Kurven-Analyse unter Verwendung des TNSA auf 0,867 und zeigt einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl an Aberrationen der untersuchten Loci und der Metastasierung. Dass eine Kombination chromosomaler Veränderungen eine verbesserte Vorhersage ermöglicht als die Verwendung einzelner CNVs, belegten auch Presti et al. durch Verknüpfung eines 8p und 9p-LOH, wodurch die Rezidivwahrscheinlichkeit besser eingeschätzt werden konnte (Presti et al., 2002).

Zum Vergleich des TNSA mit gängigen prognostischen Faktoren wurden uni- und multivariate logistische Regressionsanalysen durchgeführt. Der Lymphknotenstatus wurde aufgrund der geringen Anzahl an Fällen, bei denen eine Lymphadenektomie durchgeführt wurde, von der Auswertung ausgeschlossen. Für binär logistische Regressionen ist es wichtig, eine entsprechende Anzahl an Fällen für jede Variable in die Auswertung miteinschließen zu können (Peduzzi et al., 1996). Gibt es für jede Ausprägung der einzelnen Variablen weniger als 10 Fälle, so wird die Analyse ungenau. Aus diesem Grund werden für die T-Kategorie pT4 sowie das Fuhrman-Grading G4 in den Regressionsanalysen keine signifikanten P-Werte ausgegeben

($p=0,999$), obwohl bekannt ist, dass beide Parameter mit einer schlechten Prognose korrelieren (Edge and Compton, 2010; Ficarra et al., 2005). Anhand eines größeren Kollektivs könnten einige Beobachtungen demzufolge sicherer geklärt werden. Im Falle des Fuhrman-Gradings ergab sich für Kohorte 1 kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Metastasierung und der nukleären Graduierung der Tumore. Mit einer ausreichend großen Anzahl an Fällen für die einzelnen Gruppen (G1-G4) wäre es denkbar, dass ein signifikanter Wert in den Analysen erreicht wird. Das hier verwendete Fuhrman-Grading wurde zwischenzeitlich vom WHO-ISUP-Grading abgelöst. Die Kritik am Fuhrman-Grading bezieht sich hauptsächlich auf die nur moderate Intra- und Inter-Beobachter-Reproduzierbarkeit (Delahunt et al., 2013), aber auch darauf, dass trotz der 4-stufigen Einteilung nur zwei prognostisch relevante Gruppen (G1+G2 vs. G3+G4) durch die Graduierung ableitbar sind (Samaratunga et al., 2014) und dass das Fuhrman-Grading in bis zu 20% der kNZK-Fälle keine klare Einteilung erlaubt (Dagher et al., 2017). Die Verwendung des neuen WHO-ISUP-Gradings könnte zu besseren Ergebnissen führen. Bei der Untersuchung retrospektiver Kohorten muss deshalb immer beachtet werden, dass die Vorgaben für das Staging und Grading innerhalb der letzten Dekaden mehrmals geändert wurden und die Einteilung in das TNM-System oder das Grading nicht unbedingt den heutigen Standards entsprechen. Dies kann erklären, weshalb Untersuchungen dieser Parameter nicht den erhofften Effekt in den Regressionsanalysen aufweisen. In den vorliegenden Kohorten wurden die Tumore nach der 6ten oder 7ten Auflage der TNM-Kriterien klassifiziert. In der neuesten 8ten Auflage entfiel die N2-Kategorie, jedoch wurden die bestehenden Kritiken an der Einteilung der T-Kategorien nicht mit einbezogen. Vor allem die Unterscheidung von pT2 und pT3a anhand ausschließlich makroskopisch erkennbarer Infiltration der Nierenvene oder des Sinus renalis ist nach wie vor ein Problem, was die Einteilung dieser beiden prognostisch relevanten Kategorien erschwert (Delahunt et al., 2017). Eine erneute Validierung und eventuelle Neuklassifizierung der T-Kategorie oder des Gradings wurde vor Beginn der Untersuchungen nicht durchgeführt. Die T-Kategorien pT1b-pT3b/c waren in der univariaten Analyse signifikant mit dem M-Status der Patienten verknüpft. In einer multivariaten Analyse, welche zusätzlich das Grading sowie den TNSA-Wert einschloss, zeigte sich, dass eine pT3-Kategorie und der TNSA-Wert unabhängige prognostische Faktoren sind, die das Metastasierungsrisiko repräsentieren.

5.1.2 Etablierung eines Algorithmus zur Risikostratifizierung

Die Verwendung von prognostischen Algorithmen oder Nomogrammen für die bessere Einteilung von Patienten in prognostische Gruppen soll die Planung der Nachsorge und die Behandlung der Patienten verbessern. Algorithmen dienen der Stratifizierung von Patienten in

prognostische Gruppen. Nomogramme sind eine graphische Darstellung multivariater Analysen, anhand derer sich die Überlebenswahrscheinlichkeiten der Patienten berechnen lassen. Da es in der vorliegenden Arbeit darum ging, Patienten in Risikogruppen zu unterteilen, wurde aus den multivariaten Analysen ein Algorithmus entwickelt, welcher Patienten in eine Hoch- oder Niedrigrisikogruppe klassifiziert. Dieses Verfahren bietet eine neue Möglichkeit Patientenkohorten, beispielsweise für klinische Studien, besser zu selektionieren. In den meisten Fällen dienen ausschließlich klinische, anatomische und pathologische Faktoren, die in multivariaten Analysen zusammengefasst werden, als Grundlage für die Prognosestellung (Karakiewicz et al., 2007; Kattan et al., 2001; Sorbellini et al., 2005; Zisman et al., 2002). Durch die Integration molekularer oder genetischer Marker, wie der Protein- oder Genexpression oder zytogenetischer Daten der Tumore, in Prognosemodelle entstehen Möglichkeiten Tumore noch besser zu klassifizieren und Ansätze für Therapien zu finden (Kim et al., 2005; Rini et al., 2015). Obwohl viele Prognosemodelle publiziert sind, werden sehr wenige in der klinischen Praxis oder für die Stratifizierung von Patientenkohorten für Studien verwendet. Dies liegt zum Teil daran, dass Methoden verwendet werden (microArray, PCR, SNP Arrays, NGS), die noch zu teuer sind, um sie routinemäßig einzusetzen, an noch fehlender Validierung der Methoden oder daran, dass die beschriebenen Algorithmen zu kompliziert in der Umsetzung sind. Es muss also darauf geachtet werden, dass das Verfahren für die Erstellung eines Prognosemodells schnell, zuverlässig, günstig und einfach zu handhaben ist (Mallett et al., 2010). Um diesen Kriterien zu entsprechen, wurde der Risikoscore durch eine Analyse erstellt, die ausschließlich Variablen enthielt, die signifikant mit dem M-Status der Patienten assoziiert waren. Die Regressionskoeffizienten der einzelnen T-Kategorien aus einer multivariaten binär logistischen Regression der Kohorte 1 wurden für die Vereinfachung des Modells verwendet. Dieser Ansatz fand auch bei der Etablierung des SSIGN-Scores Anwendung (Frank et al., 2002). Anders als bei Frank et al. wurden die für die prognostischen Parameter ermittelten Zahlenwerte jedoch nicht direkt miteinander verrechnet, sondern eine weitere Regressionsanalyse durchgeführt, aus der die Regressionskoeffizienten und die Regressionskonstante für den Algorithmus erhalten wurden. Der sogenannte prognostische Index ergibt sich aus der Summe der Variablen, die durch ihre Koeffizienten gewichtet werden. Die beiden verbleibenden Variablen TNSA und T-Kategorie, jeweils mit einem Wert von 0-4, werden mit ihren entsprechenden Koeffizienten multipliziert, addiert und die Regressionskonstante von diesem Wert abgezogen. Der aus der Berechnung der Wahrscheinlichkeit P erhaltene Wert liegt letztlich zwischen 0 und 1. Der Wert 0,5 wurde als Schwellwert für die Unterteilung in Hoch- und Niedrigrisikogruppe gewählt. Wenn ein solches Modell an einer zu geringen Anzahl an Proben erstellt wurde, sind die

errechneten Koeffizienten ungenau. Aus diesem Grund muss das Verfahren an einer unabhängigen Kohorte validiert werden (Steyerberg, 2008).

Es ist an dieser Stelle denkbar, den Grenzwert zu verschieben, um nur Patienten mit weitaus höherem oder niedrigerem Metastasierungsrisiko auszuwählen. Es ist ebenfalls denkbar, wie in anderen Studien gezeigt, mehrere prognostische Gruppen aus diesem Algorithmus abzuleiten. Da eine Gruppe mit intermediärem Risiko allerdings nur unzureichend klassifiziert ist und mitunter Hoch- und Niedrigrisikopatienten gleichermaßen enthält, wurde eine 2-stufige Einteilung bevorzugt. Sensitivität und Spezifität lagen für Kohorte 1 jeweils bei 88%. Der Risikoscore erwies sich damit als geeignetes Werkzeug, um einen Progress der Erkrankung bei Patienten vorhersagen zu können.

Bei der Etablierung neuer Prognosemodelle ist es notwendig zu zeigen, dass das Modell gängigen Modellen überlegen ist. Ein direkter Vergleich wurde hier mit dem Leibovich-Score durchgeführt. Das Leibovich-Modell wurde gewählt, da es das einzige prognostische Modell ist, welches speziell das Auftreten von Fernmetastasen bei lokal begrenzten Tumoren als Endpunkt verwendet (Leibovich et al., 2003). Die meisten Prognosemodelle verwenden als Endpunkt das Überleben der Patienten und bieten damit keine gute Vergleichsgrundlage mit dem hier dargestellten genetischen Risikostratifizierungsmodell. Derzeit wird als Prognosescore für das progressionsfreie Überleben in der Regel der Leibovich-Score zitiert (Leibovich et al., 2003). Dieser setzt sich aus den Parametern T-Kategorie, Lymphknotenstatus, Tumorgröße ($\geq 10\text{cm}$), nukleares Grading und dem Vorliegen von histologisch erkennbaren Nekrosen zusammen. Ausgehend vom ermittelten Score werden Patienten in die Kategorien niedriges, intermediäres oder hohes Risiko eingeteilt. Diese Einteilung korreliert mit der Zeit bis zum Auftreten von Fernmetastasen. Der Leibovich-Score war in der univariaten Analyse signifikant mit dem Auftreten von Fernmetastasen in primär nicht-metastasierten Tumoren assoziiert. Ein multivariater Vergleich war an dieser Stelle nicht möglich, da Leibovich- und Risikoscore die selben Parameter beinhalten. Es ist denkbar, einen Vergleich über den concordance-Index (c-Index) oder eine ROC-Kurven-Analyse durchzuführen. Der genetische Risikoscore war in der Lage, 50% der metachron metastasierten Fälle aus der Gruppe der durch den Leibovich-Score als Niedrigrisiko eingestuften Fälle zu identifizieren. In der Leibovich-Gruppe mit intermediärem Progressionsrisiko (n=25) konnten durch den genetischen Risikoscore 12 der 13 Patienten mit metachroner Metastasierung richtig als Hochrisikopatienten identifiziert werden. Damit zeigt sich, dass der Risikoscore auch in dieser unzureichend klassifizierten Gruppe eine Einteilung der Patienten gemäß ihrem tatsächlichen Metastasierungsrisiko erlaubt. Die zusätzliche Information zur Aggressivität von Tumoren, die

der genetische Score liefert, kann somit als eigenes Risikomodell verwendet werden oder durch Kombination mit anderen Prognosemodellen diese verbessern. Einige Untersuchungen sind bekannt, die molekulare oder genetische Marker für die Prognose nutzen und in denen diese neuen Modelle mit den Nomogrammen und Algorithmen von Frank et al., Leibovich et al., oder Zisman et al., verglichen werden. Das von Rini et al. publizierte 16-gene-Assay enthält 5 Referenzgene und 11 tumorassoziierte Gene. In einem multivariaten Vergleich mit dem daraus entwickelten „recurrence Score“ war der Leibovich-Score nicht mehr signifikant. Eine Kombination aus Leibovich-Score und dem genetischen „recurrence Score“ verbesserte die prognostische Wertigkeit (Rini et al., 2015). In einer Arbeit von Klatter und Kollegen wurde aus einer multivariaten Cox-Regression ein prognostisches Modell erstellt, welches neben der TNM Klassifikation und dem Fuhrman-Grading auch einen 9p-Verlust miteinschloss und damit die Aussagekraft des Modells verbesserte. Damit lieferten sie einen Beweis dafür, dass genetische Informationen, wie sie aus der FISH gewonnen werden können, die Prognosestellung verbessern (Klatter et al., 2009b). Ein anderes Prognosemodell, welches den 9p-Verlust miteinbezieht, ist in einer Arbeit von El-Mokadem et al. geschildert. In dieser Studie wurde der SSIGN-Score durch die Verwendung genetischer Informationen verbessert. Die Vorhersage des rezidivfreien Überlebens wurde in dieser Kohorte durch den Einschluss eines 9p-Verlustes und der T-Kategorie (pT1-pT1 vs. pT3-pT4) in multivariaten Analysen am erfolgreichsten geschätzt (El-Mokadem et al., 2014). Die ccA/ccB-Subtypisierung der kNZK, die durch den ClearCode34 vereinfacht wurde, konnte ebenfalls als dem SSIGN- und dem UISS-Score überlegen dargestellt werden (Brooks et al. 2014). In dieser Arbeit wurde ein kombinierter Score entwickelt, der nach multivariaten Analysen aus der ccA/ccB-Subtypisierung, dem Fuhrman-Grade (3 oder 4) und dem Stadium (größer I) besteht. Eine daraus resultierende Einteilung in 3 Risikogruppen zur Prognose einer Metastasierung war hochsignifikant. Auch die Integration des von Parker et al. entwickelten BioScores, welcher die Expressionslevel von B7-H1, Survivin und Ki-67 beinhaltet, in das UISS- oder SSIGN-Modell führte zu einer Verbesserung ihrer prognostischen Genauigkeit (Parker et al., 2009). Alle diese Studien beweisen, dass die zusätzliche Verwendung genetischer oder molekularbiologischer Daten der Tumore bestehende Prognosemodelle verbessert. Sie belegen auch, dass die Kombination aus klinisch-pathologischen Parametern und molekulargenetischen Faktoren zu einer besseren Risikoeinschätzung der Patienten führt als die Verwendung von nur einer der beiden Faktorengruppen. Diese Tatsache konnte durch den in dieser Arbeit entwickelten Risikoscore ebenfalls belegt werden.

Bedacht werden muss, dass mathematische Modelle immer an die veränderten Klassifikationen der verwendeten pathologischen Variablen angepasst werden sollten (Galfano et al., 2008). Leibovich et al. publizierten 2018 eine überarbeitete Version ihres prognostischen Scores. In Abhängigkeit des Subtyps wurden die Tumore in unterschiedliche prognostische Gruppen unterteilt. Im kNZK gibt es in diesem neuen Modell 18 Subgruppen, wovon 15 das progressionsfreie Überleben bis zu 15 Jahre nach der Tumorentfernung anzeigen. Das neue Modell beinhaltet als erstes das Grading nach ISUP (Dagher et al., 2017), allerdings ebenso wie sein Vorgänger keine molekularen Marker (Leibovich et al., 2018). Jegliche, auf veralteten Versionen des TNM-Systems und des Gradings aufgebauten Modelle, das vorliegende eingeschlossen, müssen unter Berücksichtigung der zeitgemäßen pathologischen Erkenntnisse revidiert werden.

5.1.3 Organbegrenzte und organüberschreitende Tumore

Tumore, deren Wachstum auf die Niere beschränkt ist, sind prognostisch schwer einzuschätzen. Klatte et al. beschrieben eine metachrone Metastasierung in 16% der lokalisierten Tumore ihres 2008 untersuchten Kollektivs. 7% der pT1a-Tumore metastasierten im 5-Jahres-Zeitraum (Klatte et al., 2008b). Speziell die pT1a-Tumore wurden von Guðmundsson et al. untersucht und wiesen in 11% der Kohorte eine metachrone Metastasierung auf (Guðmundsson et al., 2011). Eine Studie der Cleveland Clinic untersuchte das rezidivfreie Überleben von über 1500 Patienten in einem Zeitraum von 10 Jahren und konnte ebenfalls eine Fernmetastasierung in bis zu 10% der Patienten mit pT1-Tumoren feststellen (Lane et al., 2013). Die Aggressivität dieser kleinen Tumore kann demnach nicht von ihrer Größe abgeleitet werden. Die vier rekurrent aberranten chromosomalen Regionen korrelierten in der Subgruppe der organbegrenzten Tumore der Kohorte 1 alle signifikant mit dem M-Status der Patienten. Der Verlust der 9p21.3-Region führte zu einem über 12-fach erhöhten Metastasierungsrisiko in dieser Subgruppe. Die Bedeutung dieses Verlustes für den Progress kleiner Tumore untersuchten LaRochelle et al. an einer Kohorte bestehend aus Tumoren ≤ 4 cm. Sie konnten belegen, dass der Verlust des 9p-Armes mit dem Auftreten von Fern- und Lymphknotenmetastasen korrelierte (La Rochelle et al., 2010). Der TNSA besitzt für die organbegrenzten Tumore eine AUC von 0,881 und ist wie auch in der Gesamtkohorte hochsignifikant mit dem M-Status assoziiert und den einzelnen CNVs prognostisch überlegen. Die T-Kategorien und die Tumorgöße sind nur univariat prognostisch signifikant. Im multivariaten Vergleich ist allein der TNSA ein signifikanter, unabhängiger prognostischer Faktor. Aufgrund dieser Tatsache ist naheliegend, dass allein die Verwendung des TNSA, und nicht des Risikoscores in dieser Subgruppe zielführend für die Prognoseeinschätzung ist. Aus diesem Grund wurden TNSA und Risikoscore

gegenübergestellt. Durch Verwendung des genetischen TNSA-Wertes allein erhält man eine prognostische Genauigkeit von 77,6%. Der Risikoscore besitzt für dieselben Patienten eine Genauigkeit von 86%. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass die Sensitivität des Risikoscores lediglich 57,1% beträgt. Der Risikoscore kann demnach auch für die Einteilung von Tumoren der T-Kategorien pT1-pT2 angewendet werden, hat dann eine sehr hohe Spezifität (95%), allerdings eine geringere Sensitivität als der TNSA-Wert für sich.

Interessant im Zusammenhang mit Risikostratifizierungen für Studienzwecke ist die Frage, ob der genetische Prognoscore Niedrigrisikopatienten aus der Gruppe der Patienten isolieren kann, die nach anatomisch-klinischen Kriterien in die Hochrisikogruppe fallen. Untersuchungen der einzelnen CNVs in Tumoren der Kategorien pT3-pT4 zeigten, dass nur Zugewinne von 1q21.2 und 7q36.3 signifikant mit dem M-Status korrelierten. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass Veränderungen der Regionen 9p21.3 und 20q11-q12 in größeren Tumoren generell häufiger auftreten als in kleinen oder weniger invasiv wachsenden Tumoren. In einer Untersuchung von Monzon et al. anhand einer Kohorte, die zu 75% aus Stage III-IV Tumoren bestand, wurde ein 9p-Verlust zwar in 54% der Kohorte detektiert, korrelierte jedoch nicht mit dem Überleben der Patienten (Monzon et al., 2011). Da die in der vorliegenden Arbeit verwendete Kohorte der Tumore \geq pT3a mit nur 42 Fällen recht klein war und lediglich 6 M0-Patienten enthielt, sind weitere Aussagen anhand dieser Kohorte nicht möglich. Eine Vergrößerung der Kohorte der organüberschreitenden Tumore wäre nötig, um den Einfluss der beiden signifikant veränderten Chromosomenregionen auf den Metastasierungsprozess zu untersuchen und zu ermitteln, ob der Verlust von 9p und der Zugewinn von 20q tatsächlich ihre prognostische Relevanz verlieren.

5.1.4 Überlebensanalysen Kohorte 1

Der primäre Endpunkt dieser Arbeit war die Vorhersage eines Progresses anhand der genetischen Veränderungen der Primärtumoren. Wie aus der Kaplan-Meier-Analyse zum progressionsfreien Überleben hervorgeht, besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten metachroner Metastasen und der Anzahl an spezifischen chromosomalen Veränderungen. An dieser Stelle wurde darauf verzichtet, den Zusammenhang der einzelnen CNVs mit dem Überleben der Patienten zu untersuchen, da der TNSA in den vorangegangenen Analysen eine bessere prognostische Wertigkeit besaß als die einzelnen Aberrationen. Aus dem Graph der Kaplan-Meier-Analyse kann abgelesen werden, dass Patienten häufiger und früher metachron Metastasen entwickeln, je mehr Chromosomenaberrationen nachweisbar sind. Selbiges konnte in der Subgruppe der organbegrenzten Tumore nachgewiesen werden. Der

TNSA-Wert unterteilt die Kohorte demnach in unterschiedliche prognostische Gruppen. Da aus den sich kreuzenden Kurven der Kaplan-Meier-Diagramme hervorgeht, dass das Ereignisrisiko (Hazard) der einzelnen Gruppen nicht über die Zeit konstant ist, die Hazard Ratio also nicht proportional ist, kann keine Cox-Regression für das Überleben in Bezug auf den TNSA-Wert durchgeführt werden (Zwiener et al., 2011). Bei Betrachtung der Überlebenskurven des Risikoscores ist eine deutliche Trennung der Kurven der beiden prognostischen Gruppen zu erkennen. Durch den Risikoscore wird eine signifikante Unterteilung in eine Hoch- und eine Niedrigrisikogruppe erreicht, was durch die Cox-Regression bestätigt wurde. Das geschätzte progressionsfreie 5-Jahres-Überleben liegt in der Niedrigrisikogruppe bei 91%, in der Hochrisikogruppe bei 25% mit einem fast 15-fach erhöhten Metastasierungsrisiko in der Hochrisikogruppe. In den organbegrenzten Tumoren der Kohorte 1 wird eine signifikante Trennung in Hoch- und Niedrigrisikogruppe durch den Risikoscore ebenfalls erreicht. Das Metastasierungsrisiko organbegrenzter Tumore der Hochrisikogruppe ist zu jedem Zeitpunkt mehr als 11-fach höher als in der Niedrigrisikogruppe.

