

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Stöckle  
Experimentelle Urologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar  
Leitung: Prof. Dr. med. Kerstin Junker

# **Untersuchung der intratumoralen Heterogenität des klarzelligen Nierenzellkarzinoms mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

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

2021

vorgelegt von: Severin Johannes Stahl

geb. am: 13.01.1993 in Passau

Tag der Promotion: 28. September 2021

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Kerstin Junker

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Oertel

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	- 1 -
1.1	Deutsche Zusammenfassung .....	- 1 -
1.2	Abstract .....	- 3 -
2	Einleitung .....	- 5 -
2.1	Epidemiologie .....	- 5 -
2.2	Risikofaktoren .....	- 5 -
2.2.1	Risikofaktoren mit hoher Evidenz und Dosis-Wirkungs-Beziehung .....	- 5 -
2.2.2	Risikofaktoren mit geringer Evidenz ohne eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung.....	- 6 -
2.3	Klassifikation des Nierenzellkarzinoms .....	- 7 -
2.3.1	Histologische Subtypen des Nierenzellkarzinoms .....	- 7 -
2.3.2	Tumor-Staging.....	- 8 -
2.3.3	Tumor-Grading.....	- 9 -
2.4	Makroskopie und Mikroskopie des klarzelligem Nierenzellkarzinoms .....	- 10 -
2.4.1	Makroskopischer Aufbau des klarzelligem Nierenzellkarzinoms .....	- 10 -
2.4.2	Mikroskopischer Aufbau des klarzelligem Nierenzellkarzinoms.....	- 10 -
2.4.3	Histologischer Ursprung des klarzelligem Nierenzellkarzinoms .....	- 10 -
2.5	Genetik des Nierenzellkarzinoms.....	- 11 -
2.5.1	Erbliche Formen des Nierenzellkarzinoms.....	- 11 -
2.5.2	Von-Hippel-Lindau-Syndrom .....	- 12 -
2.5.3	Mechanismus des 3p Verlusts im sporadischen klarzelligem Nierenzellkarzinom.....	- 13 -
2.5.4	Driver-Mutationen.....	- 14 -
2.6	Tumorheterogenität .....	- 15 -
2.7	Kontingenz und Konvergenz in der Tumorevolution.....	- 16 -
2.8	Prognose .....	- 16 -
2.8.1	Klinische Prognosefaktoren.....	- 16 -
2.8.2	Multivariable Prognosemodelle.....	- 17 -
2.8.3	Molekulare Prognosemarker .....	- 18 -
2.9	Therapie.....	- 19 -

## Inhaltsverzeichnis

---

2.9.1	Behandlung des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms.....	- 19 -
2.9.2	Systemische Therapie des fortgeschrittenen klarzelligen Nierenzellkarzinoms.....	- 20 -
2.9.3	Lokale Therapie des fortgeschrittenen klarzelligen Nierenzellkarzinoms .....	- 21 -
2.10	Ziel dieser Arbeit.....	- 22 -
3	Material und Methoden.....	- 23 -
3.1	Patientenkollektiv.....	- 23 -
3.2	Verwendete Materialien .....	- 24 -
3.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	- 25 -
3.4	Übersicht des Versuchsablaufs.....	- 27 -
3.5	Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	- 28 -
3.5.1	Schneiden, Auswahl und Markierung des Tumorgewebes.....	- 28 -
3.5.2	Vorbehandlung: Entparaffinieren und Proteolyse .....	- 28 -
3.5.3	Sondenaufbereitung, Denaturierung und Hybridisierung.....	- 28 -
3.5.4	Post-Hybridisierungs-Waschschritte und Gegenfärbung .....	- 29 -
3.5.5	Gegenfärbung .....	- 30 -
3.5.6	Zur mikroskopischen Auswertung verwendete Geräte .....	- 30 -
3.6	Datenerfassung und Statistik .....	- 30 -
4	Ergebnisse .....	- 32 -
4.1	Kriterien und Vorgehensweise zur optischen Auswertung der FISH.....	- 32 -
4.1.1	Untersuchung auf Zugewinne der chromosomalen Region 1q21.3.....	- 32 -
4.1.2	Untersuchung auf Zugewinne der chromosomalen Region 7q36.3.....	- 33 -
4.1.3	Untersuchung auf Verluste in der chromosomalen Region 9p21.3–p24.1 .....	- 33 -
4.1.4	Untersuchung auf Zugewinne der chromosomalen Region 20q11.21–q13.32.....	- 34 -
4.2	Deskriptive Auswertung der FISH-Ergebnisse .....	- 34 -
4.2.1	Absolute Anzahl der Aberrationen je Sonde und Areal .....	- 34 -
4.2.2	Mittelwerte der Aberrationen .....	- 35 -
4.3	Untersuchung der intratumoralen Heterogenität .....	- 35 -
4.3.1	Standardabweichung der Aberrationen zwischen den Tumorarealen A, B und C eines Patienten.....	- 35 -