Das Gesamt- und tumorspezifische Überleben der Kohorte wird durch den TNSA und den Risikoscore ebenfalls signifikant stratifiziert. Auffällig ist, dass die einzelnen TNSA-Werte nicht wie in der Analyse des progressionsfreien Überlebens oder der Arbeit von Sanjmyatav et al., 2014 stufenweise mit einem kürzeren Überleben einhergehen. Ein Grund hierfür kann sein, dass 28 Patienten der Kohorte synchron metastasiert waren und entsprechend Systemtherapien erhielten und diese nachweislich das Überleben trotz Progress verlängern. Metachron metastasierte Fälle bekamen ab dem Diagnosezeitpunkt ebenfalls eine Therapie. Ein weiterer Grund kann die geringe Fallzahl der einzelnen TNSA-Werte sein. Durch Verwendung des Risikoscores wird die Kohorte in zwei signifikant getrennte Gruppen unterteilt, die einen deutlich unterschiedlichen Verlauf aufweisen. Die Anzahl an Fällen in den prognostischen Gruppen ist dabei entscheidend größer als im 5-stufigen Ansatz mit dem TNSA-Wert. Dadurch sind Berechnungen zur Überlebenszeit und zum Metastasierungsrisiko statistisch robuster. Das geschätzte 5-Jahres-Überleben beträgt für Niedrigrisikopatienten 92%, für Hochrisikopatienten 56%. Die organbegrenzten Tumore lassen sich anhand dieser Kohorte nur unzureichend stratifizieren, da lediglich 4 Patienten tumorbedingt verstarben.

Die Überlebensanalysen validieren den TNSA für die Stratifizierung von Patientenkohorten und speziell für Fälle mit organbegrenztem Wachstum. Die Einführung des Risikoscores verbessert diese Stratifizierung und ist ebenso geeignet das Progressionsrisiko einzelner Patienten zu schätzen. Damit ist der genetische Risikoscore besonders interessant für die

Selektion von Patienten für eine „active surveillance“, die aufgrund des Allgemeinzustandes oder vorliegender Komorbiditäten inoperabel sind, oder für adjuvante Studien. Die bisher publizierten adjuvanten Studien zu TKIs im kNZK lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Das S-TRAC-Trial belegte eine lebensverlängernde Wirkung von adjuvanter-TKI Gabe bei Hochrisikopatienten mit kNZK (Ravaud et al., 2016). Die ASSURE- und PROTECT-Studien hingegen konnten keinen Einfluss einer frühzeitigen TKI-Therapie nachweisen (Haas et al., 2016; Motzer et al., 2017). Diese Diskrepanz wurde zum Großteil auf die sehr unterschiedliche Patientenselektion zurückgeführt. Während in der S-TRAC-Studie nur Patienten mit kNZK und mindestens pT3a und/oder N+ zugelassen wurden, bestand die Kohorte der ASSURE Studie zu 20% aus nicht-klarzelligen NZKs und zu 37% aus Patienten mit einer T-Kategorie von \leq pT2. Es ist möglich, dass der Nutzen, welcher die S-TRAC-Studie zeigte, durch die Auswahl von Patienten mit deutlich höherem Metastasierungsrisiko als in den anderen Studien bedingt ist. Die Kritik am Auswahlverfahrens der PROTECT- und ASSURE-Studien bezieht sich außerdem darauf, dass die Wirksamkeit von TKIs in nicht-klarzelligen NZKs noch nicht ausreichend demonstriert wurde, um einen Einschluss dieser Patienten in diese Studien zu rechtfertigen (Salmasi et al., 2018). Mit einer verbesserten Selektion von Hochrisikopatienten ist es denkbar, dass der Vorteil einer adjuvanten Therapie deutlicher hervortritt.

5.2 Etablierung der Methode auf formalinfixierten Gewebsschnitten

Um die FISH und die daraus resultierende Risikostratifizierung mit dem Risikoscore anwenderfreundlicher zu gestalten und die Analyse größerer retrospektiver Kohorten zu ermöglichen, wurde das Verfahren auf FFPE-Schnitten etabliert. Dieser Schritt soll die mögliche zukünftige Anwendbarkeit der FISH in der Routine möglich machen.

5.2.1 Cut-Off Bestimmung für Kohorte 2

Bei der Verwendung von FFPE Proben müssen im Vergleich zur Verwendung vollständiger, isolierter Nuklei einige Dinge beachtet werden. Durch das Schneiden des Gewebes liegen einige Zellkerne unvollständig vor oder es gibt Überlappungen von zwei oder mehreren Zellkernen. Die daraus resultierende Verfälschung der FISH-Signale ist Hauptgrund für die Notwendigkeit der Berechnung neuer Schwellenwerte (Tibiletti, 2004). Des Weiteren ist das fixierte Gewebe weniger permeabel als frisches Gewebe und Teile der extrazellulären Matrix können Autofluoreszenz aufweisen und die Hintergrundfluoreszenz verstärken. Es ist darauf zu achten, dass Gewebe vollständig deparaffiniert werden und der Pepsinverdau zu Permeabilisierung zeitlich angepasst wird (Petersen et al., 2004). Da auf einem TMA nicht für jedes Gewebe optimierte Begebenheiten geschaffen werden können, muss ein standardisiertes

Protokoll verwendet werden, mit welchem die meisten Proben hybridisiert werden. Dies führt allerdings zum Ausfall einiger Gewebe, die auch bei wiederholter Hybridisierung nicht auswertbar sind. Der Ausfall war in Kohorte 2 ca. 20%. Bei der Untersuchung von Geweben einzelner Patienten können die Versuchsbedingungen durch Anpassungen von der Dauer des Proteaseverdaus, der Temperatur und dem pH-Wert der Lösungen, der Einwirkzeit der Sonden, sowie den Parametern der Stringenzwaschungen verbessert werden (Rautenstrauß & Liehr, 2002). Die Anwendung der I-FISH auf FFPE-Schnitten bietet den Vorteil, dass die Gewebeintegrität erhalten bleibt und genetische und morphologische Veränderungen gleichzeitig untersucht werden können. In Tumorgewebe können die Tumorzellen auf diese Weise besser von anderen Zelltypen abgegrenzt werden.

Für die FISH wurden Sonden unterschiedlicher Hersteller verwendet, weswegen es nötig war die Versuchsbedingungen, vor allem die Temperaturen und Zusammensetzungen der Waschpuffer, für jede Sonde entsprechend anzupassen. Die Auswertung von Amplifikationen der Sonden 1q21.3, 7q36.3 und 20q12 erfolgte in Bezug auf die Ploidiekontrolle CEN 2. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Hybridisierungs- und Waschpuffer der verwendeten Sonden konnte die CEN2-Sonde in den FFPE-Proben nicht für die Auswertung des 9p21.3-Verlustes als Kontrolle verwendet werden. Da für die CEN9-Sonden nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Zellkerne trunkiert sind und ein Signal dadurch verloren gegangen ist, wurden die Verluste des Chromosom 9p21.3 nur dann gewertet, wenn im Zellkern 2 Kopien des CEN 9 vorlagen oder in mehr als 70% der Fälle ein CEN 9 und 9p21.3-Verlust detektierbar war. In diesem Fall wurde von einem homozygoten Verlust ausgegangen. Die Schwellenwerte wurden in Abhängigkeit vom M-Status mittels ROC-Kurven ermittelt. Dabei konnte für jede Sonde ein signifikanter Wert erreicht werden. Die Cut-Offs sind denen der isolierten Zellkerne ähnlich. Zugewinne von 1q21.3 und der Verlust von 9p21.3 korrelieren am stärksten mit dem M-Status. Der Zugewinn der 20q12-Region weist die schwächste, aber dennoch eine signifikante Korrelation auf. Der aus den CNVs resultierende TNSA-Wert ist auch in Kohorte 2 hochsignifikant mit der Metastasierung assoziiert. Es muss allerdings bedacht werden, dass bei Verwendung des selbe Datensatz für die Selektion der Cut-Offs und deren Validierung der Eindruck entsteht, die Daten seien besser sind als sie es tatsächlich sind (Lam et al., 2008). Die Überprüfung der Schwellenwerte und ihrer Aussagekraft an FFPE-Schnitten muss daher an einer unabhängigen Kohorte validiert werden.

5.2.2 Validierung des TNSA und des Risikoscores auf Gewebsschnitten der Kohorte 2

Zunächst wurde der TNSA uni- und multivariat getestet, um zu überprüfen, ob der genetische Score auch auf Gewebsschnitten anwendbar ist. In dieser Analyse zeigte sich, dass der TNSA, die T-Kategorie sowie ein G3-Grading signifikant mit der Metastasierung assoziiert sind. Der TNSA präsentierte sich als hochsignifikanter unabhängiger prognostischer Faktor. Die Einteilung der T-Kategorien nach der Berechnungsgrundlage für den Risikoscore war in dieser Kohorte ebenfalls multivariat signifikant mit dem M-Status der Patienten assoziiert. Damit konnte gezeigt werden, dass der TNSA auch in Kohorte 2 den übrigen Prognosefaktoren überlegen ist und die Verwendung des Risikoscores, bestehend aus TNSA und klassifizierter T-Kategorie, auch hier für die Prognose nützlich sein sollte. Die Anwendung des Risikoscores auf Kohorte 2 führte zu einer hochsignifikanten Korrelation zur Metastasierung mit einer prognostischen Genauigkeit von 81% mit einer Sensitivität von 62,5% und einer Spezifität von 89,7%. Die Datenlage der Kohorte 2 lies nicht zu, dass der Leibovich-Score für dieses Patientenkollektiv erhoben werden konnte. Aus diesem Grund wurde der Risikoscore nur mit dem TNSA-Wert, welcher durch die multivariaten Regressionsanalysen nachweislich der beste Prognosefaktor war, verglichen. Ein Unterschied wurde bei der Betrachtung der initial M0-Patienten deutlich. In dieser Gruppe lieferte der Risikoscore erheblich bessere Ergebnisse als der TNSA-Wert. Die Genauigkeit des Risikoscores für das Abschätzen einer metachronen Metastasierung lag zwar bei 81,2%, jedoch lag die Sensitivität nur noch bei 47,1%. Es ist möglich, dass die ermittelten Cut-Off-Werte der einzelnen Sonden noch nicht optimal sind und die Untersuchung einer größeren, unabhängigen Kohorte zu einer Verbesserung führen kann. Diese Annahme wird durch die Analyse der organbegrenzten Tumore der Kohorte 2 bekräftigt, in der Zugewinne der 20q11.21q12-Region nicht signifikant mit dem M-Status korrelierten. Der Schwellenwert für die eingesetzte Sonde lag 10% unterhalb des Schwellenwertes für isolierte Zellkerne. Es ist denkbar, dass dadurch falsch-positive Bewertungen von Proben entstehen. Der TNSA-Wert führte dennoch zu einer hochsignifikanten Korrelation mit dem Metastasierungsstatus und war sowohl in uni- als auch multivariaten Analysen der organbegrenzten Tumore einziger signifikanter prognostischer Faktor. Dass die anderen untersuchten Faktoren, T-Kategorie, Grading und Tumorgroße das Signifikanzniveau nicht erreichten, ist in dieser Analyse auffallend. Über das Metastasierungsrisiko kleiner Nierentumore gibt es noch keinen einheitlichen Konsens. Klatte et al. zeigten, dass die Tumorgroße in Tumoren bis zu 4cm nicht mit dem Auftreten von metachronen Metastasen korreliert (Klatte et al., 2008b). Diese Beobachtung kann für Tumore bis zu einer Größe von 7cm in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Kunkle und Thompson kommen in ihren

Arbeiten allerdings zur gegenteiligen Schlussfolgerung (Kunkle et al., 2007; Thompson et al., 2009). Obwohl die T-Kategorie in den organbegrenzten Tumoren nicht mit der Metastasierung korreliert war, führte die Anwendung des Risikoscores zu einer signifikanten Trennung der Kohorte in Hoch- und Niedrigrisikopatienten. Der Risikoscore hat hier eine Genauigkeit von 87% mit einer Sensitivität von 57,9%. Der TNSA hat in dieser Subgruppe eine Sensitivität von nur 36,8%. Die Vorhersagegenauigkeit einer metachronen Metastasierung liegt beim Risikoscore bei 88,6% und ist hochsignifikant. Der Risikoscore konnte damit in einer unabhängigen Kohorte und speziell in den organbegrenzten Tumoren dieser Kohorte validiert werden. Die Sensitivität und Spezifität der Risikostratifizierung ist in Kohorte 1 und Kohorte 2 trotz unterschiedlicher Cut-Off-Werte für die FISH-Sonden sehr ähnlich. In beiden Kohorten wird in den organbegrenzten Tumoren eine Genauigkeit von über 86% erreicht.

5.2.3 Überlebensanalysen der Kohorten 2

Nach der Validierung des TNSA und Risikoscores für die Vorhersage einer Metastasierung wurden Überlebenszeitanalysen durchgeführt, um das Vorhersagemodell mit den Verlaufsdaten der Patienten zu vergleichen. Der TNSA eignete sich zur Schätzung des progressionsfreien Überlebens. Anders als in Kohorte 1 ist eine stufenweise Verschlechterung der Prognose mit zunehmender Anzahl an CNVs, wie auch bei Sanjmyatav et al. beschrieben, zu beobachten. Der Großteil (n=53) der 75 Patienten, die in diese Analyse eingeschlossen wurden, hatten einen TNSA von 0 oder 1. Bei diesen kam es in nur 4 Fällen zu einer metachronen Metastasierung. Das geschätzte progressionsfreie 5-Jahres-Überleben für diese Patientengruppe lag bei ca. 90%. Patienten mit einem TNSA=2 (n=18) wurden in 55% der Fälle mit metachronen Metastasen diagnostiziert. Dabei erstreckte sich der Zeitraum, in dem Metastasen auftraten, von 6 Monaten bis hin zu 6 Jahren. In nur 3 Fällen wurde ein TNSA=3 ermittelt und in nur einem Präparat ließen sich alle 4 CNVs nachweisen. Bei diesem Patienten wurde innerhalb der ersten 12 Monate nach Diagnose des NZK eine Fernmetastasierung festgestellt. Da gerade einmal 5% der Patienten dieser Kohorte einen TNSA-Wert von ≥ 3 hatten, ist die Bewertung des TNSA, trotz dass der Log-Rank-Test signifikante Unterschiede zeigte, nur unzureichend möglich. Bei der Betrachtung der organbegrenzten Tumore wird die Fallzahl noch weiter eingeschränkt. Für die Kaplan-Meier-Analyse konnten 61 Fälle verwendet werden, von denen 42 einen TNSA von 0 oder 1 aufwiesen. Einen höheren TNSA-Wert hatten lediglich 19 Patienten, deren Verlaufsdaten jedoch vergleichsweise kurz waren. Die kurze Nachsorgezeit der meisten Patienten ist in Kohorte 2 das größte Problem bei der Analyse der Überlebenszeiten. Grund für die geringe Anzahl an Fällen mit drei oder 4 CNVs kann auch die insgesamt geringe Anzahl an metastasierten Fällen dieser Kohorte sein. Mit insgesamt nur 32 M1-Fällen und darunter 17

Fälle mit metachroner Metastasierung sind metastasierte Tumore in dieser Kohorte, im Vergleich zu Kohorte 1 und zur Menge an durchschnittlich in der Literatur beschriebenen metastasierten kNZKs, unterrepräsentiert. Die Anwendung des Risikoscores trennt die gesamte Kohorte 2 und die Subgruppe der organbegrenzten Tumore dennoch in zwei Gruppen mit signifikant unterschiedlichem Progressionsrisiko. Der Risikoscore für die Wahrscheinlichkeit einer Progression konnte somit anhand dieser Überlebenszeitanalysen validiert werden. Zu beachten ist, dass nur 8 Patienten der organbegrenzten Kohorte der Hochrisikogruppe zugeordnet wurden. Eine Überprüfung der Analysen anhand eines größeren Kollektivs ist daher ratsam.

Das Gesamt- und tumorspezifische Überleben verschlechtert sich in Kohorte 2 mit zunehmender Anzahl an CNVs. Patienten mit maximal einer spezifischen chromosomalen Aberration verstarben nur in etwa 4% der Fälle, wobei diese Patienten alle einen organüberschreitenden Tumor hatten. Fälle mit mehr Veränderungen verstarben signifikant häufiger und früher an ihrer Erkrankung, unabhängig von der T-Kategorie. Der Risikoscore führte zu einer signifikanten Trennung der Kohorte 2 bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit. Diese signifikante Trennung wurde auch in den organbegrenzten Tumoren beobachtet. Für diese Analysen muss beachtet werden, dass auch hier die Fallzahl sehr gering war. Lediglich 13 Patienten der organbegrenzten Kohorte wurden als Hochrisikopatienten eingestuft.

5.3 Vergleichbarkeit der Kohorten

Die FISH-Untersuchungen wurden in insgesamt 200 Tumorproben durchgeführt, wovon 100 Fälle aus kryokonserviertem Tumorgewebe bestanden und 100 Fälle aus FFPE-fixierten Gewebeschnitten. Die beiden Kohorten unterschieden sich nicht nur hinsichtlich der Gewebeaufbereitung, sondern auch hinsichtlich der Ausprägung einzelner pathologischer und anatomischer Faktoren sowie der Dauer der Patientennachsorge und der Auswahlkriterien. Kohorte 1 wurde retrospektiv, unter der Voraussetzung möglichst langer Nachbeobachtungszeiträume (36 Monate für pM0-Patienten) und der Vorgabe, dass die Hälfte der Kohorte aus metastasierten Tumoren bestehen sollte, zusammengestellt. Durch diese Auswahl kann ein Bias entstehen, wodurch die Kohorte nicht repräsentativ für die Häufigkeiten der Ausprägung der untersuchten Faktoren ist. Für die Analyse des Einflusses der chromosomalen Aberrationen und anderer prognostischer Faktoren ist eine zuverlässige lange Nachsorge eines retrospektiven Kollektivs jedoch unerlässlich. Kohorte 2 ist ebenfalls eine retrospektive Kohorte, unterliegt jedoch nicht dem Bias der gezielten Auswahl der Patienten,

da es sich um ein konsekutives Kollektiv handelt. Die auf dem TMA befindlichen Gewebe wurden durch Pathologen des Universitätsklinikums Erlangen sortiert und erst nach mikroskopischer Auswertung der FISH dekodiert. Durch diesen Schritt entfiel der Auswahlbias für Kohorte 2, jedoch konnte daher kein Einfluss auf die Länge des Follow-Ups genommen werden. Die dadurch recht kurze Nachbeobachtungszeit für Kohorte 2 ist eine maßgebliche Limitation dieser Arbeit. Hinsichtlich der klinisch-pathologischen Parameter gibt es zwischen den Kohorten nennenswerte Unterschiede. Die Häufigkeit der metastasierten Tumore ist in Kohorte 2 mit nur 32% etwas geringer als in Kohorte 1 und als in der Literatur beschrieben (Dabestani et al., 2016). Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der Verteilung der T-Kategorien begründet. Der Anteil an Tumoren der Kategorie pT1-pT2 lag in Kohorte 2 bei 66%. Von diesen organbegrenzten Tumoren kam es in 22,6% der Fälle zu einer Metastasierung. Dies ist vergleichbar mit der Häufigkeit der Metastasierung organbegrenzter Tumore in Kohorte 1 (24%), wobei hier weniger Tumore organbegrenztes Wachstum aufwiesen (58%). Die Einteilung des Dedifferenzierungsgrades nach Fuhrman unterschied sich in den beiden Patientenkollektiven hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Grade. Das Grading G2 war mit 80% in Kohorte 1 und 60% in Kohorte 2 das Häufigste. Trotz der Unterschiede erwiesen sich die Aberrationen in beiden Kohorten als signifikante Prädiktoren für die Metastasierung und der TNSA-Wert konnte unabhängig validiert werden. Der an Kohorte 1 erstellte Risikoscore konnte an Kohorte 2 validiert werden, obwohl die Verteilung klinisch-pathologischer Faktoren unterschiedlich war. Dies beweist die Stärke des neuen Risikoscores. Insgesamt zeigte sich in den Regressions- und Cox-Analysen, dass die Fallzahl für die genaue Überprüfung einzelner Variablen zu gering war. Durch die Etablierung der FISH auf Gewebeschnitten steht der Analyse größerer Kohorten unter Verwendung eines TMA nichts im Wege.

5.4 Validierung anhand der TCGA-Daten

Große Datenbanken mit multizentrischen Kohorten sind eine wertvolle Ressource für die Forschung. Die Datenbank des TCGA wird häufig für die Überprüfung molekulargenetischer Ergebnisse aus kleineren Kohorten verwendet. Dies dient der Validierung von Ergebnissen an einem größeren, unabhängigen Kollektiv. Es muss allerdings beachtet werden, dass die Verwendung eines solchen Datensatzes mit Limitationen einhergeht. Die CNVs wurden aus Sequenzierungsdaten ermittelt, wodurch Verluste und Zugewinne im Vergleich zur FISH seltener detektiert werden. Die entsprechende Veränderung muss in der untersuchten Gewebeprobe in einem gewissen Prozentsatz der Zellen vorliegen, damit sie als relevant erkannt wird. Zu diesem Cut-Off sind für die TCGA-Daten keine Angaben gemacht worden.

Ein weiteres Problem ist, dass die Nachsorge der TCGA-Daten unzureichend ist, weshalb eine Korrelation von M-Status und chromosomalen Aberrationen nur in Patienten mit synchronen Metastasen durchgeführt werden konnte. Da die verwendeten Fälle und ihre Parameter für multizentrische Datenbanken kodiert werden müssen, ergibt sich eine weitere Fehlerquelle. Nguyen und Gill führten für die SEER-Kohorte ein Review der Tumorgrößen von 167 Fällen durch und fanden, dass in 45% die falsche Größe angegeben war (Nguyen and Gill, 2010). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass sich solche Fehler auch in anderen Kohorten und anderen Parametern wiederfinden.

Die 495 Fälle der TCGA-Kohorte wurden nach ihrem M-Status in 2 Gruppen unterteilt und signifikante Aberrationen des gesamten Genoms dargestellt. Die für diese Arbeit interessanten Loci konnten damit zum Teil validiert werden. Zugewinne des gesamten Chromosoms 7 und speziell des Subtelomerbereichs des langen Arms sowie von Chromosom 20 korrelierten signifikant mit dem Status pM1. Ebenso korrelierte ein Verlust von Chromosom 9p signifikant mit einer Metastasierung. Einzig ein Zugewinn der Region 1q21.3 zeigte in dieser Analyse kein positives Ergebnis. Diese Ergebnisse entsprechen den Resultaten der Analysen der TCGA-Daten durch das Broad Institute, welche ergaben, dass ein Zugewinn von 20q (als Arm-Level Event) und der Regionen 7q31.2-q36.3 sowie der Verlust von 9p21.3 signifikant mit dem M-Status der Patienten korreliert. Die Deletion von 9p21.3 korrelierte ebenso wie ein Zugewinn von 1q mit einem verkürzten Überleben der Patienten (Broad Institute of MIT and Harvard, 2016). In einer Arbeit von Gulati et al. aus dem Jahr 2014 wurden mehrere chromosomale Aberrationen und molekulare Biomarker, unter anderem drei der vier hier untersuchten chromosomalen Regionen, in dem Datensatz des TCGA untersucht. Zugewinne von 20q11.21-q12 und Verlust von 9p21.3 wurden anhand dieser Daten mit einem schlechteren tumorspezifischen Überleben korreliert (Gulati et al., 2014).

Da in den vorangegangenen Untersuchungen auffiel, dass einige chromosomale Aberrationen in organbegrenzten oder organüberschreitenden Tumoren unterschiedlich stark mit der Metastasierung korrelierten, wurde die TCGA-Kohorte nach T-Kategorien aufgetrennt und die Untersuchungen wiederholt. Die Tumore der Kategorie pT1-pT2 enthielten lediglich 14 pM1-Fälle, wodurch die Korrelationsanalysen mit Vorsicht zu betrachten sind. In der FISH-Analysen der organbegrenzten Tumore korrelierten der Zugewinn von Chromosom 1q21.3 und der Verlust von 9p21.3 am stärksten mit dem M-Status, diese beiden Regionen waren auch in der TCGA-Kohorte entsprechend dereguliert. Aufgrund der geringen Fallzahl von pM1-Fällen in der TCGA-Datenbank und der ebenfalls geringen Anzahl an metastasierten Fällen von

organbegrenzten Tumoren in den beiden Kohorten (Kohorte 1=14 M1-Fälle, Kohorte 2=19 M1-Fälle), sollte diese Analyse in einer größeren Kohorte validiert werden. In der Literatur finden sich keine vergleichbaren Untersuchungen, die die Tumorgöße oder T-Kategorie berücksichtigen. In Kohorte 1 wurden die CNVs in den organüberschreitenden Tumoren ebenfalls untersucht. Auffällig war dabei, dass Verluste von 9p21.3 und Zugewinne von 20q11.21q12 nicht signifikant mit dem M-Status der Patienten korrelierten. Um zu überprüfen, ob dies auch in der TCGA-Datenbank der Fall ist, wurden die Tumore T3-T4 analysiert. In dieser Auswertung war von den vier untersuchten CNVs nur ein Zugewinn von Chromosom 7q mit der Metastasierung assoziiert. Die Fallzahl an pM1 ist mit 64 Fällen in organüberschreitenden Tumoren in der TCGA-Kohorte ausreichend groß. Die Aberrationen -9p und +20q waren auch in dieser Kohorte in Tumoren \geq pT3 nicht signifikant. Damit bestätigt sich das Ergebnis der FISH-Untersuchung der organüberschreitenden Tumore. Wann in der Tumorgenese die Aberrationen von Chromosom 9 und 20 entstehen und ob sie frühe Ereignisse sind, die zu einem erhöhten Metastasierungsrisiko bereits in kleinen Tumoren führen und weshalb dieses Risiko in größeren Tumoren nicht mehr nachweisbar ist, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

5.5 mRNA-Expressionsanalysen im Gewebe klarzelliger Nierenzellkarzinome

Chromosomale Verluste und Zugewinne verändern die RNA-Expressionslevel der Gene, die sich auf den aberranten Regionen befinden. Eine Deletion führt dabei zu einer Herunterregulation der RNA-Transkripte, eine Duplikation entsprechend zu einer Erhöhung (Essletzbichler et al., 2014; Martinez et al., 2013). Entsprechend dieser Annahme sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob es Gene gibt, die in den aberranten chromosomalen Regionen liegen und folglich differenziell exprimiert werden. Zur Auswahl der Gene wurden zunächst die TCGA-Daten analysiert, da sie einen guten Überblick über die Expression einzelner Gene in den interessanten Loci bieten. Nach Vorauswahl der signifikant deregulierten Gene in metastasierten Proben der TCGA-Kohorte, wurde eine umfassende Literaturrecherche durchgeführt und weitere Kandidatengene eingeschlossen, die im Zusammenhang mit dem kNZK publiziert wurden und für die es zum Großteil bereits Therapeutika gibt, die zumindest in präklinischen Studien getestet werden.

Zur Untersuchung der Genexpressionsunterschiede wurde die quantitative Real-Time-PCR (q-RT-PCR) verwendet, da sie eine sensitive, reproduzierbare Methode zur Bestimmung des mRNA-Gehalts einzelner Proben ist. Durch den Vergleich der Expression ausgewählter Gene in metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren sollte der Einfluss auf die Progression

untersucht werden. Für eine q-RT-PCR ist die Wahl des Referenzgens entscheidend für die Richtigkeit der Auswertung. Je nachdem welche Art von Proben analysiert werden sollen (Primärtumor oder Metastasen, Vergleich von Normal- und Tumorgewebe) sind unterschiedliche Housekeepinggene ratsam, da in unterschiedlichen Geweben zum Teil andere Gene stabil exprimiert werden. Hier wurde PPIA als Referenz gewählt, da in Versuchen gezeigt werden konnte, dass dieses Gen bei der Untersuchung von Primärtumorgeweben, speziell beim Vergleich von metastasierten und nicht-metastasierten Primärtumoren, stabil exprimiert wird (Wierzbicki et al., 2014). Zu hohe Anteile von Nichttumorzellen in den untersuchten Proben verfälschen das Ergebnis einer qPCR, da mRNA gewebespezifisch exprimiert werden. Es wurde aus diesem Grund darauf geachtet, nur Tumorareale zu verwenden, die einen Anteil an Tumorzellen von mindestens 80% aufwiesen und keine nekrotischen oder inflammatorischen Bereiche enthielten. Ein weiterer Grund für Expressionsunterschiede, könnte die intratumorale Heterogenität sein, welche bei Untersuchung nur eines Tumorareals nicht mitbetrachtet wird.

In 60 Primärtumorproben (30 metastasiert, 30 nicht-metastasiert) wiesen die Gene *S100A10*, *BCL-xL*, *ARNT*, *EZH2* und *SHH* eine signifikant höhere Expression in metastasierten als nicht-metastasierten Tumoren auf. Das auf Chromosom 9p21.3 lokalisierte *CDKN2A* war in metastasierten Tumoren herunterreguliert. Die Expression der anderen ausgewählten Gene konnte nicht mit der Metastasierung korreliert werden. Zugewinne von 1q21.3, 7q36.3 und 20q12 korrelierten mit einer erhöhten Expression von *S100A10*, *ARNT*, *EZH2* und *BCL-xL*. Der Verlust von 9p21.3 korrelierte mit niedrigeren Expressionsleveln von *CDKN2A*. Die Korrelation zu den FISH-Ergebnissen lässt darauf schließen, dass die Aberrationen zu einer veränderten Genexpression beitragen. Die Expression von *SHH* konnte jedoch nicht mit Zugewinnen der 7q36.3 Region assoziiert werden. Da *SHH* in den metastasierten Tumoren der Kohorte 2,3-fach höher exprimiert war als in den nicht-metastasierten Tumoren, ist davon auszugehen, dass die vermehrte Expression durch epigenetische Faktoren oder Deregulation anderer Signalwege reguliert wird. Der *SHH-GLII*-Signalweg interagiert in Tumoren mit dem *PI3K/AKT*-, dem *NF-κB*- und dem *MAPK*-Signalweg und greift damit in für das NZK wichtige Signalwege ein (Shigemura and Fujisawa, 2015). Eine Deregulierung des *SHH*-Signalwegs ist aus dem Pankreas- und Kolonkarzinom bekannt, wo es zur veränderten Expression von Zielgenen, welche die Proliferation, Differentiation und Angiogenese regulieren, kommt (Chari and McDonnell, 2007). In NZK-Zelllinien konnte die Proliferation erfolgreich durch Hemmung von *SHH* über siRNA oder den spezifischen Hedgehog-Hemmer Cyclopamin reduziert werden (Dormoy et al., 2009). Die Analyse der TCGA-Daten ergab für *SHH* keine Korrelation zum M-Status. Allerdings war auch die Expression von *CDKN2A* und *BCL-xL* nicht signifikant

unterschiedlich zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren der TCGA-Kohorte. Es muss beachtet werden, dass im Gegenteil zur Homburger die TCGA-Kohorte nur in synchron-metastasierte und nicht-metastasierte Fälle unterteilt werden konnte. Metachron metastasierte Fälle sind in den TCGA-Daten somit in der pM0 Gruppe enthalten und könnten zu einer Verschiebung der Expressionswerte führen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb eine verminderte *ARNT*-Expression in den pM1-Tumoren ermittelt wurde, was im Gegensatz zu den PCR-Ergebnissen steht, durch die eine signifikant erhöhte Expression in metastasierten Tumoren nachgewiesen wurde. Es wurde lange Zeit angenommen, dass *ARNT* konstitutiv exprimiert wird, jedoch gibt es vermehrt Belege dafür, dass *ARNT* infolge einer Hypoxie oder *HIF1 α* -vermittelt durch einen Feed-forward-loop hochreguliert werden kann (Mandl et al., 2013, 2016). Die Inhibierung von *ARNT* führte in vivo zur Suppression der *VHL*-assoziierten Entstehung von Hämangiomen der Leber (Rankin et al., 2005). Ob sich *ARNT* als prognostischer Faktor im kNZK eignet, ist allerdings nicht weiter beschrieben. Es ist denkbar, dass Therapien die *ARNT* oder dessen Dimerisierung mit *HIF1- α* als Target haben im kNZK erfolgversprechend sein könnten.

5.5.1 Analyse des Zusammenhangs von Genexpression und Überleben

Die relative Genexpression wurde anschließend genutzt, um Patienten in Risikogruppen zu unterteilen. Dadurch war es möglich zu untersuchen, ob die deregulierten Gene im Zusammenhang mit einem verkürzten tumorspezifischen Überleben oder dem Auftreten metachroner Fernmetastasen stehen. Eine hohe Expression des Annexin II Ligand *S100A10* korrelierte hochsignifikant mit einem verkürzten tumorspezifischen und progressionsfreien Überleben. Die geschätzte 5-Jahres-Überlebensrate lag bei hoher Expression bei 58% und bei 89% im Fall einer niedrigen Expression. Ähnliche Ergebnisse wurden durch Ohno et al. publiziert, die eine erhöhte *S100A10*-Expression ebenfalls mit einem verkürzten Überleben assoziierten. Die Cox-Regression belegte ein über 8-fach erhöhtes Risiko eines tumorbedingten Todes bei erhöhter *S100A10*-Expression sowie ein 7,5-fach erhöhtes Risiko einer metachronen Metastasierung. *S100A10*, auch bekannt als Annexin II ligand oder p11, spielt auf der Zelloberfläche eine entscheidende Rolle in der Regulation der Permeabilität von Geweben durch die Umsetzung von Plasminogen in das proteolytische Enzym Plasmin (Lewit-Bentley et al., 2000). Diese Eigenschaft nutzen Tumorzellen, um die sie umgebende Extrazellulärmatrix und andere Gewebebarrieren, wie beispielsweise Blutgefäße, zu verdauen (Madureira et al., 2012). Als Folge dessen wird die Invasivität der Tumorzellen erhöht (Bharadwaj et al., 2013; Choi et al., 2003). *S100A10* ist in gesundem Nierengewebe nicht nachweisbar, wird im Tumor also *de novo* exprimiert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass dessen Funktion für die Tumorgenese

oder Progression von Bedeutung sein könnten (Domoto et al., 2007; Ohno et al., 2009; Teratani et al., 2002). Ebenfalls hochsignifikant waren die Ergebnisse für eine erhöhte *EZH2*- und *BCL-xL*-Expression. Die Überlebenskurven und die geschätzten 5-Jahres-Überlebensraten waren ähnlich den Werten für *S100A10*. Eine erhöhte *EZH2*-Expression war mit einem 7-fach erhöhten Risiko tumorbedingt zu versterben und einem 5,5-fach erhöhten Progressrisiko assoziiert. Dies belegten auch Wagener et al. 2010 anhand von immunhistochemischen Färbungen (Wagener et al., 2010). Eine erhöhte *BCL-xL*-Expression ist als negativer prognostischer Faktor aus dem Mamma- und hepatozellulären Karzinom bekannt (Olopade et al., 1997; Watanabe et al., 2004). Die *ARNT*-Expression korrelierte zwar signifikant mit einer tumorbedingten Todesursache, allerdings nicht mit dem Auftreten asynchroner Metastasen. Für *SHH* war nur ein Einfluss auf die metachrone Metastasierung, aber nicht auf das Überleben erkennbar. Eine niedrige Expression von *CDKN2A* korrelierte nicht mit dem Überleben der Patienten oder einem Progress. Dies könnte daran liegen, dass der errechnete Cut-Off möglicherweise ungeeignet ist. Durch die Addition der zweifachen Standardabweichung zum Mittelwert der niedrigen Expression erhielt man einen Wert, der sich mit dem Schwellenwert der hohen Expression abzüglich der zweifachen SD überschneidet. Damit trennt der Cut-Off nicht eindeutig Hoch- und Niedrigrisikogruppen. Für die *SHH*-Genexpression war die Problematik vergleichbar. Dies könnte die nicht-signifikanten Ergebnisse dieser Untersuchung erklären. Entsprechend der zuvor erwähnten Notwendigkeit einer Validierung von Schwellenwerten müssen diese auch für die relative Genexpression anhand einer größeren Kohorte verifiziert werden. Diese Validierung sollte durchgeführt werden, bevor aus den differenziell exprimierten Genen ein prognostischer Test etabliert wird. Zudem ist es ratsam mehr als nur ein Referenzgen für einen aussagekräftigen prognostischen Test mitzuführen, um die Normalisierung zu verbessern, da auch „Housekeeping-Gene“ in Tumoren von Mutationen und veränderter Expression betroffen sind.

Die durch das cBioPortal zur Verfügung gestellten aufbereiteten TCGA-Daten wurden genutzt, um den Einfluss der differentiellen Genexpression auf das Überleben an einer größeren Kohorte zu untersuchen. Wie bereits erwähnt sind die Nachsorgedaten dieser Kohorte eine maßgebliche Limitation dieser Auswertung. Verlaufsdaten, die auf eine metachrone Metastasierung schließen lassen, lagen für 126 Patienten vor. Ein tumorbedingter Tod wurde für 165 Patienten dokumentiert. *S100A10* und *EZH2* konnten als signifikante Marker für das tumorspezifische und progressionsfreie Überleben validiert werden. Eine niedrige Expression von *CDKN2A* korreliert in diesem Datensatz hochsignifikant mit einem verkürzten Überleben und einer Metastasierung, was der publizierten Datenlage besser entspricht als die Ergebnisse

der qPCR. *ARNT*, *SHH* und *BCL-xL* waren in den Kaplan-Meier-Analysen nicht signifikant. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Gene keine metastasenfördernde Eigenschaften haben, allerdings kann anhand des TCGA keine exakte Analyse der möglichen Spleißvarianten erfolgen. Alternatives Spleißen kann die Funktion von Proteinen grundlegend verändern. Die interessanteste Funktionsänderung durch alternatives Spleißen der untersuchten Gene zeigt BCL-2-like protein 1 (*BCL2L1*) auf. In den qPCR-Analysen wurden Primer und TaqMan-Sonde so gewählt, dass die Expression der langen Spleißvariante *BCL-xL* untersucht wurde. *BCL-xL* ist weitestgehend homolog zu *BCL-2* und hat eine anti-apoptotische Funktion. Die kurze Spleißvariante, die aus *BCL2L1* hervorgehen kann, *BCL-xS*, hat hingegen eine pro-apoptotische Wirkung, da sie mit anderen Faktoren Dimere bildet. Eine genaue Unterscheidung der im Tumor hochregulierten Variante ist demnach wichtig, um Rückschlüsse auf einen etwaigen tumorprotektiven Signalweg schließen zu können.

In sechs der untersuchten Gene konnte mittels q-RT-PCR kein signifikanter Unterschied der relativen Expressionslevel zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren festgestellt werden. Im Fall von *ECM1*, *MTAP*, *DNAJB6*, *TPX2* und *E2F1* korrelierte die Expression mit dem M-Status zwar in der TCGA-Datenanalyse, dies konnte in unseren Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden. Das für PD-L1-kodierende Gen *CD274* wurde, trotz seiner Lage außerhalb des durch die FISH-Analyse abgedeckten Bereichs auf Chromosom 9p24.1, aufgrund seiner möglichen Therapierelevanz untersucht. Durch die Zulassung der Checkpoint-Inhibitoren für die Therapie des fortgeschrittenen NZKs ist PD-L1 vor allem als möglicher Biomarker für die Vorhersage des Therapieansprechens in den Fokus der Forschung gerückt. Als prognostischer Marker wurde die Proteinexpression in verschiedenen Studien anhand von immunhistochemischen Färbungen quantifiziert und eine hohe PD-L1-Expression mit einem verkürzten Überleben assoziiert (Choueiri et al., 2016b; Iacovelli et al., 2016; Leite et al., 2015) Auch in Microarray- und qPCR-Untersuchungen wurde *CD274*-Expression mit der Metastasierung in Verbindung gebracht (Sanjmyatav et al., 2011b). In der untersuchten Kohorte bestätigte sich allerdings das Ergebnis der TCGA-Analyse, in welcher ebenfalls die Genexpression von *CD274* nicht mit dem M-Status korrelierte.

In Kaplan-Meier-Analysen zeigt sich, dass die *CD274*-Expression zwar signifikant mit dem geschätzten tumorspezifischen Überleben korreliert, jedoch nicht mit dem Auftreten metachroner Metastasen. Demnach scheint PD-L1 im Metastasierungsprozess direkt keine entscheidende Rolle zu spielen, bewirkt allerdings womöglich ein verkürztes tumorspezifisches Überleben bei hoher Expression.

Posttranskriptionelle und posttranslationale Modifikationen der untersuchten Gene können nicht ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der Proteinexpression, beispielsweise mittels Western Blot, in den ausgewerteten Proben wäre ein geeigneter nächster Schritt um zu überprüfen, ob das mRNA-Level mit der Proteinexpression korreliert oder ob es zu Veränderungen kommt.

Die Expression der Gene *ECM1*, *MTAP*, *DNAJB6* und *TPX2* ist im TCGA-Kollektiv signifikant sowohl mit einem tumorspezifischen als auch einem progressionsfreien Überleben assoziiert. Dies konnte allerdings für die Gewebeproben nicht untersucht werden, da nur die Gene, welche signifikant mit dem M-Status der Patienten korrelierten, in den weiteren Analysen berücksichtigt wurden. Es bleibt demnach offen, die Expression dieser Gene im Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten zu untersuchen.