4.3.2	Variationskoeffizient der Aberrationen zwischen den drei Tumorarealen A, B und C eines Patienten.....	37 -
4.3.3	Intratumorale Heterogenität und TumorgroÙe.....	38 -
4.3.4	Intratumorale Heterogenität und Overall Survival .....	39 -
4.4	Auswirkung der intratumorale Heterogenität auf das Prognosemodell.....	41 -
4.4.1	Auswirkung der intratumorale Heterogenität auf die Bewertung der Tumorareale A, B und C - 41 -	
4.4.2	Auswirkung der intratumorale Heterogenität auf die Total Number of Specific Aberrations (TNSA).....	43 -
4.4.3	Auswirkungen der intratumorale Heterogenität auf die Einteilung in Risikogruppen aus TNSA und T-Kategorie .....	44 -
4.5	Einfluss der intratumorale Heterogenität auf die Trefferwahrscheinlichkeit in Anhängigkeit von der Anzahl ausgewerteter Areale .....	45 -
4.5.1	Trefferwahrscheinlichkeit Copy Number Variations .....	45 -
4.5.2	Trefferwahrscheinlichkeit Hochrisikopatienten .....	47 -
4.6	Validierung des Prognosemodells am Patientenkollektiv .....	48 -
4.6.1	Metastasierung.....	48 -
4.6.2	Recurrence Free Survival .....	49 -
4.6.3	Overall Survival .....	52 -
5	Diskussion.....	56 -
5.1	Intratumorale Heterogenität von Copy Number Variations (CNVs).....	56 -
5.2	Die FISH als Methode zur Untersuchung der intratumorale Heterogenität .....	58 -
5.3	Anzahl der Tumorproben und Trefferquote .....	59 -
5.4	Intratumorale Heterogenität und TumorgroÙe.....	60 -
5.5	Intratumorale Heterogenität und Krankheitsprogress.....	62 -
5.6	Validierung des Prognosemodells .....	63 -
6	Schlussfolgerungen .....	65 -
7	Literaturverzeichnis.....	66 -
8	Lebenslauf .....	80 -
9	Danksagung.....	81 -

## Abkürzungsverzeichnis

---

aCGH	<i>array-based Comparative Genomic Hybridization</i>
BMI	Body-Mass-Index
ccRCC	clear cell Renal Cell Carcinoma
CNV	<i>Copy Number Variation</i> (Kopienzahlvariation)
CSS	<i>Cancer Specific Survival</i> (krebspezifisches Überleben)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
EAU	<i>European Association of Urology</i>
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
IMDC	<i>International Metastatic RCC Database Consortium</i>
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
ITH	intratumorale Heterogenität
KI	Konfidenzintervall
k/p/ch NZK	klarzelliges/papilläres/chromophobes Nierenzellkarzinom
<i>M</i>	Mittelwert
MRCA	<i>Most Recent Common Ancestor</i> (letzter gemeinsamer Vorfahr)
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
NZK	Nierenzellkarzinom
OS	<i>Overall Survival</i> (Gesamtüberleben)
PD1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Cell Death 1 Ligand 1</i>
PFS	<i>Progression Free Survival</i> (progressionsfreies Überleben)
<i>PP</i>	<i>Prediction Probability</i> (Prognosewahrscheinlichkeit)
RFS	<i>Recurrence Free Survival</i> (rezidivfreies Überleben)
ROC-Kurve	<i>Receiver-Operating-Characteristic-Kurve</i>
<i>SD</i>	Standardabweichung
$\overline{SD}$	durchschnittliche Standardabweichung
SRM	<i>Small Renal Mass</i> (kleiner Nierentumor)
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TNM-Klassifikation	Tumor-Nodus-Metastasen-Klassifikation
TNSA	<i>Total Number of Specific Aberrations</i> (Gesamtzahl spezifischer Aberrationen)
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
<i>v</i>	Variationskoeffizient
$\bar{v}$	durchschnittlicher Variationskoeffizienten
VEGF/R	<i>Vascular Endothelial Growth Factor/Receptor</i>
VHL	von-Hippel-Lindau

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

Die Prognose des klarzelliges Nierenzellkarzinoms (kNZK) wird maßgeblich von dessen Metastasierungsverhalten bestimmt. Während Patienten mit lokal begrenzten Tumoren eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 90 % haben, sinkt bei vorhandenen Fernmetastasen das Überleben auf 12 % (SEER Cancer Statistics Review). Primär lokal begrenzte Tumoren entwickeln in 20–30 % metachrone Metastasen (Dabestani et al., 2018). Diese Patienten haben ein durch klinische Kriterien nur unzureichend vorhersehbares Metastasierungsrisiko. Daher ist die Entwicklung molekularer Prognosemarker für die Verbesserung der Therapie des kNZK von großer Bedeutung. Durch neue Techniken und sinkende Kosten in genetischen Analyseverfahren konnten in den vergangenen Jahren erhebliche Fortschritte im Verständnis der Tumorgenetik gemacht werden. Eine dieser Erkenntnisse ist, neben einer genetischen Heterogenität des kNZK zwischen verschiedenen Patienten, die genetische Heterogenität innerhalb eines Tumors. (McGranahan and Swanton, 2017; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013) Viele Autoren sehen die Entwicklung von Biomarkern im Zusammenhang mit dieser Beobachtung als problematisch an. Sie argumentieren, dass Tumoranalysen, die auf Einzelproben basieren, der intratumoralen Heterogenität (ITH) im kNZK nur unzureichend gerecht werden. (Turajlic et al., 2018a; Lubbock et al., 2017; Gerlinger et al., 2014a; Gulati et al., 2014; Martinez et al., 2013)

Ein potentieller genetischer Prognosemarker, der in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde, ist die Gesamtzahl spezifischer Aberrationen (*Total Number of Specific Aberrations* TNSA). In ihr werden Kopienzahlvariationen (*Copy Number Variations* CNVs) der vier prognostisch relevanten chromosomalen Regionen 1q21.3, 7q36.3, 9p21.3p24.1 und 20q11.21q13.32 miteinander vereint (Sanjmyatav et al., 2014, 2011). Die TNSA konnte bereits erfolgreich zusammen mit weiteren klinischen Daten in ein Modell zur Prognosebewertung des klarzelliges Nierenzellkarzinoms eingearbeitet werden (Grimm et al., 2019).