5.5.2 Netzwerkanalyse der betroffenen Gene

In einer Netzwerkanalyse konnte dargestellt werden, dass einige der untersuchten Gene (*EZH2*, *CDKN2A*, *SHH*, *BCL-xL*, *E2F1* und *ARNT*) in direktem oder indirektem Zusammenhang miteinander stehen. In diesem Netzwerk dargestellt sind bekannte zellzyklusregulierende Signalwege, wie der phosphatidylinositol-3-kinase (*PI3K*)/*Akt*-Signalweg, der *Wnt*-Signalweg, welcher über β -Catenin reguliert wird, und der Hedgehog-Signalweg (Islam et al., 2015; Polivka Jr. and Janku, 2014). Da die untersuchten Gene in Wechselwirkung mit diesen bekannten Signalwegen stehen, kann man davon ausgehen, dass sie in der Tumorgenese und Progression eine wichtige Rolle spielen. Ein solches Signalnetzwerk zeigt, dass die Deregulationen einzelner Bestandteile einer Signalkaskade zu vielfältigen Veränderungen führen können. Beispielsweise konnte weder in der qPCR-Analyse noch in der Analyse der TCGA-Daten nachgewiesen werden, dass der Transkriptionsfaktor *E2F1* signifikant dereguliert ist. *E2F1* wird jedoch von signifikant deregulierten Genen kontrolliert. Eine Netzwerkanalyse bietet daher die Möglichkeit, Kandidatengene zu identifizieren, welche die Funktion der Signalwege beeinflussen. Für die Auswahl von potentiellen neuen Zielgenen für Therapeutika können daraus Erkenntnisse gewonnen werden, welche Signalwege dereguliert sind und ob sich aus den molekulargenetischen Veränderungen Therapieziele ergeben, die möglicherweise nur indirekt angesprochen werden können. Es ist anzumerken, dass die Analysen dieses Netzwerkes auf Datenbankanalysen basieren, deren Darstellung aus Übersichtlichkeitsgründen reduziert und damit unvollständig ist. So werden einige Zusammenhänge aus dem Schaubild nicht ersichtlich, wie zum Beispiel die Repression der *CDKN2A*-Expression durch *EZH2* (Kotake et al., 2007).

5.6 Expression ausgewählter Gene in Zelllinien und funktionelle Analysen

Für funktionelle Untersuchungen wurden die beiden Gene *EZH2* und *BCL-xL* ausgewählt, da sie in den Geweben metastasierter Tumore signifikant hochreguliert waren und ihre Funktion im Metastasierungsprozess der kNZK bisher nur wenig beschrieben wurde. Zur funktionellen Charakterisierung wurden zwei NZK-Zelllinien verwendet, die in der Literatur ausführlich beschrieben sind. Caki-2 wurde aus einem Primärtumor mit Wildtyp pVHL etabliert. Die Zelllinie 786-O enthält hingegen eine mutierte *VHL*-Variante und führt im Mausmodell zur Entstehung von klarzelligem Nierentumoren und Metastasen (Brodaczewska et al., 2016). Demzufolge weisen die beiden Zelllinien unterschiedliche Eigenschaften auf, die sie auch phänotypisch von Nierentumoren von Patienten unterscheiden. Als Modelle für die Analyse von Metastasierungsprozessen sind sie jedoch grundsätzlich geeignet.

Da beide untersuchten Gene in metastasierten Tumoren hochreguliert waren, wurde zur gezielten Manipulation der Expression siRNA verwendet. Durch die Transfektion der Zellen mit komplementären siRNA-Molekülen wird die mRNA gebunden und abgebaut. Somit kommt es nicht mehr zur Proteintranslation und zu einer eingeschränkten Funktionalität. Der Vergleich des Migrations-, Invasions- und Proliferationsverhalten der normalen und transfizierten Zellen erlaubt dann Rückschlüsse auf die Funktion der Gene und ihre Rolle in der Metastasierung.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst das Proliferations- und Migrationsverhalten von Zellen untersucht, die mit spezifischer *EZH2* und *BCL-xL* siRNA transfiziert wurden. Zunächst wurden die optimalen Konzentrationen von Transfektionsreagenz und siRNA bestimmt und die spezifische Herunterregulation der beiden Gene anhand von einer qRT-PCR nachgewiesen. Da das Transfektionsreagenz einen Einfluss auf die Migration und Proliferation haben kann, wurden als Kontrollzellen die Zellen verwendet, welche mit Transfektionsreagenz inkubiert wurden, aber nicht die siRNA enthielten. Für den Nachweis der spezifischen Herunterregulation mittels siRNA wurden die Primer für beide Gene sowohl in den transfizierten als auch den Mock-Kontrollen mitgeführt. Eine Reduktion der *BCL-xL*-mRNA wurde bei Transfektion mit siEZH2 und vice versa nicht festgestellt.

5.6.1 *EZH2*

EZH2 wird in einer Vielzahl an Tumoren vermehrt exprimiert und konnte in Brust-, Lungen-, Kolon-, Nieren- und Prostatakarzinomen mit einem verkürzten Überleben und einer höheren Metastasierungswahrscheinlichkeit assoziiert werden (Bracken et al., 2003; Chen et al., 2015; Ho et al., 2017). Ein *EZH2*-Inhibitor (Tazemetostat) befindet sich aktuell in einer Phase 2 Studie für diverse solide Tumore und Leukämien und könnte bei entsprechendem funktionellen

Einfluss auch für das NZK interessant sein. Die spezifische und nachweislich signifikante Herunterregulation der *EZH2*-Expression führte in keiner der beiden Zelllinien zur Veränderung der Proliferation. Die Migration wurde durch die Transfektion gesteigert und widerspricht damit den bekannten publizierten Daten. Allerdings war die Migrationssteigerung nur in 786-O-Zellen signifikant. Dies könnte daran liegen, dass eine stärkere Herunterregulation der *EZH2*-mRNA in den 786-O-Zellen (4-fach) als in den Caki-2-Zellen (3-fach) bewirkt wurde. Um in den Migrationsversuchen die Proliferation zu hemmen, welche zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würde, wurde der DNA-Replikationsinhibitor Aphidicolin verwendet (Spadari et al., 1982). Weiterhin konnte durch *EZH2*-Inhibition keine Induktion von Apoptose nachgewiesen werden, weder durch den Nachweis von Histonkomplexen, noch durch die Aktivierung von Caspasen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Ergebnissen. In Untersuchungen zum Einfluss der *EZH2*-Inhibition auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von NZK-Zelllinien wurde berichtet, dass es zur Verminderung beider Funktionen kommt (Liu et al., 2016; Wagener et al., 2008; Yuan et al., 2012; Zhang et al., 2018). Eine vermehrte Apoptose nach si*EZH2*-Transfektion wurde dabei nur einmal von Wagener et al., 2008 beschrieben. Der Einfluss von *EZH2* auf Proliferation und Migration konnte folglich nicht bestätigt werden. Inwieweit das Invasionsverhalten der Zellen beeinflusst wird, wurde nicht untersucht. Die Wahl der Zelllinien reflektiert zwar den aktuellen wissenschaftlichen Standard, könnte jedoch zum Teil für die Problematik verantwortlich sein. Caki-2 Zellen wurden in der Literatur zwar als kNZK-Zelllinie beschrieben und entstammen nachweislich einem kNZK, weisen allerdings bei Transplantation in Mäusen einen papillären Phänotyp auf. Da die chromosomalen Aberrationen und entsprechenden Veränderungen in der mRNA-Expression für kNZK ermittelt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Veränderungen nicht oder anders in den Zellkulturen vorliegen. Die Phänotypänderung der Caki-2-Zellen ist ein Indiz für eine veränderte Genexpression im Vergleich zu 786-O-Zellen. Des Weiteren sind die genauen genetischen Veränderungen und Aberrationen der verwendeten Zelllinien nicht bekannt. Zelllinien in Kultur können je nach Kulturbedingungen und Stress, welchem sie ausgesetzt sind, im Verlauf der weiteren Passagierung zusätzliche Mutationen anhäufen oder bestehende verlieren. Ob dies in den verwendeten Zellen der Fall ist und inwieweit dies einen Einfluss auf das Zellverhalten haben kann, wurde nicht ermittelt und kann folglich nicht abschließend ausgeschlossen werden. Die Proteinexpression vor und nach Transfektion wurde nicht ermittelt, wodurch nicht bestätigt werden kann, dass durch die Transfektion tatsächlich das translatierte Protein vermindert exprimiert wird und eine Funktionsänderung in der Zelle möglich ist. Durch die Verwendung eines Western Blots wäre

es möglich dies nachzuweisen. Zum Beweis der Reproduzierbarkeit wurden alle Versuche mit mindestens 3 biologischen Replikaten wiederholt. Es sei angemerkt, dass es in den biologischen Replikaten zum Teil zu erheblichen Unterschieden kam. Dies kann an unvollständiger Transfektion liegen oder daran, dass die siRNA bereits vor Beginn der Messungen schon wieder abgebaut wurde (Applied Biosystems Inc., 2008). Das System für die Echtzeitmessung ist sehr komplex und entsprechend beeinflussbar. Die Unterschiede der Ergebnisse zu den erwarteten Werten könnten im verwendeten System begründet liegen. Die Verwendung des RTCA-Systems ist möglicherweise für diese Art von Untersuchungen ungeeignet. Durch die Impedanzmessung wird die bewachsene Oberfläche durch Elektroden gemessen. Dabei wird die Morphologie und Adhärenz der Zellen, die durch die Transfektion möglicherweise stark verändert ist, jedoch nicht erfasst und kann zu einer falschen Interpretation der Ergebnisse führen (Limame et al., 2012). Durch andere Methoden zur Messung der Proliferation, beispielsweise mittels eines bromodeoxyuridine (BrdU)-Assays, und Migration, etwa mittels Boyden Chamber Assay, sollten die Ergebnisse überprüft werden (Madhavan, 2007). Die eingesetzte Zellzahl für das RTCA beruhte auf der Ermittlung der Verdopplungszeit unbehandelter Zellen. Dies kann bedeuten, dass die Zellzahl der transfizierten Zellen nicht für den Versuch mit transfizierten Zellen geeignet ist. Um dies zu überprüfen müssten Wachstumskurven vor und nach Behandlung und mit und ohne siRNA durchgeführt werden.

5.6.2 *BCL-xL*

Proliferationsversuche konnten mit si*BCL-xL* transfizierten Zellen nicht durchgeführt werden, da die Zellen nicht in ausreichender Menge über den nötigen Zeitraum kultiviert werden konnten. Nach Transfektion war es zwar möglich Zellen zu ernten, um eine quantitative Bestimmung der *BCL-xL*-Expression durchzuführen, allerdings wurde bereits nach 24h post-Transfektion ein Absterben der Zellen beobachtet. Nach 48h waren mikroskopisch sehr viele Zelltrümmer und morphologisch stark veränderte, absterbende Zellen zu erkennen. Aus diesem Grund wurden Apoptoseassays verwendet, um zu überprüfen, ob durch die Transfektion eine Apoptose in den Zellen induziert wird.

Als Kontrollen wurden sowohl si*EZH2* als auch si*SEPT9* transfizierte Zellen, Mock-transfizierte Zellen und mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt. Eine Transfektion mit *EZH2* und *SEPT9* siRNA führte nicht zu einer gesteigerten Apoptose im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen. Es konnte aus diesem Grund ausgeschlossen werden, dass das Absterben der mit si*BCL-xL* transfizierten Zellen durch das Transfektionsmedium oder die Kulturbedingungen ausgelöst wurde. Da DMSO bei entsprechender Konzentration und

Inkubationszeit zytotoxisch wirkt, wurde eine Behandlung der Zellen mit 2,5% DMSO als Positivkontrolle verwendet. Die siBCL-xL transfizierten 786-O-Zellen wiesen eine vermehrte Apoptose in beiden verwendeten Assays auf. Der Unterschied zu Mock-transfizierten Zellen war dabei signifikant. Die Verwendung eines Caspase3/7-Assays ermöglichte die Messung der Caspase-Aktivität über einen Zeitraum von 18 Stunden. In beiden Zelllinien war eine gesteigerte Caspase-Aktivität über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die siRNA in dieser Zeit weiterhin aktiv ist und noch nicht wieder abgebaut wurde. Analog zur Transfektion mit siEZH2 war der Fold-Change der Herunterregulation der *BCL-xL*-Expression in 786-O-Zellen höher als in Caki-2-Zellen. Dies kann erklären, wieso die Apoptose in 786-O-Zellen signifikant erhöht ist, dieses Niveau in Caki-2-Zellen jedoch nicht erreicht wird. Eine durch *BCL-xL*-Inhibierung ausgelöste Apoptose wurde in Zellkulturen von Kolonkarzinomzelllinien (Scherr et al., 2016), Glioblastomzelllinien (Jiang et al., 2003) und Mesotheliomzelllinien (Cao et al., 2007) nachgewiesen. Andere Untersuchungen ergaben keinen Einfluss eines *BCL-xL*-Knockdowns auf Proliferation, Migration oder Apoptose (Koehler et al., 2013). In einigen dieser Studien wurde ein nicht selektiver *BCL2*-Inhibitor (Navitoclax) verwendet, der auch die Funktion von *BCL-xL* hemmt und derzeit in klinischen Studien zum Einsatz kommt. Durch die Arbeit mit pharmakologischen *BCL-xL*-Inhibitoren wurde vermehrt gezeigt, dass die Apoptoseinduktion bei *BCL-xL*-Hemmung nicht in allen untersuchten Zellen nachweisbar war, dass allerdings durch die Inhibitoren eine vermehrte apoptotische Antwort auf cytotoxische Substanzen gemessen werden konnte (Oltersdorf et al., 2005). Die Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und LNCaP waren beispielsweise nach *BCL-xL*-Inhibierung sehr viel sensitiver für Behandlungen mit Paclitaxel oder Docotaxel (Lebedeva et al., 2000). Ähnliches konnte für UV-Sensitivität bei der Lungenkarzinomzelllinie A549 beobachtet werden (Taylor et al., 1999). Es bleibt demnach offen, ob in Nierenzellen die Hemmung von *BCL-xL* direkt zur Apoptose führt, oder ob durch den Versuchsablauf die Zellen stärker auf den Stress, dem sie ausgesetzt waren, reagierten, wenn zuvor eine Inhibierung des anti-apoptotischen *BCL-xL* erfolgte. *BCL-2*-Familien-Inhibitoren wie Navitoclax scheinen in erster Linie für Kombinationstherapien interessant zu sein.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen die vorbekannten genetischen Aberrationen auf den Chromosomen 1q, 7q, 9p und 20q an zwei unabhängigen Kohorten für die Prognosestellung in klarzelligem Nierenzellkarzinomen zu validieren und die Verwendung auf paraffineingebetteten Gewebeschnitten zu etablieren. Zur weiteren Verbesserung der Prognose anhand chromosomaler Aberrationen wurde aus den gewonnenen Daten ein neuer Risikoscore errechnet, welcher sich aus dem TNSA und der T-Kategorie der Tumore zusammensetzt und zur Risikostratifizierung dient. Dieser Score ist für die Einschätzung der Metastasierungswahrscheinlichkeit besser geeignet als die bekannten pathologischen, klinischen und anatomischen Parameter und der Leibovich-Score. Anhand einer zweiten Kohorte konnte dieser neue Risikoscore validiert werden. Die Verwendung dieses Verfahrens kann nicht nur einen Progress in primär nicht-metastasierten Tumoren abschätzen, sondern ist auch für die Vorhersage des Überlebens der Patienten geeignet.

In weiterführenden Untersuchungen sollte zunächst die intratumorale Heterogenität der Nierenzellkarzinome und deren Einfluss auf die Integrität des genetischen Scores überprüft werden. Als intratumorale Heterogenität (IHT) wird das Vorhandensein genetisch unterschiedlicher Subklone im selben Tumor bezeichnet. Die NZKs werden als heterogene Tumore beschrieben, da selbst das bekannte Treiber-gen VHL unterschiedlich häufig und mitunter an verschiedenen Positionen im Gen einzelner Tumore mutiert ist. Über die nötige Anzahl an Tumorproben, die für die Untersuchung molekulargenetischer Veränderungen nötig sind, besteht noch kein Konsens (Beksac et al., 2017). Gerlinger et al. demonstrierten, dass die IHT mit jedem weiteren untersuchten Tumorareal zunimmt, schlossen in ihrer Analyse jedoch nur sehr große und bereits fortgeschrittene Tumore ein (Gerlinger et al., 2012). In einer Studie von Sankin et al. wurde IHT in 21% der untersuchten Tumore festgestellt. Alle heterogenen Tumore waren in diesem Fall $\geq T3a$ und es fand im Vorfeld keine exakte pathologische Einschätzung der gewählten Areale statt, was zur Schlussfolgerung führte, dass drei Tumorareale untersucht werden sollten, um eine potentielle IHT nicht zu übersehen (Sankin et al., 2014). Zu einem anderen Ergebnis kamen Serie et al., obwohl sie eine vergleichbare IHT von 22% in ihren Tumoren nachweisen konnten. Die Empfehlung, basierend auf den Ergebnissen dieser Studie, ist, dass für Biomarkerstudien die Untersuchung nur eines Areals bei Verwendung der Region mit den pathologisch aggressivsten Eigenschaften ausreichend ist (Serie et al., 2017). Der beste Ansatz ist vermutlich, ähnlich wie bei Rini et al. 2015 beschrieben, zu testen, ob die speziell in den durchgeführten Untersuchungen verwendeten Gene einer IHT unterliegen und darauf basierend einzuschätzen, ob ein Tumorareal ausreichend

ist oder mehrere analysiert werden sollten. Dies wurde für die untersuchten chromosomalen Aberrationen und Gene nicht durchgeführt, ist allerdings sinnvoll, wenn weiterführende Studien unternommen werden sollten. Bei der Interpretation der Ergebnisse der FISH-Analysen sowie beim Vergleich der Expressionsdaten mit anderen Studienkohorten muss dies als möglicher Grund für Probleme der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Da der TNSA durch Abschluss dieser Arbeit nun multizentrisch und unabhängig validiert wurde, kann mit der Analyse eines prospektiven Kollektivs begonnen werden. Dieser Schritt ist für die Etablierung eines prognostischen Tests erforderlich. Zudem sollte der hier entwickelte Risikoscore mit dem neu publizierten, verbesserten Leibovich-Score und mit, an die aktuelle TNM-Klassifikation angepassten, überarbeiteten Parametern erneut verglichen werden.

Um zu überprüfen, ob mit den ermittelten Kopienzahlveränderungen auch eine Dysregulation von Genen einhergeht, wurde eine erweiterte Analyse der TCGA Daten durchgeführt und potentiell metastasierungsassoziierte Gene in den untersuchten Regionen identifiziert. Von diesen konnten sechs Gene durch q-RT-PCR-Analysen bestätigt werden, deren deregulierte Expression sowohl mit einer Progression als auch einem verkürzten Überleben einhergehen. Die Verwendung der Genexpression für die Prognose wäre somit ebenfalls möglich, bedarf jedoch einer Validierung der verwendeten Cut-Offs.

In Zellkulturversuchen wurden die beiden möglicherweise therapielevanten Gene *EZH2* und *BCL-xL* funktionell charakterisiert. Es ergab sich kein Einfluss auf die Zellkulturen durch eine Hemmung von *EZH2*. Durch Inhibition von *BCL-xL* konnte Apoptose in den Nierentumorzelllinien ausgelöst, jedoch keine Veränderung des Migrations- oder Proliferationsverhaltens untersucht werden. Da ein *BCL-xL* Inhibitor bereits in klinischen Studien getestet wird, ist es denkbar, diesen pharmakologischen Hemmer anstelle von siRNA in zukünftigen Untersuchungen zu testen. Zudem kommen noch weitere Gene infrage, die an der Regulation des selben Signalwegs beteiligt sind. In weiterführenden Studien sollte die Proteinexpression der inhibierten Gene und ihrer Targets bei Transfektion mitbetrachtet werden. Da *EZH2* ein epigenetischer Regulator ist, wäre es ebenfalls denkbar das Methylierungsprofil der Tumore mit und ohne erhöhter *EZH2*-Expression zu untersuchen und mit der Metastasierung zu korrelieren. Es ist weiterhin denkbar andere, bisher nicht untersuchte Gene, wie beispielsweise *S100A10*, funktionell zu charakterisieren.

Zusammenfassend ist es in dieser Arbeit gelungen den genetischen Prognosenscore TNSA zu validieren und dessen Anwendbarkeit zu erweitern. Da die personalisierte Medizin speziell in

der Krebstherapie zunehmend an Bedeutung gewinnt, ist die Etablierung von präzisen, individuellen, auf die genetische Beschaffenheit der Tumore ausgelegten Diagnose- und Prognosemarkern aktuell hochbrisant. Mit dem hier etablierten Risikoscore steht ein validiertes Instrument zur Verfügung, welches die Identifikation von Patienten mit einem hohen Metastasierungsrisiko ermöglicht und die individuelle Nachsorge für Patienten maßgeblich verbessern könnte.