Jedoch können die Erkenntnisse zur intratumoralen Heterogenität im kNZK nicht unberücksichtigt bleiben. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die beschriebene Heterogenität und deren Auswirkungen auf die TNSA zu untersuchen. Dazu wurden parallel jeweils drei Tumoreale von 20 Patienten mit gesichertem kNZK untersucht. Das operativ gewonnene Probenmaterial bestand aus Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem (FFPE) Tumorgewebe. Dieses wurde mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) hinsichtlich Kopienzahlveränderungen in den vier genannten chromosomalen Regionen ausgewertet. In 40 % der untersuchten Patienten war dabei eine Heterogenität zu beobachten, die das Prognosemodell beeinflusste. Damit muss den Argumenten aus der Literatur zugestimmt werden, dass die genetische Heterogenität innerhalb eines Tumors Probleme bei der Entwicklung von Biomarkern verursachen kann. In dieser Arbeit ließen sich jedoch ebenfalls durch das Prognosemodell, trotz bestehender Heterogenität, 78 % der metastasierten Hochrisikopatienten mit einer einzelnen

Gewebeprobe identifizieren. Durch eine geringe Steigerung des Probenumfangs wurde dieser Wert auf beinahe 99 % erhöht.

Bei der Auswertung von 100 Zellkernen pro Tumorareal betrug die durchschnittliche Standardabweichung der gezählten Aberrationen zwischen den drei Arealen eines Patienten nur 12,21. Damit scheint die FISH eine sehr robuste Methode zu sein, um CNVs in einem Tumor trotz vorhandener Heterogenität bzgl. der diagnostischen und prognostischen Wertigkeit zu bestimmen.

Die erbrachten Daten deuten weiter darauf hin, dass die intratumorale Heterogenität mit der TumorgroÙe positiv korreliert ( $r = 0,581$ ;  $p = 0,007$ ). Ebenso war bei erhöhter intratumoraler Heterogenität eine Assoziation zur Metastasierung gegeben ( $p = 0,007$ ) und zwischen Patienten mit niedriger und hoher Heterogenität lieÙen sich signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben darstellen (Log-Rank-Test:  $p = 0,012$ ). Diese Beobachtungen lassen sich in Einklang mit dem derzeitigen Verständnis von Tumorevolution und -progression bringen.

Als weitere Erkenntnis dieser Arbeit könnte der Multiprobenansatz, der primär zur Untersuchung der Heterogenität genutzt wurde, auch das Einzelproben-basierte Prognosemodell weiter verbessern. Durch Verwendung des Modalwertes der TNSA aus den drei untersuchten Arealen eines Primärtumors stieg die Sensitivität des Prognosemodells, eine Metastasierung vorherzusagen, auf 90 % an.

Diese Arbeit stellt eine der wenigen Untersuchungen dar, die sich den Effekten der ITH auf genetische Prognosemodelle im kNZK widmen. Die erbrachten Daten dienen so dem langfristigen Ziel der Etablierung eines molekularen Biomarkers für die Routinediagnostik. So können die Erkenntnisse dieser Arbeit genutzt werden, um der beschriebenen Heterogenität im kNZK zu begegnen und deren Einflüsse zu berücksichtigen. Auch wenn Prognosemodelle immer nur einen Versuch darstellen, Vorgänge in der Natur zu vereinfachen und deren Komplexität nur schwer gerecht werden, so sind sie doch ein wichtiges Hilfsmittel für den praktizierenden Arzt in der Therapie von malignen Erkrankungen.



## 1.2 Abstract

The prognosis of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is mainly determined by its metastatic behavior. While patients with localized tumors have a 5-year survival rate of more than 90 %, survival decreases to 12 % with distant metastases (SEER Cancer Statistics Review). Primary localized tumors develop metachronous metastases in 20–30 % (Dabestani et al., 2018). These patients have an insufficiently predictable risk of metastasis based on clinical criteria. Therefore, the development of molecular prognosis markers is of great importance for the improvement of the therapy of ccRCC. In recent years, new techniques and decreasing costs in genetic analysis methods have led to considerable progress in the understanding of tumor genetics. One of these findings is, besides a genetic heterogeneity of the ccRCC between different patients, the genetic heterogeneity within a tumor. (McGranahan and Swanton, 2017; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013) Many authors see the development of biomarkers critical in context with this observation. They argue that tumor analyses based on single samples do not adequately reflect the intratumor heterogeneity (ITH) in the ccRCC. (Turajlic et al., 2018a; Lubbock et al., 2017; Gerlinger et al., 2014a; Gulati et al., 2014; Martinez et al., 2013).

A potential genetic prognosis marker developed in our group is the Total Number of Specific Aberrations (TNSA). It combines copy number variations (CNVs) of the four prognostically relevant chromosomal regions 1q21.3, 7q36.3, 9p21.3p24.1 and 20q11.21q13.32 (Sanjmyatav et al., 2014, 2011). The TNSA has already been successfully integrated with other clinical data into a model for the prognostic evaluation of ccRCC (Grimm et al., 2019).

However, the findings on intratumor heterogeneity in the ccRCC cannot be ignored. Therefore, the aim of this work was to investigate the described heterogeneity and its effects on TNSA. Three tumor areas of 20 patients with confirmed ccRCC were examined at the same time. The surgically obtained sample material consisted of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue. This was evaluated by fluorescence in situ hybridization (FISH) for copy number changes in the four chromosomal regions mentioned above. Heterogeneity which influenced the prognosis model was observed in 40 % of the patients examined. Therefore, the arguments from the literature that genetic heterogeneity within a tumor can cause problems in the development of biomarkers have to be accepted. However, in this study 78 % of high-risk patients could be identified despite the heterogeneity with a single tissue sample by using the prognostic model. By slightly increasing the sample size this value was increased to almost 99 %.

When analyzing 100 cell nuclei per tumor area, the mean standard deviation of the counted aberrations between the three areas of a patient was only 12,21. As a result FISH seems to be a very reliable method to determine CNVs in a tumor despite existing heterogeneity with respect to diagnostic and prognostic value.

The data obtained further suggest that intratumor heterogeneity is positively correlated with tumor size ( $r = 0,581$ ;  $p = 0,007$ ). In addition, increased intratumor heterogeneity was associated with metastasis

( $p = 0,007$ ) and significant differences in overall survival were observed between patients with low and high heterogeneity (log-rank test:  $p = 0,012$ ). These observations can be brought in line with the current understanding of tumor evolution and progression.

As a further finding of this work, the multi-sample approach, which was primarily used to study heterogeneity, could also further improve the single-sample-based prognosis model. By using the most frequent TNSA value from the three examined areas of a primary tumor, the sensitivity of the prognostic model to predict metastasis increased to 90 %.

This work represents one of the few studies focusing on the effects of ITH on genetic prognosis models in ccRCC. The data obtained thereby serve the long-term goal of establishing a molecular biomarker for routine diagnostics. The findings of this work will help to investigate new approaches to address the described heterogeneity in the ccRCC and to consider its influences.

Even though prognostic models are only an attempt to simplify processes in nature and can barely cope with their complexity, they are an important tool for the practicing physician in the therapy of malignant diseases.

## 2 Einleitung

### 2.1 Epidemiologie

Im Jahr 2014 erkrankten in Deutschland 9 480 Männer und 5 480 Frauen an malignen Neubildungen der Niere, was einem Anteil von etwa 3 % aller neu aufgetretenen Krebserkrankungen entspricht (Krebsdatenbank Deutschland, 2017). Dabei ist das Nierenzellkarzinom (NZK) mit etwa 96 % der häufigste maligne Tumor der Niere im Erwachsenenalter. Das mittlere Erkrankungsalter liegt mit 72 Jahren bei den Frauen etwas höher als bei den Männern mit 67 Jahren. Während die Erkrankungsraten seit Ende der 1990er Jahre in Deutschland konstant blieben, ist die Prävalenz durch den demografischen Wandel erheblich gestiegen.

Die altersstandardisierte Erkrankungsrate pro 100 000 ist bei Männern mit 17,0 mehr als doppelt so hoch wie bei Frauen mit 8,0. Innerhalb der Bundesrepublik finden sich deutliche Unterschiede in den Inzidenzraten. So erfasste die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) in ihren neuesten Hochrechnungen aus dem Jahr 2016 in der männlichen Bevölkerung Raten zwischen 17,1 in Niedersachsen und 11,7 in Baden-Württemberg (GEKID e.V., 2017). Auch bei den Frauen schwanken die Inzidenzraten zwischen 7,6 in Niedersachsen und 4,9 in Baden-Württemberg. Bei diesen Zahlen sollte jedoch die unterschiedliche Vollständigkeit in der Datenerfassung zwischen den einzelnen Bundesländern beachtet werden. Im europäischen Vergleich zählt Deutschland zu den Ländern mit den höchsten Inzidenzraten. Diese variieren stark: von 4,2 (Männer) und 2,1 (Frauen) in Zypern bis hin zu 22,1 (Männer) und 9,9 (Frauen) in Tschechien (Li et al., 2015; Forman, 2013). Beobachtet man die Sterberaten im zeitlichen Verlauf, so erreichten diese zu Beginn der 90er Jahre in Deutschland ihren Höhepunkt und sanken dann bis ins Jahr 2004 um über 30 % (Bosetti et al., 2011; Levi et al., 2008). Dieser Trend war auch in vielen anderen europäischen Ländern zu beobachten.