III. Literatur

1. Adams, K.F., Leitzmann, M.F., Albanes, D., Kipnis, V., Moore, S.C., Schatzkin, A., and Chow, W.-H. (2008). Body Size and Renal Cell Cancer Incidence in a Large US Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* *168*, 268–277.
2. Alcaraz, A., Takahashi, S., Brown, J.A., Herath, J.F., Bergstralh, E.J., Larson-Keller, J.J., Lieber, M.M., and Jenkins, R.B. (1994). Aneuploidy and Aneusomy of Chromosome 7 Detected by Fluorescence in Situ Hybridization Are Markers of Poor Prognosis in Prostate Cancer. *Cancer Res.* *54*, 3998–4002.
3. Alix-Panabières, C., Riethdorf, S., and Pantel, K. (2008). Circulating Tumor Cells and Bone Marrow Micrometastasis. *Clin. Cancer Res.* *14*, 5013–5021.
4. Amin, M.B., Crotty, T.B., Tickoo, S.K., and Farrow, G.M. (1997). Renal oncocytoma: a reappraisal of morphologic features with clinicopathologic findings in 80 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* *21*, 1–12.
5. Applied Biosystems Inc. (2008). Reduced siRNA Concentrations Lead to Fewer Off-Target Effects. 2008 *TechNotes*.
6. Arai, E., Ushijima, S., Tsuda, H., Fujimoto, H., Hosoda, F., Shibata, T., Kondo, T., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S., et al. (2008). Genetic Clustering of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Based on Array-Comparative Genomic Hybridization: Its Association with DNA Methylation Alteration and Patient Outcome. *Clin. Cancer Res.* *14*, 5531–5539.
7. Baldewijns, M.M., van Vlodrop, I.J., Vermeulen, P.B., Soetekouw, P.M., van Engeland, M., and de Bruïne, A.P. (2010). VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. *J. Pathol.* *221*, 125–138.
8. Bayani, J., and Squire, J.A. (2007). Application and interpretation of FISH in biomarker studies. *Cancer Lett.* *249*, 97–109.
9. Bayani, J., Selvarajah, S., Maire, G., Vukovic, B., Al-Romaih, K., Zielenska, M., and Squire, J.A. (2007). Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Semin. Cancer Biol.* *17*, 5–18.
10. Bellocco, R., Pasquali, E., Rota, M., Bagnardi, V., Tramacere, I., Scotti, L., Pelucchi, C., Boffetta, P., Corrao, G., and La Vecchia, C. (2012). Alcohol drinking and risk of renal cell carcinoma: results of a meta-analysis. *Ann. Oncol.* *23*, 2235–2244.
11. Beroukhi, R., Brunet, J.-P., Di Napoli, A., Mertz, K.D., Seeley, A., Pires, M.M., Linhart, D., Worrell, R.A., Moch, H., Rubin, M.A., et al. (2009). Patterns of gene expression and copy-number alterations in VHL disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res.* *69*, 4674–4681.
12. Beuselinck, B., Job, S., Becht, E., Karadimou, A., Verkarre, V., Couchy, G., Giraldo, N., Rioux-Leclercq, N., Molinié, V., Sibony, M., et al. (2015a). Molecular Subtypes of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Are Associated with Sunitinib Response in the Metastatic Setting. *Clin. Cancer Res.* *21*, 1329–1339.
13. Beuselinck, B., Job, S., Becht, E., Karadimou, A., Verkarre, V., Couchy, G., Giraldo, N., Rioux-Leclercq, N., Molinié, V., Sibony, M., et al. (2015b). Molecular Subtypes of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Are Associated with Sunitinib Response in the Metastatic Setting. *Clin. Cancer Res.* *21*, 1329–1339.

14. Beuselinck, B., Verbiest, A., Couchy, G., Job, S., Reynies, A. de, Meiller, C., Albersen, M., Verkarre, V., Lerut, E., Méjean, A., et al. (2017). Pro-angiogenic gene expression is associated with better outcome on sunitinib in metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Acta Oncol.* *0*, 1–11.
15. Bex, A., Albiges, L., Ljungberg, B., Bensalah, K., Dabestani, S., Giles, R.H., Hofmann, F., Hora, M., Kuczyk, M.A., Lam, T.B., et al. (2017). Updated European Association of Urology Guidelines Regarding Adjuvant Therapy for Renal Cell Carcinoma. *Eur. Urol.* *71*, 719–722.
16. Bharadwaj, A., Bydoun, M., Holloway, R., and Waisman, D. (2013). Annexin A2 Heterotetramer: Structure and Function. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 6259–6305.
17. Bianchi, M., Sun, M., Jeldres, C., Shariat, S.F., Trinh, Q.-D., Briganti, A., Tian, Z., Schmitges, J., Graefen, M., Perrotte, P., et al. (2012). Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis. *Ann. Oncol.* *23*, 973–980.
18. Bundayi, A., Hamilton, Z.A., McDonald, M.L., Yim, K., Millard, F., McKay, R.R., Campbell, S.C., Rini, B.I., and Derweesh, I.H. (2017). Neoadjuvant therapy for localized and locally advanced renal cell carcinoma. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*
19. Bissig, H., Richter, J., Desper, R., Meier, V., Schraml, P., Schäffer, A.A., Sauter, G., Mihatsch, M.J., and Moch, H. (1999). Evaluation of the Clonal Relationship between Primary and Metastatic Renal Cell Carcinoma by Comparative Genomic Hybridization. *Am. J. Pathol.* *155*, 267–274.
20. Blumenfeld, A.J., Guru, K., Fuchs, G.J., and Kim, H.L. (2010). Percutaneous Biopsy of Renal Cell Carcinoma Underestimates Nuclear Grade. *Urology* *76*, 610–613.
21. Boelens, M.C., Kok, K., Vlies, P. van der, Vries, G. van der, Sietsma, H., Timens, W., Postma, D.S., Groen, H.J.M., and Berg, A. van den (2009). Genomic aberrations in squamous cell lung carcinoma related to lymph node or distant metastasis. *Lung Cancer* *66*, 372–378.
22. Boffetta, P., Fontana, L., Stewart, P., Zaridze, D., Szeszenia-Dabrowska, N., Janout, V., Bencko, V., Foretova, L., Jinga, V., Matveev, V., et al. (2011). Occupational exposure to arsenic, cadmium, chromium, lead and nickel, and renal cell carcinoma: a case–control study from Central and Eastern Europe. *Occup. Env. Med* *68*, 723–728.
23. Bracken, A.P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., and Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* *22*, 5323–5335.
24. Brannon, A.R., Reddy, A., Seiler, M., Arreola, A., Moore, D.T., Pruthi, R.S., Wallen, E.M., Nielsen, M.E., Liu, H., Nathanson, K.L., et al. (2010). Molecular Stratification of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Consensus Clustering Reveals Distinct Subtypes and Survival Patterns. *Genes Cancer* *1*, 152–163.
25. Broad Institute of MIT and Harvard (2016). Correlation between copy number variation genes (focal events) and selected clinical features.
26. Brodaczewska, K.K., Szczylik, C., Fiedorowicz, M., Porta, C., and Czarnecka, A.M. (2016). Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Mol. Cancer* *15*, 83.
27. Brugarolas, J. (2013). PBRM1 and BAP1 as Novel Targets for Renal Cell Carcinoma. *Cancer J. Sudbury Mass* *19*, 324–332.

28. Brunelli, M., Eccher, A., Gobbo, S., Ficarra, V., Novara, G., Cossu-Rocca, P., Bonetti, F., Menestrina, F., Cheng, L., Eble, J.N., et al. (2007). Loss of chromosome 9p is an independent prognostic factor in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Mod. Pathol.* *21*, 1–6.
29. Bui, M.H.T., Seligson, D., Han, K., Pantuck, A.J., Dorey, F.J., Huang, Y., Horvath, S., Leibovich, B.C., Chopra, S., Liao, S.-Y., et al. (2003). Carbonic Anhydrase IX Is an Independent Predictor of Survival in Advanced Renal Clear Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *9*, 802–811.
30. Calle, E.E., and Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 579–591.
31. Cao, X., Rodarte, C., Zhang, L., Morgan, C.D., Littlejohn, J., and Smythe, W.R. (2007). Bcl2/bcl-xL inhibitor engenders apoptosis and increases chemosensitivity in mesothelioma. *Cancer Biol. Ther.* *6*, 246–252.
32. Capitanio, U., Cloutier, V., Zini, L., Isbarn, H., Jeldres, C., Shariat, S.F., Perrotte, P., Antebi, E., Patard, J.-J., Montorsi, F., et al. (2009). A critical assessment of the prognostic value of clear cell, papillary and chromophobe histological subtypes in renal cell carcinoma: a population-based study. *BJU Int.* *103*, 1496–1500.
33. Caraway, N.P., Khanna, A., Fernandez, R.L., Payne, L., Bassett, R.L., Zhang, H.-Z., Kamat, A., and Katz, R.L. (2010). Fluorescence in situ hybridization for detecting urothelial carcinoma: A clinicopathological study. *Cancer Cytopathol.* *118*, 259–268.
34. Chari, N.S., and McDonnell, T.J. (2007). The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. *Adv. Anat. Pathol.* *14*, 344–352.
35. Chatterjee, S., Azad, B.B., and Nimmagadda, S. (2014). The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. *Adv. Cancer Res.* *124*, 31–82.
36. Chen, S., Huang, L., Sun, K., Wu, D., Li, M., Li, M., Zhong, B., Chen, M., and Zhang, S. (2015). Enhancer of Zeste Homolog 2 as an Independent Prognostic Marker for Cancer: A Meta-Analysis. *Plos One* *10*, e0125480.
37. Cheungpasitporn, W., Thongprayoon, C., O’Corragain, O.A., Edmonds, P.J., Ungprasert, P., Kittanamongkolchai, W., and Erickson, S.B. (2015). The risk of kidney cancer in patients with kidney stones: a systematic review and meta-analysis. *QJM Int. J. Med.* *108*, 205–212.
38. Chiang, A.C., and Massagué, J. (2008). Molecular Basis of Metastasis. *N. Engl. J. Med.* *359*, 2814–2823.
39. Choi, J.E., You, J.H., Kim, D.K., Rha, K.H., and Lee, S.H. (2015). Comparison of Perioperative Outcomes Between Robotic and Laparoscopic Partial Nephrectomy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur. Urol.* *67*, 891–901.
40. Choi, K.-S., Fogg, D.K., Yoon, C.-S., and Waisman, D.M. (2003). p11 Regulates extracellular plasmin production and invasiveness of HT1080 fibrosarcoma cells. *FASEB J.* *17*, 235–246.
41. Choueiri, T.K., and Motzer, R.J. (2017). Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma. <http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMra1601333> *376*, 354–366.
42. Choueiri, T.K., Escudier, B., Powles, T., Tannir, N.M., Mainwaring, P.N., Rini, B.I., Hammers, H.J., Donskov, F., Roth, B.J., Peltola, K., et al. (2016a). Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *17*, 917–927.

43. Choueiri, T.K., Fishman, M.N., Escudier, B., McDermott, D.F., Drake, C.G., Kluger, H., Stadler, W.M., Perez-Gracia, J.L., McNeel, D.G., Curti, B., et al. (2016b). Immunomodulatory Activity of Nivolumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 5461–5471.
44. Chow, W.-H., Dong, L.M., and Devesa, S.S. (2010). Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat. Rev. Urol.* 7, 245–257.
45. Chyhrari, A., Sanjmyatav, J., Gajda, M., Reichelt, O., Wunderlich, H., Steiner, T., Tanović, E., and Junker, K. (2010). Multi-colour FISH on preoperative renal tumour biopsies to confirm the diagnosis of uncertain renal masses. *World J. Urol.* 28, 269–274.
46. Clague, J., Lin, J., Cassidy, A., Matin, S., Tannir, N.M., Tamboli, P., Wood, C.G., and Wu, X. (2009). Family history and risk of Renal Cell Carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 18, 801–807.
47. Cox, D.R. (1972). Regression Models and Life-Tables. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 34, 187–220.
48. Crispen, P.L., Boorjian, S.A., Lohse, C.M., Leibovich, B.C., and Kwon, E.D. (2008). Predicting disease progression after nephrectomy for localized renal cell carcinoma: The utility of prognostic models and molecular biomarkers. *Cancer* 113, 450–460.
49. Cumberbatch, M.G., Rota, M., Catto, J.W.F., and La Vecchia, C. (2016). The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur. Urol.* 70, 458–466.
50. Curado, M.-P., Edwards, B., Shin, H.R., Storm, H., Ferlay, J., Heanue, M., Boyle, P., and others (2007). Cancer incidence in five continents, Volume IX. (IARC Press, International Agency for Research on Cancer).
51. Dabestani, S., Thorstenson, A., Lindblad, P., Harmenberg, U., Ljungberg, B., and Lundstam, S. (2016). Renal cell carcinoma recurrences and metastases in primary non-metastatic patients: a population-based study. *World J. Urol.* 34, 1081–1086.
52. Dagher, J., Delahunt, B., Rioux-Leclercq, N., Egevad, L., Srigley, J.R., Coughlin, G., Dunnglison, N., Gianduzzo, T., Kua, B., Malone, G., et al. (2017). Clear cell renal cell carcinoma: Validation of WHO/ISUP grading. *Histopathology*.
53. Delahunt, B., and Eble, J.N. (1997). Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 10, 537–544.
54. Delahunt, B., Eble, J.N., McCredie, M.R., Bethwaite, P.B., Stewart, J.H., and Bilous, A.M. (2001). Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum. Pathol.* 32, 590–595.
55. Delahunt, B., Cheville, J.C., Martignoni, G., Humphrey, P.A., Magi-galluzzi, C., Mckenney, J., Egevad, L., Algaba, F., Moch, H., Grignon, D.J., et al. (2013). The International Society of Urological Pathology (isup) Grading System for Renal Cell Carcinoma and Other Prognostic Parameters. *Am. J. Surg. Pathol.* 37, 1490–1504.
56. Delahunt, B., Egevad, L., Samaratunga, H., Varma, M., Verrill, C., Cheville, J., Kristiansen, G., Corbishley, C., and Berney, D.M. (2017). UICC drops the ball in the 8th edition TNM staging of urological cancers. *Histopathology* 71, 5–11.

57. Deutsche Krebsgesellschaft, AWMF, and Deutsche Krebshilfe (2017). Leitlinienprogramm Onkologie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion.
58. Domoto, T., Miyama, Y., Suzuki, H., Teratani, T., Arai, K., Sugiyama, T., Takayama, T., Mugiya, S., Ozono, S., and Nozawa, R. (2007). Evaluation of S100A10, annexin II and B-FABP expression as markers for renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* *98*, 77–82.
59. Dormoy, V., Danilin, S., Lindner, V., Thomas, L., Rothhut, S., Coquard, C., Helwig, J.-J., Jacqmin, D., Lang, H., and Massfelder, T. (2009). The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Mol. Cancer* *8*, 123.
60. Duns, G., Berg, E. van den, Duivenbode, I. van, Osinga, J., Hollema, H., Hofstra, R.M.W., and Kok, K. (2010). Histone Methyltransferase Gene SETD2 Is a Novel Tumor Suppressor Gene in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* *70*, 4287–4291.
61. Eble, J., Sesterhenn, I., Sauter, G., and Epstein, J. (2004). Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs (Lyon: World Health Organization).
62. Edge, S.B., and Compton, C.C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.* *17*, 1471–1474.
63. Elfving, P., Mandahl, N., Lundgren, R., Limon, J., Bak-Jensen, E., Fernö, M., Olsson, H., and Mitelman, F. (1997). Prognostic implications of cytogenetic findings. *Br. J. Urol.* *80*, 698–706.
64. El-Mokadem, I., Fitzpatrick, J., Bondad, J., Rauchhaus, P., Cunningham, J., Pratt, N., Fleming, S., and Nabi, G. (2014). Chromosome 9p deletion in clear cell renal cell carcinoma predicts recurrence and survival following surgery. *Br. J. Cancer* *111*, 1381–1390.
65. Erlmeier, F., Weichert, W., Schrader, A.J., Autenrieth, M., Hartmann, A., Steffens, S., and Ivanyi, P. (2017). Prognostic impact of PD-1 and its ligands in renal cell carcinoma. *Med. Oncol.* *34*, 99.
66. Escudier, B., Porta, C., Schmidinger, M., Rioux-Leclercq, N., Bex, A., Khoo, V., Gruenvald, V., and Horwich, A. (2016). Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* *27*, v58–v68.
67. Essletzbichler, P., Konopka, T., Santoro, F., Chen, D., Gapp, B.V., Kralovics, R., Brummelkamp, T.R., Nijman, S.M.B., and Bürckstümmer, T. (2014). Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res.* *24*, 2059–2065.
68. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D., and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer* *49*, 1374–1403.
69. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* *136*, E359–E386.
70. Ficarra, V., Martignoni, G., Maffei, N., Brunelli, M., Novara, G., Zanolla, L., Pea, M., and Artibani, W. (2005). Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system. *Cancer* *103*, 68–75.

71. Ficarra, V., Martignoni, G., Galfano, A., Novara, G., Gobbo, S., Brunelli, M., Pea, M., Zattoni, F., and Artibani, W. (2006). Prognostic role of the histologic subtypes of renal cell carcinoma after slide revision. *Eur. Urol.* *50*, 786–793; discussion 793–794.
72. Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 453–458.
73. Flaherty, K.T., Fuchs, C.S., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Speizer, F.E., Willett, W.C., and Curhan, G.C. (2005). A Prospective Study of Body Mass Index, Hypertension, and Smoking and the Risk of Renal Cell Carcinoma (United States). *Cancer Causes Control* *16*, 1099–1106.
74. FRANK, I., BLUTE, M.L., CHEVILLE, J.C., LOHSE, C.M., WEAVER, A.L., and ZINCKE, H. (2002). An Outcome Prediction Model for Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma Treated with Radical Nephrectomy Based on Tumor Stage, Size, Grade and Necrosis: The Ssign Score. *J. Urol.* *168*, 2395–2400.
75. Fuhrman, S.A.M.D., Lasky, L.C.M.D., and Limas, C.M.D. (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *J. Surg. Pathol.* *6*, 655–664.
76. Galfano, A., Novara, G., Iafrate, M., Cavalleri, S., Martignoni, G., Gardiman, M., D’Elia, C., Patard, J.J., Artibani, W., and Ficarra, V. (2008). Mathematical models for prognostic prediction in patients with renal cell carcinoma. *Urol. Int.* *80*, 113–123.
77. Gao, C., Su, Y., Koeman, J., Haak, E., Dykema, K., Essenberg, C., Hudson, E., Petillo, D., Khoo, S.K., and Vande Woude, G.F. (2016). Chromosome instability drives phenotypic switching to metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 14793–14798.
78. Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., et al. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* *366*, 883–892.
79. Gerlinger, M., Catto, J.W., Orntoft, T.F., Real, F.X., Zwarthoff, E.C., and Swanton, C. (2015). Intratumour Heterogeneity in Urologic Cancers: From Molecular Evidence to Clinical Implications. *Eur. Urol.* *67*, 729–737.
80. Gilkes, D.M., and Semenza, G.L. (2013). Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. *Future Oncol. Lond. Engl.* *9*, 1623–1636.
81. Girgis, A.H., Iakovlev, V.V., Beheshti, B., Bayani, J., Squire, J.A., Bui, A., Mankaruos, M., Youssef, Y., Khalil, B., Khella, H., et al. (2012). Multilevel Whole-Genome Analysis Reveals Candidate Biomarkers in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* *72*, 5273–5284.
82. Gonzalez, H.C., Lamerato, L., Rogers, C.G., and Gordon, S.C. (2015). Chronic Hepatitis C Infection as a Risk Factor for Renal Cell Carcinoma. *Dig. Dis. Sci.* *60*, 1820–1824.
83. Gowrishankar, B., Cahill, L., Arndt, A.E., Al-Ahmadie, H., Lin, O., Chadalavada, K., Chaganti, S., Nanjangud, G.J., Murty, V.V., Chaganti, R.S.K., et al. (2014). Subtyping of renal cortical neoplasms in fine needle aspiration biopsies using a decision tree based on genomic alterations detected by fluorescence in situ hybridization. *BJU Int.* *114*, 881–890.
84. Gratzke, C., Seitz, M., Bayrle, F., Schlenker, B., Bastian, P.J., Haseke, N., Bader, M., Tilki, D., Roosen, A., Karl, A., et al. (2009). Quality of life and perioperative outcomes after retroperitoneoscopic radical nephrectomy (RN), open RN and nephron-sparing surgery in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int.* *104*, 470–475.

85. Grawitz, P. (1883). Die sogenannten Lipome der Niere. *Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med.* 93, 39–63.
86. Gronwald, J., Störkel, S., Holtgreve-Grez, H., Hadaczek, P., Brinkschmidt, C., Jauch, A., Lubinski, J., and Cremer, T. (1997). Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinomas and metastatic sites: Importance of 1q and 3p copy number changes in metastatic events. *ResearchGate* 57, 481–487.
87. Gu, L., Li, H., Chen, L., Ma, X., Gao, Y., Li, X., Zhang, Y., Fan, Y., and Zhang, X. (2015). MicroRNAs as prognostic molecular signatures in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 6, 32545–32560.
88. Guðmundsson, E., Hellborg, H., Lundstam, S., Erikson, S., and Ljungberg, B. (2011). Metastatic Potential in Renal Cell Carcinomas ≤ 7 cm: Swedish Kidney Cancer Quality Register Data. *Eur. Urol.* 60, 975–982.
89. Gulati, S., Martinez, P., Joshi, T., Birkbak, N.J., Santos, C.R., Rowan, A.J., Pickering, L., Gore, M., Larkin, J., Szallasi, Z., et al. (2014). Systematic Evaluation of the Prognostic Impact and Intratumour Heterogeneity of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Biomarkers. *Eur. Urol.* 66, 936–948.
90. Gunawan, B., Huber, W., Holtrup, M., von Heydebreck, A., Efferth, T., Poustka, A., Ringert, R.H., Jakse, G., and Füzesi, L. (2001). Prognostic impacts of cytogenetic findings in clear cell renal cell carcinoma: gain of 5q31-qter predicts a distinct clinical phenotype with favorable prognosis. *Cancer Res.* 61, 7731–7738.
91. Haas, N.B., Manola, J., Uzzo, R.G., Flaherty, K.T., Wood, C.G., Kane, C., Jewett, M., Dutcher, J.P., Atkins, M.B., Pins, M., et al. (2016). Adjuvant sunitinib or sorafenib for high-risk, non-metastatic renal-cell carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. *The Lancet* 387, 2008–2016.
92. Hakimi, A.A., Ostrovskaya, I., Reva, B., Schultz, N., Chen, Y.-B., Gonen, M., Liu, H., Takeda, S., Voss, M.H., Tickoo, S.K., et al. (2013). Adverse Outcomes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma with Mutations of 3p21 Epigenetic Regulators BAP1 and SETD2: A Report by MSKCC and the KIRC TCGA Research Network. *Clin. Cancer Res.* 19, 3259–3267.
93. Haugh, A.M., Njauw, C.-N., Buble, J.A., Verzì, A.E., Zhang, B., Kudalkar, E., VandenBoom, T., Walton, K., Swick, B.L., Kumar, R., et al. (2017). Genotypic and Phenotypic Features of BAP1 Cancer Syndrome: A Report of 8 New Families and Review of Cases in the Literature. *JAMA Dermatol.*
94. Heinzelmann, J., Unrein, A., Wickmann, U., Baumgart, S., Stapf, M., Szendroi, A., Grimm, M.-O., Gajda, M.R., Wunderlich, H., and Junker, K. (2014). MicroRNAs with Prognostic Potential for Metastasis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: A Comparison of Primary Tumors and Distant Metastases. *Ann. Surg. Oncol.* 21, 1046–1054.
95. Heng, D.Y.C., Xie, W., Regan, M.M., Warren, M.A., Golshayan, A.R., Sahi, C., Eigl, B.J., Ruether, J.D., Cheng, T., North, S., 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, 5794–5799.
96. Hergovich, A., Lisztwan, J., Barry, R., Ballschmieter, P., and Krek, W. (2003). Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat. Cell Biol.* 5, 64–70.

97. Ho, T.H., Kapur, P., Eckel-Passow, J.E., Christie, A., Joseph, R.W., Serie, D.J., Cheville, J.C., Thompson, R.H., Homayoun, F., Panwar, V., et al. (2017). Multicenter Validation of Enhancer of Zeste Homolog 2 Expression as an Independent Prognostic Marker in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* *35*, 3706-+.
98. Hock, L.M., Lynch, J., and Balaji, K.C. (2002). INCREASING INCIDENCE OF ALL STAGES OF KIDNEY CANCER IN THE LAST 2 DECADES IN THE UNITED STATES: AN ANALYSIS OF SURVEILLANCE, EPIDEMIOLOGY AND END RESULTS PROGRAM DATA. *J. Urol.* *167*, 57-60.
99. Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., Miller, D., Bishop, K., Kosary, C., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., et al. (2017). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014 (Bethesda, MD: National Cancer Institute).
100. Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I., et al. (2007). Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* *356*, 2271-2281.
101. Hunt, J.D., van der Hel, O.L., McMillan, G.P., Boffetta, P., and Brennan, P. (2005). Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: Meta-analysis of 24 studies. *Int. J. Cancer* *114*, 101-108.
102. Khan, M., M. Czarnecka, A., Duchnowska, R., Kukwa, W., and Szczylik, C. (2013). Metastasis-Initiating Cells in Renal Cancer. *Curr. Signal Transduct. Ther.* *8*, 240-246.
103. Iacovelli, R., Nolè, F., Verri, E., Renne, G., Paglino, C., Santoni, M., Cossu Rocca, M., Giglione, P., Aurilio, G., Cullurà, D., et al. (2016). Prognostic Role of PD-L1 Expression in Renal Cell Carcinoma. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Target. Oncol.* *11*, 143-148.
104. Islam, S., Bayat Mokhtari, R., Noman, A.S., Uddin, M., Rahman, M.Z., Azadi, M., Zlotta, A., Van der Kwast, T., Yeager, H., and Farhat, W. (2015). Sonic hedgehog (SHH) signaling promotes tumorigenicity and stemness via activation of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in bladder cancer. *Mol. Carcinog.* *55*.
105. Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.-M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A. von, Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., et al. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science* *292*, 468-472.
106. Jacobsen, J., Grankvist, K., Rasmuson, T., Bergh, A., Landberg, G., and Ljungberg, B. (2004). Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. *BJU Int.* *93*, 297-302.
107. Jayson, M., and Sanders, H. (1998). Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology* *51*, 203-205.
108. Jewett, M.A.S., Mattar, K., Basiuk, J., Morash, C.G., Pautler, S.E., Siemens, D.R., Tanguay, S., Rendon, R.A., Gleave, M.E., Drachenberg, D.E., et al. (2011). Active surveillance of small renal masses: progression patterns of early stage kidney cancer. *Eur. Urol.* *60*, 39-44.
109. Jiang, Z., Zheng, X., and Rich, K.M. (2003). Down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL expression with bispecific antisense treatment in glioblastoma cell lines induce cell death. *J. Neurochem.* *84*, 273-281.

110. Jilg, C.A., Drendel, V., Bacher, J., Pisarski, P., Neeff, H., Drognitz, O., Schwardt, M., Gläsker, S., Malinoc, A., Erlic, Z., et al. (2013). Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Prevalence of Renal Neoplasias in Surgical Kidney Specimens. *Nephron Clin. Pract.* *123*, 13–21.
111. Joseph, R.W., Kapur, P., Serie, D.J., Eckel-Passow, J.E., Parasramka, M., Ho, T., Chevillie, J.C., Frenkel, E., Rakheja, D., Brugarolas, J., et al. (2014). Loss of BAP1 protein expression is an independent marker of poor prognosis in patients with low-risk clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* *120*, 1059–1067.
112. Joshi, S., Tolkunov, D., Aviv, H., Hakimi, A.A., Yao, M., Hsieh, J.J., Ganesan, S., Chan, C.S., and White, E. (2015). The Genomic Landscape of Renal Oncocytoma Identifies a Metabolic Barrier to Tumorigenesis. *Cell Rep.* *13*, 1895–1908.
113. Junker, K., Ficarra, V., Kwon, E.D., Leibovich, B.C., Thompson, R.H., and Oosterwijk, E. (2013). Potential Role of Genetic Markers in the Management of Kidney Cancer. *Eur. Urol.* *63*, 333–340.
114. Kaelin, W.G. (2008). The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O2 sensing and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 865–873.
115. Kane, C.J., Mallin, K., Ritchey, J., Cooperberg, M.R., and Carroll, P.R. (2008). Renal cell cancer stage migration. *Cancer* *113*, 78–83.
116. Kaplan, E.L., and Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J. Am. Stat. Assoc.* *53*, 457–481.
117. Karakiewicz, P.I., Trinh, Q.-D., Bhojani, N., Bensalah, K., Salomon, L., de la Taille, A., Tostain, J., Cindolo, L., Altieri, V., Ficarra, V., et al. (2007). Renal Cell Carcinoma with Nodal Metastases in the Absence of Distant Metastatic Disease: Prognostic Indicators of Disease-Specific Survival. *Eur. Urol.* *51*, 1616–1624.
118. Karami, S., Boffetta, P., Brennan, P., Stewart, P.A., Zaridze, D., Matveev, V., Janout, V., Kollarova, H., Bencko, V., Navratilova, M., et al. (2011). Renal cancer risk and occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and plastics. *J. Occup. Environ. Med.* *53*, 218–223.
119. Kasiske, B.L., Snyder, J.J., Gilbertson, D.T., and Wang, C. (2004). Cancer after Kidney Transplantation in the United States. *Am. J. Transplant.* *4*, 905–913.
120. Kattan, M.W., Reuter, V., Motzer, R.J., Katz, J., and Russo, P. (2001). A Postoperative Prognostic Nomogram for Renal Cell Carcinoma. *J. Urol.* *166*, 63–67.
121. Kelsh, M.A., Alexander, D., Mink, P., and Mandel, J. (2010). Occupational Trichloroethylene Exposure and Kidney Cancer:... : *Epidemiology.* *vol 21*, pp 95-102.
122. Kim, H.L., Belldegrun, A.S., Freitas, D.G., Bui, M.H.T., Han, K., Dorey, F.J., and Figlin, R.A. (2003). Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J. Urol.* *170*, 1742–1746.
123. Kim, H.L., SELIGSON, D., LIU, X., JANZEN, N., BUI, M.H.T., YU, H., SHI, T., BELLDEGRUN, A.S., HORVATH, S., and FIGLIN, R.A. (2005). USING TUMOR MARKERS TO PREDICT THE SURVIVAL OF PATIENTS WITH METASTATIC RENAL CELL CARCINOMA. *J. Urol.* *173*, 1496–1501.

124. Kimura, Y., Noguchi, T., Kawahara, K., Kashima, K., Daa, T., and Yokoyama, S. (2004). Genetic alterations in 102 primary gastric cancers by comparative genomic hybridization: gain of 20q and loss of 18q are associated with tumor progression. *Mod. Pathol.* *17*, 1328–1337.
125. King, S.C., Pollack, L.A., Li, J., King, J.B., and Master, V.A. (2014). Continued Increase in Incidence of Renal Cell Carcinoma, Especially in Young Patients and High Grade Disease: United States 2001 to 2010. *J. Urol.* *191*, 1665–1670.
126. Klatte, T., Han, K., Said, J.W., Böhm, M., Allhoff, E.P., Kabbinar, F.F., Belldegrun, A.S., and Pantuck, A.J. (2008a). Pathobiology and prognosis of chromophobe renal cell carcinoma. *Urol. Oncol.* *26*, 604–609.
127. Klatte, T., Patard, J.-J., de Martino, M., Bensalah, K., Verhoest, G., de la Taille, A., Abbou, C.-C., Allhoff, E.P., Carrieri, G., Riggs, S.B., et al. (2008b). Tumor Size Does Not Predict Risk of Metastatic Disease or Prognosis of Small Renal Cell Carcinomas. *J. Urol.* *179*, 1719–1726.
128. Klatte, T., Seligson, D.B., LaRochelle, J., Shuch, B., Said, J.W., Riggs, S.B., Zomorodian, N., Kabbinar, F.F., Pantuck, A.J., and Belldegrun, A.S. (2009a). Molecular signatures of localized clear cell renal cell carcinoma to predict disease-free survival after nephrectomy. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *18*, 894–900.
129. Klatte, T., Rao, P.N., de Martino, M., LaRochelle, J., Shuch, B., Zomorodian, N., Said, J., Kabbinar, F.F., Belldegrun, A.S., and Pantuck, A.J. (2009b). Cytogenetic Profile Predicts Prognosis of Patients With Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* *27*, 746–753.
130. Klein, C.A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 302–312.
131. Klein, J.P., and Moeschberger, M.L. (2003). *Survival Analysis - Techniques for Censored and Truncated Data* (Springer, Berlin, Heidelberg).
132. Koehler, B.C., Scherr, A.-L., Lorenz, S., Urbanik, T., Kautz, N., Elssner, C., Welte, S., Bermejo, J.L., Jäger, D., and Schulze-Bergkamen, H. (2013). Beyond Cell Death – Antiapoptotic Bcl-2 Proteins Regulate Migration and Invasion of Colorectal Cancer Cells In Vitro. *PLOS ONE* *8*, e76446.
133. Koga, S., Tsuda, S., Nishikido, M., Ogawa, Y., Hayashi, K., Hayashi, T., and Kanetake, H. (2001). The diagnostic value of bone scan in patients with renal cell carcinoma. *J. Urol.* *166*, 2126–2128.
134. Köhn, L., Svenson, U., Ljungberg, B., and Roos, G. (2015). Specific genomic aberrations predict survival, but low mutation rate in cancer hot spots, in clear cell renal cell carcinoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* *23*, 334–342.
135. Korn, W.M., Yasutake, T., Kuo, W.L., Warren, R.S., Collins, C., Tomita, M., Gray, J., and Waldman, F.M. (1999). Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Genes. Chromosomes Cancer* *25*, 82–90.
136. Kotake, Y., Cao, R., Viatour, P., Sage, J., Zhang, Y., and Xiong, Y. (2007). pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. *Genes Dev.* *21*, 49–54.

137. Kovacs, G., Akhtar, M., Beckwith, B.J., Bugert, P., Cooper, C.S., Delahunt, B., Eble, J.N., Fleming, S., Ljungberg, B., Medeiros, L.J., et al. (1997). The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J. Pathol.* *183*, 131–133.
138. Kunkle, D.A., Crispen, P.L., Li, T., and Uzzo, R.G. (2007). Tumor Size Predicts Synchronous Metastatic Renal Cell Carcinoma: Implications for Surveillance of Small Renal Masses. *J. Urol.* *177*, 1692–1697.
139. Kyriakopoulos, C.E., Chittoria, N., Choueiri, T.K., Kroeger, N., Lee, J.-L., Srinivas, S., Knox, J.J., Bjarnason, G.A., Ernst, S.D., Wood, L.A., et al. (2015). Outcome of patients with metastatic sarcomatoid renal cell carcinoma: results from the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium. *Clin. Genitourin. Cancer* *13*, e79-85.
140. La Rochelle, J., Klatte, T., Dastane, A., Rao, N., Seligson, D., Said, J., Shuch, B., Zomorodian, N., Kabbinnavar, F., Belldgrun, A., et al. (2010). Chromosome 9p deletions identify an aggressive phenotype of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* *116*, 4696–4702.
141. Lam, J.S., Klatte, T., Kim, H.L., Patard, J.-J., Breda, A., Zisman, A., Pantuck, A.J., and Figlin, R.A. (2008). Prognostic factors and selection for clinical studies of patients with kidney cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *65*, 235–262.
142. Lane, B.R., Campbell, S.C., and Gill, I.S. (2013). 10-Year Oncologic Outcomes After Laparoscopic and Open Partial Nephrectomy. *J. Urol.* *190*, 44–49.
143. Latif, F., Tory, K., Gnarra, J., Yao, M., Duh, F.M., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., et al. (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* *260*, 1317–1320.
144. Lebedeva, I., Rando, R., Ojwang, J., Cossum, P., and Stein, C.A. (2000). Bcl-xL in Prostate Cancer Cells: Effects of Overexpression and Down-Regulation on Chemosensitivity. *Cancer Res.* *60*, 6052–6060.
145. Lee, C., You, D., Park, J., Jeong, I.G., Song, C., Hong, J.H., Ahn, H., and Kim, C.-S. (2011). Validation of the 2009 TNM Classification for Renal Cell Carcinoma: Comparison with the 2002 TNM Classification by Concordance Index. *Korean J. Urol.* *52*, 524–530.
146. Lee, J.E., Männistö, S., Spiegelman, D., Hunter, D.J., Bernstein, L., Brandt, P.A. van den, Buring, J.E., Cho, E., English, D.R., Flood, A., et al. (2009). Intakes of Fruit, Vegetables, and Carotenoids and Renal Cell Cancer Risk: A Pooled Analysis of 13 Prospective Studies. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* *18*, 1730–1739.
147. Leibovich, B.C., Blute, M.L., Cheville, J.C., Lohse, C.M., Frank, I., Kwon, E.D., Weaver, A.L., Parker, A.S., and Zincke, H. (2003). Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* *97*, 1663–1671.
148. Leibovich, B.C., Sheinin, Y., Lohse, C.M., Thompson, R.H., Cheville, J.C., Zavada, J., and Kwon, E.D. (2007). Carbonic Anhydrase IX Is Not an Independent Predictor of Outcome for Patients With Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* *25*, 4757–4764.
149. Leibovich, B.C., Lohse, C.M., Crispen, P.L., Boorjian, S.A., Thompson, R.H., Blute, M.L., and Cheville, J.C. (2010). Histological Subtype is an Independent Predictor of Outcome for Patients With Renal Cell Carcinoma. *J. Urol.* *183*, 1309–1316.
150. Leibovich, B.C., Lohse, C.M., Cheville, J.C., Zaid, H.B., Boorjian, S.A., Frank, I., Thompson, R.H., and Parker, W.P. (2018). Predicting Oncologic Outcomes in Renal Cell Carcinoma After Surgery. *Eur. Urol.* *73*, 772–780.

151. Leite, K.R.M., Reis, S.T., Junior, J.P., Zerati, M., Gomes, D. de O., Camara-Lopes, L.H., and Srougi, M. (2015). PD-L1 expression in renal cell carcinoma clear cell type is related to unfavorable prognosis. *Diagn. Pathol.* *10*.
152. Levi, F., Ferlay, J., Galeone, C., Lucchini, F., Negri, E., Boyle, P., and La Vecchia, C. (2008). The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int.* *101*, 949–958.
153. Lewit-Bentley, A., Réty, S., Sopkova-de Oliveira Santos, J., and Gerke, V. (2000). S100-annexin complexes: some insights from structural studies. *Cell Biol. Int.* *24*, 799–802.
154. Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Fransen, E., Peeters, M., Lardon, F., De Wever, O., and Pauwels, P. (2012). Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One* *7*, e46536.
155. Liu, L., Xu, Z., Zhong, L., Wang, H., Jiang, S., Long, Q., Xu, J., and Guo, J. (2016). Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes tumour cell migration and invasion via epigenetic repression of E-cadherin in renal cell carcinoma. *BJU Int.* *117*, 351–362.
156. Ljungberg, B., Campbell, S.C., Cho, H.Y., Jacqmin, D., Lee, J.E., Weikert, S., and Kiemeny, L.A. (2011). The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur. Urol.* *60*, 615–621.
157. Ljungberg, B., Bensalah, K., Canfield, S., Dabestani, S., Hofmann, F., Hora, M., Kuczyk, M.A., Lam, T., Marconi, L., Merseburger, A.S., et al. (2015). EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: 2014 Update. *Eur. Urol.* *67*, 913–924.
158. Ljungberg, B., Bensalah, K., Bex, A., Canfield, S., Dabestani, S., Giles, R.H., and Hofmann, F. (2016). EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma. In *Uroweb*, p.
159. Lopez-Beltran, A., Scarpelli, M., Montironi, R., and Kirkali, Z. (2006). 2004 WHO Classification of the Renal Tumors of the Adults. *Eur. Urol.* *49*, 798–805.
160. Lubensky, I.A., Schmidt, L., Zhuang, Z., Weirich, G., Pack, S., Zambrano, N., Walther, M.M., Choyke, P., Linehan, W.M., and Zbar, B. (1999). Hereditary and sporadic papillary renal carcinomas with c-met mutations share a distinct morphological phenotype. *Am. J. Pathol.* *155*, 517–526.
161. MacLennan, S., Imamura, M., Lapitan, M.C., Omar, M.I., Lam, T.B.L., Hilvano-Cabungcal, A.M., Royle, P., Stewart, F., MacLennan, G., MacLennan, S.J., et al. (2012). Systematic review of perioperative and quality-of-life outcomes following surgical management of localised renal cancer. *Eur. Urol.* *62*, 1097–1117.
162. Macleod, L.C., Hotaling, J.M., Wright, J.L., Davenport, M.T., Gore, J.L., Harper, J., and White, E. (2013). Risk Factors for Renal Cell Carcinoma in the VITAL Study. *J. Urol.* *190*, 1657–1661.
163. Madhavan, H. (2007). Simple Laboratory methods to measure cell proliferation using DNA synthesis property. *J. Stem Cells Regen. Med.* *3*, 12–14.
164. Madureira, P.A., O’Connell, P.A., Surette, A.P., Miller, V.A., and Waisman, D.M. (2012). The biochemistry and regulation of S100A10: a multifunctional plasminogen receptor involved in oncogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.* *2012*, 353687.
165. Mallett, S., Royston, P., Dutton, S., Waters, R., and Altman, D.G. (2010). Reporting methods in studies developing prognostic models in cancer: a review. *BMC Med.* *8*, 20.

166. Mandl, M., Kapeller, B., Lieber, R., and Macfelda, K. (2013). Hypoxia-inducible factor-1 β (HIF-1 β) is upregulated in a HIF-1 α -dependent manner in 518A2 human melanoma cells under hypoxic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *434*, 166–172.
167. Mandl, M., Lieberum, M.-K., and Depping, R. (2016). A HIF-1 α -driven feed-forward loop augments HIF signalling in Hep3B cells by upregulation of ARNT. *Cell Death Dis.* *7*, e2284.
168. Marshall, M.E., Pearson, T., Simpson, W., Butler, K., and McRoberts, W. (1990). Low incidence of asymptomatic brain metastases in patients with renal cell carcinoma. *Urology* *36*, 300–302.
169. Martinez, P., Birkbak, N.J., Gerlinger, M., McGranahan, N., Burrell, R.A., Rowan, A.J., Joshi, T., Fisher, R., Larkin, J., Szallasi, Z., et al. (2013). Parallel evolution of tumour subclones mimics diversity between tumours. *J. Pathol.* *230*, 356–364.
170. Mason, R.J., Abdolell, M., Trottier, G., Pringle, C., Lawen, J.G., Bell, D.G., Jewett, M.A.S., Klotz, L., and Rendon, R.A. (2011). Growth Kinetics of Renal Masses: Analysis of a Prospective Cohort of Patients Undergoing Active Surveillance. *Eur. Urol.* *59*, 863–867.
171. Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.-W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* *399*, 271.
172. Mekhail, T.M., Abou-Jawde, R.M., Boumerhi, G., Malhi, S., Wood, L., Elson, P., and Bukowski, R. (2005). Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *23*, 832–841.
173. Metz, C.E. (1978). Basic principles of ROC analysis. *Semin. Nucl. Med.* *8*, 283–298.
174. Minn, A.J., Kang, Y., Serganova, I., Gupta, G.P., Giri, D.D., Doubrovin, M., Ponomarev, V., Gerald, W.L., Blasberg, R., and Massagué, J. (2005). Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J. Clin. Invest.* *115*, 44–55.
175. Mittal, K., Ebos, J., and Rini, B. (2014). Angiogenesis and the Tumor Microenvironment: Vascular Endothelial Growth Factor and Beyond. *Semin. Oncol.* *41*, 235–251.
176. Moch, H. (2016a). WHO-ISUP-Graduierungssystem für Nierenkarzinome. *Pathol.* *37*, 355–360.
177. Moch, H. (2016b). WHO-Klassifikation von 2016 und erste S3-Leitlinie zum Nierenzellkarzinom. *Pathol.* *37*, 127–133.
178. Moch, H., Presti, J.C., Sauter, G., Buchholz, N., Jordan, P., Mihatsch, M.J., and Waldman, F.M. (1996). Genetic Aberrations Detected by Comparative Genomic Hybridization Are Associated with Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* *56*, 27–30.
179. Moch, H., Cubilla, A.L., Humphrey, P.A., Reuter, V.E., and Ulbright, T.M. (2016). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur. Urol.* *70*, 93–105.