### 2.2 Risikofaktoren

#### 2.2.1 Risikofaktoren mit hoher Evidenz und Dosis-Wirkungs-Beziehung

Als einer der am besten dokumentierten Risikofaktoren für die Entstehung des NZK gilt das Tabakrauchen. Hunt et al. (2005) konnten in einer Metaanalyse, bestehend aus 24 Studien, eine klare dosisabhängige Risikozunahme bei Rauchern für das Auftreten eines NZK nachweisen. Das relative Risiko im Vergleich zu Nichtrauchern betrug dabei das 1,38-Fache (95 % Konfidenzintervall (KI): 1,27–1,50). Dieser Zusammenhang war bei Männern stärker ausgeprägt als bei Frauen. Ebenso nahm bei Männern, die für eine lange Zeit das Rauchen aufgegeben hatten, das Risiko, an einem NZK zu erkranken, wieder ab. Einige Studien verwiesen auch darauf, dass bei Rauchern mehr fortgeschrittene Tumorstadien diagnostiziert werden, als bei Patienten, die zum Zeitpunkt ihrer Diagnose Nichtraucher waren (Tsivian et al., 2011; Parker et al., 2008). Als Ursachen für die negativen Auswirkungen des Tabakkonsums werden die DNA schädigende Wirkung von Nitrosaminen und Benzo[a]pyren, die im

Tabakrauch enthalten sind, aber auch der nephrotoxische Effekt des Rauchens an sich genannt (Ridge et al., 2014; Clague et al., 2009a; Zhu et al., 2008; Orth, 2002).

Mehrere Arbeiten belegten zudem, dass Übergewicht und Adipositas einen Einfluss auf die Inzidenz des NZK haben (Häggström et al., 2013; Adams et al., 2008; Chow et al., 2000). So konnte ein direkter Dosis-Wirkungs-Zusammenhang mit einem Anstieg des relativen Risikos um das 1,24-Fache bei Männern und das 1,34-Fache bei Frauen je Erhöhung des Body-Mass-Index (BMI) um 5 kg/m<sup>2</sup> gezeigt werden (Renehan et al., 2008). Auch Setiawan und Kollegen (2007) beobachteten einen ähnlichen Risikozuwachs bei Übergewichtigen in ihrer Studie. Des Weiteren wurde auch die Zunahme des Körpergewichts über einen längeren Zeitraum als unabhängiger Risikofaktor bestätigt. Dabei sind vor allem Gewichtsänderungen in den jungen Erwachsenenjahren von größerer Bedeutung (Adams et al., 2008; Chow et al., 2000). Die durch Übergewicht verursachten Veränderungen in der Hämodynamik der Niere, Lipidperoxidation und eine vermehrte inflammatorische Antwort werden in der Literatur als verstärkende Einflüsse der Karzinogenese diskutiert (Klinghoffer et al., 2009).

Als dritter, hoch evidenter ätiologischer Faktor für die Entstehung des NZK, mit einer in mehreren Studien belegten Dosis-Wirkungs-Beziehung, gilt die arterielle Hypertonie. Obwohl diese in Beziehung zum erhöhtem BMI steht, konnte sie als unabhängiger Risikofaktor bestätigt werden (Chow et al., 2010, 2000). In einer groß angelegten Studie mit mehr als 250 000 Teilnehmern aus acht europäischen Ländern stellte die Arbeitsgruppe um Weikert et al. (2008) einen deutlichen Risikozuwachs für Hypertoniker fest. Demnach stieg im Vergleich zu Personen mit normalen Blutdruckwerten (< 120/80 mmHg) bei Probanden mit einem systolischen Blutdruck von  $\geq 160$  mmHg das relative Risiko um das 2,48-Fache (95 % KI: 1,53–4,02) und bei einem diastolischen Blutdruck  $\geq 100$  mmHg um das 2,34-Fache (95 % KI: 1,54–3,55).

### 2.2.2 Risikofaktoren mit geringer Evidenz ohne eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung

Einige weitere Risikofaktoren werden in der Literatur unterschiedlich bewertet. So wird beispielsweise Schwangerschaft in einigen Studien als Risiko angesehen, das sogar mit zunehmender Zahl der Geburten steigt (Kabat et al., 2007; Lambe et al., 2002). Andere Autoren wie Setiawan (2009) konnten jedoch in ihren Arbeiten diesen Zusammenhang nicht nachvollziehen. Eine weitere Risikogruppe sind Personen mit erworbener zystischer Nierenerkrankung, welche bei etwa 20 % der Dialysepatienten nach 1 bis 3 Jahren Behandlungszeit auftritt (Matson and Cohen, 1990). Für diese Patienten steigt laut einer Studie die Wahrscheinlichkeit, ein NZK zu entwickeln, um das 50-Fache im Vergleich zur Normalbevölkerung (Truong et al., 1995). Auch der Einfluss von Alkoholkonsum auf die Inzidenz des NZK wird kontrovers diskutiert (Kabaria et al., 2016). So konnte in einigen großen Metaanalysen eine Abnahme des Risikos bei regelmäßigem Alkoholkonsum beobachtet werden. Jedoch sind die Angaben über Menge und Art der alkoholischen Getränke, die als protektiv gelten, sehr unterschiedlich (Xu et al., 2015; Bellocco et al., 2012; Song et al., 2012). Andere Untersuchungen konnten dagegen keinen Zusammenhang zwischen dem Konsum von Alkohol und einer Änderung der Häufigkeit des NZK

belegen (Washio et al., 2014; Macleod et al., 2013). Verschiedene Nicht-Opioid-Analgetika stehen ebenfalls im Verdacht, das Risiko für ein NZK zu erhöhen, die Aussagen sind jedoch auch hier widersprüchlich. Zwei größere Metaanalysen sehen einen Risikozuwachs bei der Einnahme von Paracetamol, nicht jedoch von Acetylsalicylsäure (Karami et al., 2016; Choueiri et al., 2014). Cho et al. (2011) fanden hingegen keinen Zusammenhang zwischen Paracetamol und dem NZK Risiko. An Diabetes mellitus erkrankte Personen scheinen ebenso eine erhöhte Rate für maligne Neubildungen der Niere aufzuweisen. Jedoch zeigten viele Arbeiten, nachdem mögliche Störvariablen wie ein erhöhter BMI angeglichen wurden, keinen statistisch signifikanten Zusammenhang (Macleod et al., 2013; Larsson and Wolk, 2011; Zucchetto et al., 2007). Ballaststoffreiche Ernährung, davon im speziellen Gemüse, führt laut einigen Autoren zu einer Abnahme des Risikos. Jedoch sind auch gegenteilige Ergebnisse zu finden (Huang et al., 2014; Zhao and Zhao, 2013).

Auch einige Arbeitsstoffe scheinen in Verbindung mit dem NZK zu stehen. So konnte in einer kanadischen Studie der beruflich bedingte Umgang mit einigen Chemikalien (Benzen, Benzidin, Kohlenteer, Ruß, Pech, Kreosat, Asphalt, Herbizide, Mineralöl, Senfgas, und Vinylchlorid) in einen Zusammenhang mit dem Auftreten eines NZK gebracht werden (Hu et al., 2002). Als kanzerogen wurde auch das Lösungsmittel Trichlorethylen in einigen Arbeiten bewertet (Karami et al., 2016; Moore et al., 2010; Brüning et al., 2003).

Clague et al. (2009b) zeigten in drei unterschiedlichen Studientypen eine Risikozunahme um das 2,2- bis 4,3-Fache bei Patienten, die eine familiäre Vorbelastung mit NZK hatten. Dabei war das Risiko durch vorbelastete Geschwister größer als durch bereits erkrankte Eltern. Daher scheinen nicht nur die sehr seltenen dominant vererbten genetischen Erkrankungen wie das von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom), sondern auch rezessiv vererbte Keimbahnmutationen, eine wichtige Rolle zu spielen (Clague et al., 2009b). Diese Hypothese beruht auf der Tatsache, dass rezessive Vererbung vermehrt durch betroffene Geschwister (Geschwister Risiko) und dominante Vererbung vermehrt durch erkrankte Eltern (Nachwuchs Risiko) zum Ausdruck kommt (Hemminki and Li, 2004; Dong and Hemminki, 2001). Auf die unterschiedlichen erblichen Formen des NZK wird in Abschnitt 2.5 genauer eingegangen.

## 2.3 Klassifikation des Nierenzellkarzinoms

### 2.3.1 Histologische Subtypen des Nierenzellkarzinoms

In der aktuellen WHO-Klassifikation von 2016 werden zur Differenzierung der verschiedenen Nierentumoren sowohl morphologische, molekulare als auch genetische Kriterien verwendet (Warren and Harrison, 2018). Das NZK, welches die häufigste Form der malignen Neubildungen der Niere darstellt, wird dabei in eine Vielzahl verschiedener Subtypen unterteilt (vgl. Tabelle 1). Die häufigsten Subtypen sind das klarzellige (k), das papilläre (p) sowie das chromophobe (ch) NZK (Warren and Harrison, 2018; Moch et al., 2016; Eble, 2004). In dieser Arbeit wurden ausschließlich kNZK

untersucht, weshalb in den darauffolgenden Abschnitten besonders auf diese Entität genauer eingegangen wird.

Tabelle 1: WHO Klassifizierung der verschiedenen Nierenzelltumoren und deren Häufigkeit (Moch et al., 2016)

Einteilung der Nierenzelltumoren	Relative Häufigkeit
kNZK	70–90 %
pNZK, Typ I und II	10–15 %
chNZK	3–5 %
entartetes Onkozytom	Ca. 5 %
Hereditäre Leiomyomatosis assoziiertes NZK	Jeweils < 5 %
Multilokuläres zystisches NZK niedriger Malignität	
Ductus Bellini (Sammelrohr) Karzinom	
Medulläres NZK	
Mikrophthalmie-Transkriptionsfaktor (MiT)-Familie der Translokationskarzinom der Niere	
Succinat-Dehydrogenase-defizientes NZK	
Tubulozystisches NZK	
Erworbenes, mit zystischen Erkrankungen assoziiertes NZK	
Klarzellig-papilläres NZK	
NZK unklassifizierbar	
Papilläres Adenom	
Muzinös tubuläres und spindelzelliges Karzinom	

### 2.3.2 Tumor-Staging

Derzeit wird sowohl in den Leitlinien der European Association of Urology (EAU) als auch in den deutschen S3 Leitlinien die Verwendung der Tumor-Nodus-Metastasen-Klassifikation (TNM-Klassifikation) zum Staging des NZK empfohlen (EAU Guidelines, 2017; S3 Leitlinien AWMF, DKG, DKH, 2017). Da diese Arbeit ausschließlich Patienten aus einem Behandlungszeitraum von 2005 bis 2011 beinhaltet, zeigt

Tabelle 2 eine Gegenüberstellung der damals gültigen 6. (2002) und der aktuellen 8. (2016) Auflage der TNM-Klassifikation. Ebenso finden sich in ihr die Tumorstadien gemäß der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) (Williamson et al., 2019; Brierley et al., 2016; Billia et al., 2011).