180. Molina, A.M., Tickoo, S.K., Ishill, N., Trinos, M.J., Schwartz, L.H., Patil, S., Feldman, D.R., Reuter, V.E., Russo, P., and Motzer, R.J. (2011). Sarcomatoid-variant renal cell carcinoma: treatment outcome and survival in advanced disease. *Am. J. Clin. Oncol.* *34*, 454–459.
181. Monzon, F.A., Alvarez, K., Peterson, L., Truong, L., Amato, R.J., Hernandez-McClain, J., Tannir, N., Parwani, A.V., and Jonasch, E. (2011). Chromosome 14q loss defines a molecular subtype of clear-cell renal cell carcinoma associated with poor prognosis. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *24*, 1470–1479.
182. Moore, L.E., Boffetta, P., Karami, S., Brennan, P., Stewart, P.S., Hung, R., Zaridze, D., Matveev, V., Janout, V., Kollarova, H., et al. (2010). Occupational trichloroethylene exposure and renal carcinoma risk: evidence of genetic susceptibility by reductive metabolism gene variants. *Cancer Res.* *70*, 6527–6536.
183. Morohara, K., Nakao, K., Tajima, Y., Nishino, N., Yamazaki, K., Kaetsu, T., Suzuki, S., Tsunoda, A., Kawamura, M., Aida, T., et al. (2005). Analysis by comparative genomic hybridization of gastric cancer with peritoneal dissemination and/or positive peritoneal cytology. *Cancer Genet. Cytogenet.* *161*, 57–62.
184. Motzer, R.J., Bacik, J., Murphy, B.A., Russo, P., and Mazumdar, M. (2002). Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *20*, 289–296.
185. Motzer, R.J., Haas, N.B., Donskov, F., Gross-Goupil, M., Varlamov, S., Kopyltsov, E., Lee, J.-L., Melichar, B., Rini, B.I., Choueiri, T.K., et al. (2017). Randomized phase III trial of adjuvant pazopanib versus placebo after nephrectomy in patients with locally advanced renal cell carcinoma (RCC) (PROTECT). *J. Clin. Oncol.* *35*, 4507–4507.
186. Nguyen, M.M., and Gill, I.S. (2010). Coded Tumor Size May Be Unreliable for Small Metastatic Renal Cancers in the Surveillance, Epidemiology, and End Results Dataset. *Urology* *75*, 266–270.
187. Nouh, M.A.A.M., Kuroda, N., Yamashita, M., Hayashida, Y., Yano, T., Minakuchi, J., Taniguchi, S., Nomura, I., Inui, M., Sugimoto, M., et al. (2010). Renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease: relationship between histological type and duration of dialysis. *BJU Int.* *105*, 620–627.
188. Ohno, Y., Izumi, M., Kawamura, T., Nishimura, T., Mukai, K., and Tachibana, M. (2009). Annexin II represents metastatic potential in clear-cell renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* *101*, 287–294.
189. Olopade, O.I., Adeyanju, M.O., Safa, A.R., Hagos, F., Mick, R., Thompson, C.B., and Recant, W.M. (1997). Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J. Sci. Am.* *3*, 230–237.
190. Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., et al. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* *435*, 677–681.
191. Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet* *133*, 571–573.
192. Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 252–264.

193. Park, J.Y., Lee, J.-L., Baek, S., Eo, S.-H., Go, H., Ro, J.Y., and Cho, Y.M. (2014). Sarcomatoid features, necrosis, and grade are prognostic factors in metastatic clear cell renal cell carcinoma with vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Hum. Pathol.* *45*, 1437–1444.
194. Parker, A.S., Cerhan, J.R., Lynch, C.F., Leibovich, B.C., and Cantor, K.P. (2004). History of urinary tract infection and risk of renal cell carcinoma. *Am. J. Epidemiol.* *159*, 42–48.
195. Parker, A.S., Leibovich, B.C., Lohse, C.M., Sheinin, Y., Kuntz, S.M., Eckel-Passow, J.E., Blute, M.L., and Kwon, E.D. (2009). Development and evaluation of BioScore: a biomarker panel to enhance prognostic algorithms for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* *115*, 2092–2103.
196. Patard, J.-J., Leray, E., Rodriguez, A., Rioux-Leclercq, N., Guillé, F., and Lobel, B. (2003). Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* *44*, 226–232.
197. Patard, J.-J., Leray, E., Rioux-Leclercq, N., Cindolo, L., Ficarra, V., Zisman, A., De La Taille, A., Tostain, J., Artibani, W., Abbou, C.C., et al. (2005). Prognostic Value of Histologic Subtypes in Renal Cell Carcinoma: A Multicenter Experience. *J. Clin. Oncol.* *23*, 2763–2771.
198. Patel, H.D., Johnson, M.H., Pierorazio, P.M., Sozio, S.M., Sharma, R., Iyoha, E., Bass, E.B., and Allaf, M.E. (2016). Diagnostic Accuracy and Risks of Biopsy in the Diagnosis of a Renal Mass Suspicious for Localized Renal Cell Carcinoma: Systematic Review of the Literature. *J. Urol.* *195*, 1340–1347.
199. Pawłowski, R., Mühl, S.M., Sulser, T., Krek, W., Moch, H., and Schraml, P. (2013). Loss of PBRM1 expression is associated with renal cell carcinoma progression. *Int. J. Cancer* *132*, E11–E17.
200. Peduzzi, P., Concato, J., Kemper, E., Holford, T.R., and Feinstein, A.R. (1996). A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J. Clin. Epidemiol.* *49*, 1373–1379.
201. Pestova, K., Koch, A.J., Quesenberry, C.P., Shan, J., Zhang, Y., Leimpeter, A.D., Blondin, B., Sitailo, S., Buckingham, L., Du, J., et al. (2018). Identification of fluorescence in situ hybridization assay markers for prediction of disease progression in prostate cancer patients on active surveillance. *BMC Cancer* *18*, 2.
202. Petersen, B.L., Sørensen, M.C., Pedersen, S., and Rasmussen, M. (2004). Fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue: optimizing the method. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* *12*, 259–265.
203. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* *30*, e36–e36.
204. Polivka Jr., J., and Janku, F. (2014). Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol. Ther.* *142*, 164–175.
205. Popova, T., Hebert, L., Jacquemin, V., Gad, S., Caux-Moncoutier, V., Dubois-d'Enghien, C., Richaudeau, B., Renaudin, X., Sellers, J., Nicolas, A., et al. (2013). Germline BAP1 Mutations Predispose to Renal Cell Carcinomas. *Am. J. Hum. Genet.* *92*, 974–980.

206. Presti, J.C., Wilhelm, M., Reuter, V., Russo, P., Motzer, R., and Waldman, F. (2002). ALLELIC LOSS ON CHROMOSOMES 8 AND 9 CORRELATES WITH CLINICAL OUTCOME IN LOCALLY ADVANCED CLEAR CELL CARCINOMA OF THE KIDNEY. *J. Urol.* *167*, 1464–1468.
207. Przybycin, C.G., Cronin, A.M., Darvishian, F., Gopalan, A., Al-Ahmadie, H.A., Fine, S.W., Chen, Y., Bernstein, M., Russo, P., Reuter, V.E., et al. (2011). Chromophobe renal cell carcinoma: a clinicopathologic study of 203 tumors in 200 patients with primary resection at a single institution. *Am. J. Surg. Pathol.* *35*, 962–970.
208. Radermacher, J. (2003). Sonographie der Nieren und Nierengefäße. *Internist* *44*, 1413–1432.
209. Rakowski, S.K., Winterkorn, E.B., Paul, E., Steele, D.J.R., Halpern, E.F., and Thiele, E.A. (2006). Renal manifestations of tuberous sclerosis complex: Incidence, prognosis, and predictive factors. *Kidney Int.* *70*, 1777–1782.
210. Rankin, E.B., Higgins, D.F., Walisser, J.A., Johnson, R.S., Bradfield, C.A., and Haase, V.H. (2005). Inactivation of the Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (Arnt) Suppresses von Hippel-Lindau Disease-Associated Vascular Tumors in Mice. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 3163–3172.
211. Ravaud, A., Motzer, R.J., Pandha, H.S., George, D.J., Pantuck, A.J., Patel, A., Chang, Y.-H., Escudier, B., Donskov, F., Magheli, A., et al. (2016). Adjuvant Sunitinib in High-Risk Renal-Cell Carcinoma after Nephrectomy. *N. Engl. J. Med.* *375*, 2246–2254.
212. Renehan, A.G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R.F., and Zwahlen, M. (2008). Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The Lancet* *371*, 569–578.
213. Rini, B., Goddard, A., Knezevic, D., Maddala, T., Zhou, M., Aydin, H., Campbell, S., Elson, P., Koscielny, S., Lopatin, M., et al. (2015). A 16-gene assay to predict recurrence after surgery in localised renal cell carcinoma: development and validation studies. *Lancet Oncol.* *16*, 676–685.
214. Rini, B.I., Campbell, S.C., and Escudier, B. (2009). Renal cell carcinoma. *The Lancet* *373*, 1119–1132.
215. Rini, B.I., Escudier, B., Tomczak, P., Kaprin, A., Szczylik, C., Hutson, T.E., Michaelson, M.D., Gorbunova, V.A., Gore, M.E., Rusakov, I.G., et al. (2011). Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *The Lancet* *378*, 1931–1939.
216. Sabatini, D.M. (2006). mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 729–734.
217. Sali, D., and Boffetta, P. (2000). Kidney cancer and occupational exposure to asbestos: a meta-analysis of occupational cohort studies. *Cancer Causes Control CCC* *11*, 37–47.
218. Salmasi, A., Faiena, I., Drakaki, A., and Pantuck, A.J. (2018). Re: Adjuvant Sunitinib in High-risk Renal-cell Carcinoma After Nephrectomy. *Eur. Urol.* *0*.
219. Samaratunga, H., Gianduzzo, T., and Delahunt, B. (2014). The ISUP system of staging, grading and classification of renal cell neoplasia. *J. Kidney Cancer VHL* *1*, 26–39.

220. Sanjmyatav, J., Rubtsov, N., Starke, H., Schubert, J., Hindermann, W., and Junker, K. (2005). Identification of tumor entities of renal cell carcinoma using interphase fluorescence in situ hybridization. *J. Urol.* *174*, 731–735.
221. Sanjmyatav, J., Junker, K., Matthes, S., Muehr, M., Sava, D., Sternal, M., Wessendorf, S., Kreuz, M., Gajda, M., Wunderlich, H., et al. (2011a). Identification of Genomic Alterations Associated With Metastasis and Cancer Specific Survival in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Urol.* *186*, 2078–2083.
222. Sanjmyatav, J., Steiner, T., Wunderlich, H., Diegmann, J., Gajda, M., and Junker, K. (2011b). A specific gene expression signature characterizes metastatic potential in clear cell renal cell carcinoma. *J. Urol.* *186*, 289–294.
223. Sanjmyatav, J., Hauke, S., Gajda, M., Hartmann, A., Moch, H., Meyer, B., Pryalukhin, A., Grimm, M.-O., and Junker, K. (2013). Establishment of a Multicolour Fluorescence In Situ Hybridisation-based Assay for Subtyping of Renal Cell Tumours. *Eur. Urol.* *64*, 689–691.
224. Sanjmyatav, J., Matthes, S., Muehr, M., Sava, D., Sternal, M., Wunderlich, H., Gajda, M., Grimm, M.-O., and Junker, K. (2014). Identification of high-risk patients with clear cell renal cell carcinoma based on interphase-FISH. *Br. J. Cancer* *110*, 2537–2543.
225. Sato, Y., Yoshizato, T., Shiraiishi, Y., Maekawa, S., Okuno, Y., Kamura, T., Shimamura, T., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Suzuki, H., et al. (2013). Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat. Genet.* *45*, 860–867.
226. Scherr, A.-L., Gdynia, G., Salou, M., Radhakrishnan, P., Duglova, K., Heller, A., Keim, S., Kautz, N., Jassowicz, A., Elssner, C., et al. (2016). Bcl-xL is an oncogenic driver in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* *7*, e2342.
227. Schito, L., and Semenza, G.L. (2016). Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer* *2*, 758–770.
228. Schneider, A., Wagenpfeil, G., Jörres, R.A., and Wagenpfeil, S. (2015). Influence of the practice setting on diagnostic prediction rules using FENO measurement in combination with clinical signs and symptoms of asthma. *BMJ Open* *5*.
229. Schraml, P., Struckmann, K., Bednar, R., Fu, W., Gasser, T., Wilber, K., Kononen, J., Sauter, G., Mihatsch, M.J., and Moch, H. (2001). CDKN2A Mutation Analysis, Protein Expression, and Deletion Mapping of Chromosome 9p in Conventional Clear-Cell Renal Carcinomas. *Am. J. Pathol.* *158*, 593–601.
230. Sharifi, N., and Farrar, W.L. (2006). Perturbations in hypoxia detection: A shared link between hereditary and sporadic tumor formation? *Med. Hypotheses* *66*, 732–735.
231. Shen, C., and Kaelin, W.G. (2013). The VHL/HIF Axis in Clear Cell Renal Carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* *23*, 18–25.
232. Shigemura, K., and Fujisawa, M. (2015). Hedgehog signaling and urological cancers. *Curr. Drug Targets* *16*, 258–271.
233. Shinohara, N., and Abe, T. (2015). Prognostic factors and risk classifications for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Int. J. Urol.* *22*, 888–897.
234. Shuch, B., Vourganti, S., Ricketts, C.J., Middleton, L., Peterson, J., Merino, M.J., Metwalli, A.R., Srinivasan, R., and Linehan, W.M. (2014). Defining early-onset kidney

cancer: implications for germline and somatic mutation testing and clinical management. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 431–437.

235. Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* 66, 7–30.
236. Slaby, O., Redova, M., Poprach, A., Nekvindova, J., Iliev, R., Radova, L., Lakomy, R., Svoboda, M., and Vyzula, R. (2012). Identification of MicroRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients. *Genes. Chromosomes Cancer* 51, 707–716.
237. Smaldone, M.C., Kutikov, A., Egleston, B.L., Canter, D.J., Viterbo, R., Chen, D.Y.T., Jewett, M.A., Greenberg, R.E., and Uzzo, R.G. (2012). Small renal masses progressing to metastases under active surveillance: a systematic review and pooled analysis. *Cancer* 118, 997–1006.
238. Song, D.Y., Song, S., Song, Y., and Lee, J.E. (2012). Alcohol intake and renal cell cancer risk: a meta-analysis. *Br. J. Cancer* 106, 1881–1890.
239. Sorbellini, M., Kattan, M.W., Snyder, M.E., Reuter, V., Motzer, R., Goetzl, M., McKIERNAN, J., and Russo, P. (2005). A POSTOPERATIVE PROGNOSTIC NOMOGRAM PREDICTING RECURRENCE FOR PATIENTS WITH CONVENTIONAL CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA. *J. Urol.* 173, 48–51.
240. Spadari, S., Sala, F., and Pedrali-Noy, G. (1982). Aphidicolin: a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 7, 29–32.
241. Staller, P., Sulitkova, J., Lisztwan, J., Moch, H., Oakeley, E.J., and Krek, W. (2003). Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel–Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425, 307–311.
242. Stewart, J.H., Vajdic, C.M., Leeuwen, V., T, M., Amin, J., Webster, A.C., Chapman, J.R., McDonald, S.P., Grulich, A.E., and McCredie, M.R.E. (2009). The pattern of excess cancer in dialysis and transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24, 3225–3231.
243. Steyerberg, E.W. (2008). *Clinical Prediction Models: A Practical Approach to Development, Validation, and Updating* (Springer Science & Business Media).
244. Störkel, S., Wild, P.J., and Moch, H. (2016). Nierentumoren im Erwachsenenalter. In *Pathologie*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 443–485.
245. Strachan, T., and Read, A.P. (2011). *Human Molecular Genetics 4* (Garland Science/Taylor & Francis Group).
246. Stubendorff, B. (2014). Identifizierung metastasierungsspezifischer Unterschiede im DNA-Methylierungsmuster muskelinvasiver Harnblasentumore.
247. Su, D., Stamatakis, L., Singer, E.A., and Srinivasan, R. (2014). Renal cell carcinoma: molecular biology and targeted therapy. *Curr. Opin. Oncol.* 26, 321–327.
248. Su, D., Singer, E.A., and Srinivasan, R. (2015). Molecular pathways in renal cell carcinoma: recent advances in genetics and molecular biology. *Curr. Opin. Oncol.* 27, 217–223.

249. Tan, P.H., Cheng, L., Rioux-Leclercq, N., Merino, M.J., Netto, G., Reuter, V.E., Shen, S.S., Grignon, D.J., Montironi, R., Egevad, L., et al. (2013). Renal Tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* *37*, 1518–1531.
250. Taube, J.M., Klein, A., Brahmer, J.R., Xu, H., Pan, X., Kim, J.H., Chen, L., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., and Anders, R.A. (2014). Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Clin. Cancer Res.* *20*, 5064–5074.
251. Taylor, J.K., Zhang, Q.Q., Monia, B.P., Marcusson, E.G., and Dean, N.M. (1999). Inhibition of Bcl-xL expression sensitizes normal human keratinocytes and epithelial cells to apoptotic stimuli. *Oncogene* *18*, 4495–4504.
252. Teratani, T., Watanabe, T., Kuwahara, F., Kumagai, H., Kobayashi, S., Aoki, U., Ishikawa, A., Arai, K., and Nozawa, R. (2002). Induced transcriptional expression of calcium-binding protein S100A1 and S100A10 genes in human renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* *175*, 71–77.
253. The Cancer Genome Atlas Research Network (2013). Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* *499*, 43–49.
254. Thoma, C.R., Toso, A., Gutbrodt, K.L., Reggi, S.P., Frew, I.J., Schraml, P., Hergovich, A., Moch, H., Meraldi, P., and Krek, W. (2009). VHL loss causes spindle misorientation and chromosome instability. *Nat. Cell Biol.* *11*, 994.
255. Thompson, R.H., Hill, J.R., Babayev, Y., Cronin, A., Kaag, M., Kundu, S., Bernstein, M., Coleman, J., Dalbagni, G., Touijer, K., et al. (2009). Metastatic Renal Cell Carcinoma Risk According to Tumor Size. *J. Urol.* *182*, 41–45.
256. Tibiletti, M.G. (2004). Specificity of interphase fluorescence in situ hybridization for detection of chromosome aberrations in tumor pathology. *Cancer Genet. Cytogenet.* *155*, 143–148.
257. Toro, J.R., Nickerson, M.L., Wei, M.-H., Warren, M.B., Glenn, G.M., Turner, M.L., Stewart, L., Duray, P., Tourre, O., Sharma, N., et al. (2003). Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. *Am. J. Hum. Genet.* *73*, 95–106.
258. Trpkov, K., Yilmaz, A., Uzer, D., M Dishongh, K., Quick, C., Bismar, T., and Gokden, N. (2010). Renal oncocytoma revisited: A clinicopathological study of 109 cases with emphasis on problematic diagnostic features. *Histopathology* *57*, 893–906.
259. Turajlic, S., and Swanton, C. (2016). Metastasis as an evolutionary process. *Science* *352*, 169–175.
260. Turajlic, S., Xu, H., Litchfield, K., Rowan, A., Chambers, T., Lopez, J.I., Nicol, D., O'Brien, T., Larkin, J., Horswell, S., et al. (2018). Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. *Cell* *173*, 581-594.e12.
261. Umbreit, E.C., and Thompson, R.H. (2011). Metastatic Potential of the Small Renal Mass: Why Can't We Agree? *Eur. Urol.* *60*, 983–985.
262. Vatten, L.J., Trichopoulos, D., Holmen, J., and Nilsen, T.I.L. (2007). Blood pressure and renal cancer risk: the HUNT Study in Norway. *Br. J. Cancer* *97*, 112–114.