Tabelle 2: Vergleich der 6. und 8. Auflage der TNM-Klassifikation sowie Darstellung der UICC-Stadien (Williamson et al., 2019)

TNM	6. Auflage 2002	Neuerungen der 8. Auflage 2016
T1	T1a: Tumor < 4 cm organbegrenzt T1b: Tumor 4–7 cm organbegrenzt	
T2	T2: Tumor > 7 cm organbegrenzt	T2a: Tumor 7–10 cm organbegrenzt T2b: Tumor > 10 cm organbegrenzt
T3	T3a: Tumor infiltriert Nebenniere / Sinus / perirenales Fettgewebe, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus	T3a: Tumor infiltriert Nierenvene oder ihrer segmentalen Äste / Nierenbeckenkelchsystem / Nierensinus /

	T3b: Tumor infiltriert Nierenvene(n) oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells	perirenales Fettgewebe, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus T3b: Tumor Ausbreitung in Vena cava unterhalb des Zwerchfells (ohne Infiltration der Wand der Vena cava)	
	T3c: Tumor infiltriert Vena cava oberhalb des Zwerchfells	T3c: Tumor Ausbreitung in Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder mit Infiltration der Wand der Vena cava	
T4	T4: Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus	T4: Tumor infiltriert über Gerota-Faszie hinaus oder ipsilateraler Nebennierenbefall	
N	N1: Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten N2: Metastase(n) in mehr als einem regionären Lymphknoten	N1: Metastasen in einem oder mehreren Lymphknoten	
M	M0: Keine Fernmetastasen M1: Fernmetastasen		
<b>Tumorstadium</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3 T1, T2, T3	N0 N1	M0 M0
Stadium IV	T4 jedes T	jedes N jedes N	M0 M1

### 2.3.3 Tumor-Grading

Auch das Grading des NZK unterliegt einem stetigen Wandel mit einer Vielzahl verwendeter Systeme (Delahunt et al., 2019). Derzeit wird für das klarzellige und papilläre NZK das 4-stufige-Grading nach WHO/International Society of Urological Pathology (ISUP) empfohlen (vgl. Tabelle 3). Dieses zeichnet sich durch eine bessere Reproduzierbarkeit aus und soll das Grading nach Fuhrmann ersetzen, welches vor allem in den USA weit verbreitet ist (Warren and Harrison, 2018). Das Vorhandensein von Tumornekrosen sollte, da es sich als prognostisch ungünstiger Faktor erwiesen hat, zusätzlich vom untersuchenden Pathologen angegeben werden. Es ist jedoch kein fester Bestandteil des Graduierungssystems (Moch, 2016; Delahunt et al., 2013).

Tabelle 3: WHO/ISUP Graduierungssystem für das kNZK und pNZK (Delahunt et al., 2019)

Grad	Kriterien
1	Basophile Tumorzellnucleolen nicht vorhanden bzw. unauffällig bei 400-facher Vergrößerung
2	Deutlich sichtbare eosinophile Tumorzellnucleolen bei 400-facher Vergrößerung, bei 100-facher Vergrößerung erkennbar, jedoch nicht prominent
3	Deutlich sichtbare eosinophile Tumorzellnucleolen bei 100-facher Vergrößerung
4	Tumorzellen zeigen extreme Kernpolymorphismen, riesige Tumorzellen und/oder sarkomatoide und/oder rhabdoide Dedifferenzierung

## 2.4 Makroskopie und Mikroskopie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

### 2.4.1 Makroskopischer Aufbau des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Das sporadische kNZK tritt meist einzeln, nur in 4 % der Fälle multizentrisch und in 3 % beidseitig auf (Algaba et al., 2011). Ein beidseitiges oder multiples Auftreten im jungen Lebensalter spricht für eine hereditäre Tumorform als Ursprung der Erkrankung (Adeniran et al., 2015). Für gewöhnlich zeigt sich das kNZK als runde, höckerige Tumormasse, welche von einer Pseudokapsel umgeben ist. In ihrer Farbe variieren die Tumoren deutlich. Häufig erscheinen sie goldgelblich, was auf den hohen Lipidanteil der Tumorzellen zurückzuführen ist. Der Lipidanteil setzt sich aus Cholesterin, neutralen Lipiden und Phospholipiden zusammen. Gelegentlich finden sich Kalzifikationen, Hämorrhagien und Tumornekrosen, die mit einem aggressiveren Tumorwachstum assoziiert sind. (Moch, 2013; Eble, 2004; Störkel, 1999) In einigen kNZK entstehen Zysten, die wahrscheinlich als Folge von Nekrosen als Pseudozysten oder aber als echte neoplastische Zysten gewertet werden können. Tumoren, die nur aus zystischen Anteilen bestehen, stellen eine Sonderform der NZK dar und werden als multilokuläre zystische NZK niedriger Malignität bezeichnet (Bhatt et al., 2016; Suzigan et al., 2006).