263. Verbiest, A., Couchy, G., Job, S., Caruana, L., Lerut, E., Oyen, R., Reyniès, A. de, Tosco, L., Joniau, S., Poppel, H.V., et al. (2018). Molecular Subtypes of Clear-cell Renal Cell Carcinoma are Prognostic for Outcome After Complete Metastasectomy. *Eur. Urol. 0*.
264. Volpe, A., Novara, G., Antonelli, A., Bertini, R., Billia, M., Carmignani, G., Cunico, S.C., Longo, N., Martignoni, G., Minervini, A., et al. (2012). Chromophobe renal cell carcinoma (RCC): oncological outcomes and prognostic factors in a large multicentre series. *BJU Int. 110*, 76–83.
265. Wagener, N., Holland, D., Bulkescher, J., Crnković-Mertens, I., Hoppe-Seyler, K., Zentgraf, H., Pritsch, M., Buse, S., Pfitzenmaier, J., Haferkamp, A., et al. (2008). The enhancer of zeste homolog 2 gene contributes to cell proliferation and apoptosis resistance in renal cell carcinoma cells. *Int. J. Cancer 123*, 1545–1550.
266. Wagener, N., Macher-Goeppinger, S., Pritsch, M., Hüsing, J., Hoppe-Seyler, K., Schirmacher, P., Pfitzenmaier, J., Haferkamp, A., Hoppe-Seyler, F., and Hohenfellner, M. (2010). Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *BMC Cancer 10*, 524.
267. Watanabe, J., Kushihata, F., Honda, K., Sugita, A., Tateishi, N., Mominoki, K., Matsuda, S., and Kobayashi, N. (2004). Prognostic significance of Bcl-xL in human hepatocellular carcinoma. *Surgery 135*, 604–612.
268. Weikert, S., Boeing, H., Pischon, T., Weikert, C., Olsen, A., Tjønneland, A., Overvad, K., Becker, N., Linseisen, J., Trichopoulou, A., et al. (2008). Blood Pressure and Risk of Renal Cell Carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am. J. Epidemiol. 167*, 438–446.
269. Weiss, M.M., Hermsen, M.A., Meijer, G.A., van Grieken, N.C., Baak, J.P., Kuipers, E.J., and van Diest, P.J. (1999). Comparative genomic hybridisation. *Mol. Pathol. 52*, 243–251.
270. Wierzbicki, P.M., Klacz, J., Rybarczyk, A., Słebioda, T., Stanislawowski, M., Wronska, A., Kowalczyk, A., Matuszewski, M., and Kmiec, Z. (2014). Identification of a suitable qPCR reference gene in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Tumour Biol. 35*, 12473–12487.
271. Wilson, B.G., and Roberts, C.W.M. (2011). SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat. Rev. Cancer 11*, 481.
272. Wittekind, C. (2016). *TNM: Klassifikation maligner Tumoren* (John Wiley & Sons).
273. Wuttig, D., Baier, B., Fuessel, S., Meinhardt, M., Herr, A., Hoefling, C., Toma, M., Grimm, M.-O., Meyer, A., Rolle, A., et al. (2009). Gene signatures of pulmonary metastases of renal cell carcinoma reflect the disease-free interval and the number of metastases per patient. *Int. J. Cancer 125*, 474–482.
274. Yoshimoto, T., Matsuura, K., Karnan, S., Tagawa, H., Nakada, C., Tanigawa, M., Tsukamoto, Y., Uchida, T., Kashima, K., Akizuki, S., et al. (2007). High-resolution analysis of DNA copy number alterations and gene expression in renal clear cell carcinoma. *J. Pathol. 213*, 392–401.
275. Yuan, J.-B., Yang, L.-Y., Tang, Z.-Y., Zu, X.-B., and Qi, L. (2012). Down-regulation of EZH2 by RNA interference inhibits proliferation and invasion of ACHN cells via the Wnt/ β -catenin pathway. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP 13*, 6197–6201.

276. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 (Berlin).
277. Zhang, D., Yang, X.-J., Luo, Q.-D., Fu, D.-L., Li, H.-L., Li, H.-C., Zhang, P., and Chong, T. (2018). EZH2 enhances the invasive capability of renal cell carcinoma cells via activation of STAT3. *Mol. Med. Rep.* 17, 3621–3626.
278. Zisman, A., Pantuck, A.J., Wieder, J., Chao, D.H., Dorey, F., Said, J.W., deKernion, J.B., Figlin, R.A., and Belldegrun, A.S. (2002). Risk Group Assessment and Clinical Outcome Algorithm to Predict the Natural History of Patients With Surgically Resected Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 20, 4559–4566.
279. Znaor, A., Lortet-Tieulent, J., Laversanne, M., Jemal, A., and Bray, F. (2015). International Variations and Trends in Renal Cell Carcinoma Incidence and Mortality. *Eur. Urol.* 67, 519–530.
280. Zwiener, I., Blettner, M., and Hommel, G. (2011). Survival analysis— part 15 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int* 108(10), 163–9.
281. (2002). *FISH Technology* (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).
282. (2007). *World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*, American Institute for Cancer Research, Washington, D.C (2007).

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 5-Jahres-Überleben mit lokal begrenztem und fortgeschrittenem NZK nach Daten der SEER Kohorte 2016.....	14
Abbildung 2 Entwicklungsschema für Risikostratifizierungsmodellen, verändert nach Shinohara and Abe, 2015.....	15
Abbildung 3 Therapierelevante Signalwege und zur Verfügung stehende Therapeutika für die Behandlung des metastasierten NZK, Choueiri and Motzer, 2017.....	19
Abbildung 4 Aktuelles Therapieschema für metastasierte NZKs nach EAU Richtlinien 2017.....	19
Abbildung 6 Häufigkeiten der chromosomalen Aberrationen in Kohorte 1	50
Abbildung 7 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das progressionsfreie Überleben in Kohorte 1	57
Abbildung 8 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das Gesamtüberleben (A) und das tumorspezifische Überleben (B) der Patienten in Kohorte 1	58
Abbildung 9 Kaplan-Meier-Kurve des progressionsfreien Überlebens nach Anwendung des Risikoscores in Kohorte 1	59
Abbildung 10 Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben (A) und das tumorspezifische Überleben (B) der nach Risikoscore eingeteilten Kohorte 1	60
Abbildung 11 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das progressionsfreie Überleben in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 1	61
Abbildung 12 Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben der nach Risikoscore eingeteilten organbegrenzten Tumoren in Kohorte 1	61
Abbildung 13 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das Gesamtüberleben (A) und das tumorspezifische Überleben (B) der organbegrenzten Tumore der Kohorte 1	62
Abbildung 14 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines FFPE-Gewebeschnittes (4µm dick) eines kNZK; FISH Sonden für 9p21.3 (grün) zeigen einen Verlust in Tumorzellen (Pfeile); CEN 9- Sonden (rot) dienen der Ploidiekontrolle.....	63

Abbildung 15 ROC-Kurven für die Ermittlung des besten Schwellenwertes der FISH-Sonden und tabellarische Darstellung der Flächenwerte (AUC) und Signifikanzen der unterschiedlichen getesteten Schwellenwerte für FFPE-Schnitte.....	64
Abbildung 16 ROC-Kurven der einzelnen FISH-Sonden sowie des TNSA-Wertes in Abhängigkeit zum Metastasierungsstatus in Kohorte 2	65
Abbildung 17 Häufigkeiten der chromosomalen Aberrationen in Kohorte 2	66
Abbildung 18 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das progressionsfreien Überleben in Kohorte 2	70
Abbildung 19 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das Gesamtüberleben (A) und das tumorspezifische Überleben (B) in Kohorte 2	71
Abbildung 20 Kaplan-Meier-Kurven des progressionsfreien Überlebens nach Einteilung mittels Risikoscore in Kohorte 2	72
Abbildung 21 Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens (A) und tumorspezifischen Überlebens (B) nach Einteilung mittels Risikoscore in Kohorte 2	73
Abbildung 22 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das progressionsfreien Überleben der organbegrenzten Tumore aus Kohorte 2.....	74
Abbildung 23 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen TNSA-Werte für das Gesamtüberleben (A) und das tumorspezifische Überleben (B) der organbegrenzten Tumore aus Kohorte 2 nach TNSA	75
Abbildung 24 Kaplan-Meier-Kurven des progressionsfreien Überlebens in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2 nach Einteilung mittels Risikoscore	76
Abbildung 25 Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens (A) und tumorspezifischen Überlebens (B) nach Einteilung mittels Risikoscore in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2.....	76
Abbildung 26 TCGA-Datenanalyse der durch Sequenzierung ermittelten CNVs in nicht-metastasierten (rot) und metastasierten (grün) Tumoren.....	77
Abbildung 27 TCGA-Datenanalyse der durch Sequenzierung ermittelten CNVs in nicht-metastasierten (rot) und metastasierten (grün) Tumoren der T-Kategorien pT1-pT2	78
Abbildung 28 TCGA-Datenanalyse der durch Sequenzierung ermittelten CNVs in nicht-metastasierten (rot) und metastasierten (grün) Tumoren der T-Kategorien pT3-pT4	79
Abbildung 29 Deregulation der Genexpression zwischen pM1(grün) und pM0 (rot) der ausgewählten Gene in der TCGA-Kohorte.....	80
Abbildung 30 Unterschiede der mRNA-Expression von BCL2-xL, HIF1 β , S100A10, EZH2, SHH und CDKN2A in Geweben von metastasierten und nicht-metastasierten Nierentumoren	82
Abbildung 31 Unterschiede in der relativen Expression der untersuchten Gene in Korrelation zu den mittels FISH detektierten chromosomalen Aberrationen.....	83
Abbildung 32 Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie und tumorspezifische Überleben nach Unterteilung anhand der S100A10 oder EZH2 Expressionslevel.....	85
Abbildung 33 Netzwerkdarstellung der Gene EZH2, CDKN2A, SHH, BCL-xL, ARNT und E2F1 im kNZK	87
Abbildung 34 Relative Genexpression von EZH2 und BCL-xL in Mock- und mit siRNA transfizierten Caki2 und 786-O-Zellen	88
Abbildung 35 Proliferationsrate nach 24h und 48h in transfizierten 786-O und Caki2-Zellen sowie in den Negativkontrollen.....	90
Abbildung 36 Migrationsrate siRNA-transfizierten 768O- und Caki2-Zelllinien sowie der Mock-Zellen	91
Abbildung 37 Apoptoserate nach Transfektion mit siRNAs in 786-O Zellen	92
Abbildung 38 Apoptoserate nach Transfektion mit BCL-xL-siRNA in 786-O Zellen.....	92
Abbildung 39 Apoptoserate nach Transfektion mit BCL-xL und EZH2 siRNA in A: 786-O und B: Caki-2-Zellen; DMSO 2,5% als Positivkontrolle, Mock als Negativkontrolle	93

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 WHO Klassifikation der Nierentumore, Übernommen aus Störkel et al., 2016; Nierentumore im Erwachsenenalter.....	9
Tabelle 2 Erbliche Tumorsyndrome der Niere und beteiligte Gene, angepasst nach Junker et al., 2013	9
Tabelle 3 TNM-Klassifikation der Nierentumore nach AJCC/UICC 7. Auflage	10
Tabelle 4 Tumorgraduierungssystem nach Fuhrman et al., 1982.....	11
Tabelle 5 Untersuchte Patientenkohorten.....	33
Tabelle 6 Verwendete FISH Sonden und Fluoreszenzfilter	35
Tabelle 7 Mischverhältnis der einzelnen FISH Sonden	35
Tabelle 8 Reaktionsgemisch zur cDNA Synthese.....	38
Tabelle 9 Reaktionsgemisch für die qRT-PCR	40
Tabelle 10 Herkunft, Kultivierungsmedium und VHL-Status der verwendeten Nierenzellkarzinom Zelllinien.....	41
Tabelle 11 Mischverhältnisse und verwendete Konzentration der siRNA für die Transfektion mit siRNA	42
Tabelle 12 Cut-Off Werte für die Abschätzung des Metastasierungsrisikos (ROC-Kurven Analyse) und Korrelation der CNVs und des TNSA mit dem Metastasierungsstatus der Kohorte 1 (Fisher's exact test, univariate Regression)	49
Tabelle 13 Uni- und multivariate logistische Regression für die Vorhersage des Metastasierungsrisikos in Kohorte 1	51
Tabelle 14 Multivariate logistische Regression zur Berechnung der Regressionskoeffizienten für die T-Kategorien.....	52
Tabelle 15 Multivariate logistische Regression für die Etablierung eines Risikostratifizierungsalgorithmus für die Vorhersage des Metastasierungsrisikos in Kohorte 1	52
Tabelle 16 Cut-Off Werte für die Abschätzung des Metastasierungsrisikos (ROC-Kurven Analyse) und Korrelation der CNVs und des TNSA mit dem Metastasierungsstatus in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 1 (Fisher's exact test, univariate Regression)	53
Tabelle 17 Uni- und multivariate logistische Regression für die Vorhersage des Metastasierungsrisikos organbegrenzter Tumore in Kohorte 1.....	54
Tabelle 18 Univariate Analyse zum Vergleich von Risikoscore und TNSA	54
Tabelle 19 Cut-Off Werte für die Abschätzung des Metastasierungsrisikos (ROC-Kurven Analyse) und Korrelation der CNVs und des TNSA mit dem Metastasierungsstatus in organüberschreitenden Tumoren der Kohorte 1 (Fisher's exact test, univariate Regression)	55
Tabelle 20 Vergleich des Leibovich-Scores mit anatomischen Faktoren und dem Risikoscore.....	56
Tabelle 21 Anzahl und Häufigkeit einer metachronen Metastasierung nach initialem pM0 Befund in Kohorte 1	57
Tabelle 22 Anzahl und Häufigkeiten der Todesfälle und tumorbedingten Todesfälle in Kohorte 1.....	58
Tabelle 23 Anzahl und Häufigkeiten einer metachronen Metastasierung in den organbegrenzten Tumoren der Kohorte 1.....	60
Tabelle 24 Anzahl und Häufigkeiten der Todesfälle und tumorbedingten Todesfälle organbegrenzter Tumore in Kohorte 1.....	62
Tabelle 25 Cut-Off Werte für die Abschätzung des Metastasierungsrisikos (ROC-Kurven Analyse) und Korrelation der CNVs und des TNSA mit dem Metastasierungsstatus in Kohorte 2 (Fisher's exact test, univariate Regression)	65
Tabelle 26 Uni- und multivariate logistische Regressionsanalyse für die Vorhersage des Metastasierungsrisikos in Kohorte 2.....	67
Tabelle 27 Univariate logistische Regressionsanalysen des Risikoscores und des TNSA in der gesamten Kohorte und in Fällen mit initialer pM0 Diagnose	68

Tabelle 28 Cut-Off Werte für die Abschätzung des Metastasierungsrisikos (ROC-Kurven Analyse) und Korrelation der CNVs und des TNSA mit dem Metastasierungsstatus in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2 (Fisher's exact test, univariate Regression)	68
Tabelle 29 Uni- und multivariate logistische Regressionsanalyse für die Vorhersage des Metastasierungsrisikos der organbegrenzten Tumore in Kohorte 2	69
Tabelle 30 Univariate Regressionsanalysen des Risikoscores und des TNSA in organbegrenzten Tumoren der Kohorte 2 und in organbegrenzten Fällen mit initialer pM0 Diagnose.....	69
Tabelle 31 Anzahl und Häufigkeiten einer metachronen Metastasierung nach initial pM0 Befund in Kohorte 2	70
Tabelle 32 Anzahl und Häufigkeiten der Todesfälle und tumorbedingten Todesfälle in Kohorte 2.....	71
Tabelle 33 Anzahl und Häufigkeiten einer metachronen Metastasierung in organbegrenzten Tumoren in Kohorte 2	73
Tabelle 34 Anzahl und Häufigkeiten der Todesfälle und tumorbedingten Todesfälle in organbegrenzten Tumoren in Kohorte 2	74
Tabelle 35 Ausgewählte Gene für die Genexpressionsanalyse mit qRT-PCR.....	80
Tabelle 36 Signifikanzen und Fold-change der mRNA-Konzentration der deregulierten Gene in Nierentumorgeweben.....	81
Tabelle 37 Korrelation der Genexpression zu den Ergebnissen der FISH-Analyse.....	83
Tabelle 38 Korrelation des tumorspezifischen Überlebens und des progressionsfreien Überlebens zur Genexpression der signifikant deregulierten Gene	84
Tabelle 39 Univariate Cox-Regression für das tumorspezifische und progressionsfreie Überleben bei signifikant deregulierter Genexpression	85
Tabelle 40 Kaplan-Meier-Analysen zum Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben bei deregulierter Genexpression in der TCGA Kohorte	86
Tabelle 41 Signifikanzen (t-Test) und Fold-changes der siRNA-transfizierten Zelllinien im Vergleich zum Mock (Negativkontrolle).....	88
Tabelle 42 Auswertung des Einflusses der Transfektion auf die Proliferation in 786-O und Caki2-Zelllinien.....	89
Tabelle 43 Auswertung des Einflusses der Transfektion auf die Migration der 786-O und Caki2-Zelllinien.....	90

VI. Abkürzungsverzeichnis

~	circa
≐	entspricht
Abb.	Abbildung
AJCC	The American Joint Committee on Cancer
ARNT	Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
AUC	Area Under Curve
BAP1	BRCA1 associated protein-1
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL2L1 (BCL-xL)	BCL-2-like protein 1
BHD	Birt-Hogg-Dubbé
BMI	Body-Mass-Index
BrdU	bromodeoxyuridine
bspw.	beispielsweise
CAIX	Carbonic Anhydrase 9
CD105	Endoglin
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
chNZK	Chromophobes Nierenzellkarzinom
CNV	Kopienzahlveränderung (copy number variation)
COX2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2

CSC	Cancer Stem Cell
CSS	Cancer Specific Survival
CTC	Circulating Tumor Cell
CXCR	C-X-C motif chemokine receptor
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	Destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAJB6	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B6
E2F1	E2F transcription factor 1
ECM1	extracellular matrix protein 1
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EZH2	Enhancer of Zest Homolog 2
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
FH	Fumarat Hydratase
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FKS	Fötales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HR	Hazard Ratio
IHT	intratumorale Heterogenität
IMDC	International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium
ISUP	The International Society of Urological Pathology
kNZK	klarzelliges Nierenzellkarzinom
KPS	Karnofsky Performance Score
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LK	Lymphknoten
LOH	Verlust der Heterozygotie
M0	nicht-metastasiert
M1	metastasiert
M	Metastasierungsstatus
MET	MET proto-oncogene
miRNA	mikro-RNA
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre
MTAP	methylthioadenosine phosphorylase
MTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mut	mutiert
MYC	MYC proto-oncogene
N	Lymphknotenstatus
n	Anzahl
NCAM1	neural cell adhesion molecule 1
NGS	Next-Generation-Sequencing
NZK	Nierenzellkarzinom
Ø	Durchschnitt
OS	Overall Survival
P	Wahrscheinlichkeit
p53	tumor protein p53
PBRM1	Polybromol
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PD1	Programmed Death 1
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PFS	progressionsfreies Überleben
PI3K	Phosphoinositol-3-kinase
pNZK	Papilläres Nierenzellkarzinom
PPIA	peptidylprolyl isomerase A
PTEN	Phosphate and tensin homolog
qRT PCR	quantitative Real Time PCR
RISC	RNA-induced-silencing-complex
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operating Curve
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTCA	Real Time Cell Analyzer
S100A10	S100 calcium binding protein A10
SEER	The Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SEPT9	Septin 9
SETD2	SET domain containing 2
SHH	Sonic Hedgehog
siRNA	silencer RNA
SOP	Standard Operating Procedure
SSIGN	Stage, Size, Grade and Necrosis
T	T-Kategorie
TCE	Trichlorethylen
TCEB1	Elongin C
TGF α	transforming growth factor alpha
ϑ	Theta, hier: Logit
TIC	Tumour initiating cell
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
TMA	Tissue Micro Array
TNSA	Total Number of Specific Aberrations
TPX2	microtubule nucleation factor
TSC1/2	Tuberous Sclerosis Complex 1/2
UICC	Union für International Cancer Control
UISS	UCLA Integrated Staging System
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von Hippel-Lindau
vs.	versus
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp

VII. Publikationsliste

Grimm, J., Hartmann, A., Stoehr, C., Janssen, M., Kunath, F., Stöckle, M., and Junker, K. (2015). Abstract 5156: Establishment of a FISH based analysis for individual risk assessment of ccRCC patients on tissue microarrays. *Cancer Res.* 75, 5156–5156.

Grimm, J., Janssen, M., Hartmann, A., Kunath, F., Stöhr, C., Stöckle, M., and Junker, K. (2016a). 224 Genetic alterations in specific chromosomal regions indicate metastatic potential in ccRCC patients. *Eur. Urol. Suppl.* 15, e224.

Grimm, J., Janssen, M., Hartmann, A., Stöhr, C., Kunath, F., Stöckle, M., and Junker, K. (2016b). MP78-06 GENETIC ALTERATIONS IN SPECIFIC CHROMOSOMAL REGIONS INDICATE METASTATIC POTENTIAL IN CCRCC PATIENTS. *J. Urol.* 195, e1026.

Grimm, J., Janssen, M., Wagenpfeil, S., Hartmann, A., Stöhr, C., Kunath, F., Stöckle, M., and Junker, K. (2017). Risk assessment for ccRCC patients based on alterations in specific chromosomal regions. *Eur. Urol. Suppl.* 16, e1702–e1703.

Zudem sind Teile dieser Arbeit derzeit zur Publikation im Journal *Genes, Chromosomes and Cancer* eingereicht.

VIII. Danksagung

Ich möchte mich zu aller erst bei Frau Professor Dr. Kerstin Junker bedanken, die mir ermöglichte die vorliegende Arbeit in Ihrem Forschungslabor anzufertigen und mir bei der Umsetzung stets mit fachlichem Rat zur Seite stand.

Ich bedanke mich zudem herzlichst bei Professor Dr. Richard Zimmermann für die Übernahme der Korrektur.

Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern des Forschungslabors der Urologie Homburg, insbesondere Gullan Hebel-Klebsch.

Ich möchte mich bei Professor Dr. Michael Stöckle bedanken, der für eine sehr gute Kooperation der Klinik mit dem Forschungslabor gesorgt hat.

Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Martin Janssen, dessen Engagement für die Nachsorge der Patienten immens zur Qualität der verwendeten Kohorte beigetragen hat.

Ich danke Sophie Baumgart für die enorme Hilfe bei der Zellkultur und für diverse Stunden Diskussion über alle Teile dieser Arbeit und darüber hinaus.

Ich danke vor allem und von ganzem Herzen meiner Verlobten für die vielen Jahre der Unterstützung und Liebe und ihrer Begabung für Kommasetzung.