### 2.4.2 Mikroskopischer Aufbau des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Das namensgebende „klarzellige“ Aussehen dieser Tumorform zeigt sich bei dessen mikroskopischer Betrachtung. Bei Verwendung histologischer Routinefärbungen, wie der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), werden die weiter oben beschriebenen Lipidanteile aus dem Zytoplasma der Zellen herausgelöst. Dadurch kommen die typischen klar erscheinenden Zellen zum Vorschein. Viele Tumoren beinhalten jedoch auch kleine Zellpopulationen mit eosinophilem Zytoplasma. Die Nukleolen unterscheiden sich je nach Tumorgrad, von nicht sichtbaren basophilen bis hin zu deutlich sichtbaren eosinophilen Nukleolen (vgl. Tabelle 3). Die Zellarchitektur des kNZK ist sehr unterschiedlich, weist jedoch meist einen soliden, alveolären oder azinösen Aufbau auf. Dieser beinhaltet ein regelmäßiges Netzwerk aus kleinen Blutgefäßen. Selten finden sich auch tubulöse oder pseudopapilläre Muster. In etwa 5 % der Fälle sind sarkomatoide Veränderungen nachweisbar, die mit einer schlechteren Prognose verbunden sind. Zudem zeigt sich in den meisten kNZK eine leichte Entzündungsreaktion bis hin zu ausgeprägten lymphozytären und neutrophilen Infiltraten. (Zhang et al., 2018; Eble, 2004)

### 2.4.3 Histologischer Ursprung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Als Ursprungsort des kNZK wird oft der proximale Anteil des Sammelrohres der Niere genannt. Dafür sprechen eine Reihe von Proteinen und Oberflächenmarkern, die sich im Gewebe des kNZK nachweisen lassen und spezifisch für den proximalen Anteil des Nierentubulus sind (Frew and Moch, 2015). Dazu gehören CD10, Villin, NZK-Antigen, interzelluläres Adhäsionsmolekül 1, Multidrug-Resistance-Associated-Protein-2 und spezifische Lektine (Bakshi et al., 2007; Mazal et al., 2005; Avery et al., 2000; Schaub et al., 1999). Genauso können kNZK jedoch auch typische Proteine des distalen Nierentubulus



exprimieren, wie Zytokeratin 19, CD24, und  $\alpha$ 3-Integrin (Paraf et al., 2000). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist die Vermutung, dass im Laufe der Tumorentwicklung Fähigkeiten des Tumors, bestimmte Proteine zu bilden, sowohl hinzugekommen als auch verlorengegangen sein könnten (Frew and Moch, 2015).

## 2.5 Genetik des Nierenzellkarzinoms

### 2.5.1 Erbliche Formen des Nierenzellkarzinoms

Etwa 2–4 % aller Nierenkarzinome lassen sich auf erbliche Tumorsyndrome zurückführen (Frew and Moch, 2015). In Tabelle 4 werden die derzeit bekannten Formen der erblichen Tumorsyndrome und der betroffenen Gene zusammengefasst. Für gewöhnlich zeigen Patienten mit erblichen Formen des NZK ein deutlich früheres und oft multiples, beidseitiges Auftreten von Tumoren (Adeniran et al., 2015). Patienten mit Verdacht auf ein hereditäres Nierenkarzinom-Syndrom sowie deren Familienmitglieder sollten einem genetischen Screening unterzogen werden. Ebenso wird eine engmaschige radiologische Kontrolle zur Surveillance möglicher Neoplasien empfohlen (Gaur et al., 2017).

Tabelle 4: Hereditäre NZK-Syndrome (Adeniran et al., 2015)

Syndrom	Betroffene Gene und Genloci	Histologische Typen von Nierentumoren
Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom)	<i>VHL</i> 3p25–26	kNZK
Hereditäres papilläres NZK	<i>MET</i> 7q31	pNZK Typ 1
Birt-Hogg-Dubé-Syndrom (BHD)	<i>BHD</i> 17p11.2	Onkozytome, Hybrid-onkozytäre/chromophobe NZK, kNZK, pNZK
Hereditäre Leiomyomatose mit NZK (HLRCC) / Reed-Syndrom	<i>FH</i> 1q42-43	pNZK Typ 2
Tuberöse Sklerose	<i>TSC1/TSC2</i> 9q34/16p13	Angiomyolipome, Nierenzysten, pNZK, kNZK, Onkozytome
Familiäres Phäochromozytom-Paragangliom-Syndrom (PGL)	<i>SDHB/SDHC/SDHD</i> 1p36/1q21/11q23	kNZK
Medulläres NZK und Sichelzellanämie	-	Medulläres NZK
PTEN Mutation und Cowden Syndrom	<i>PTEN</i> 10q22-23	kNZK, pNZK, chNZK
Hyperparathyreoidismus-Kiefertumor-Syndrom	<i>HRPT2</i> 1q21–32	Epitheliale/Stroma Mischtumoren, pNZK Wilms-Tumor
BAP1 Mutationen und familiärer Nierenkrebs	<i>BAP1</i> 3p21	kNZK
Konstitutionelle Chromosom-3-Translokation	Unbekannt Chromosom 3	kNZK

### 2.5.2 Von-Hippel-Lindau-Syndrom

Das autosomal-dominante VHL-Syndrom ist das häufigste erbliche Nierenkarzinom-Syndrom. Erkrankte zeigen mit einer Penetranz von bis zu 45 % ausschließlich kNZK (Adeniran et al., 2015). Bei den Betroffenen finden sich zudem Hämangioblastome im ZNS und in der Retina, Phäochromozytome sowie Pankreas- und Innenohrtumoren. Schon früh ergaben statistische Analysen von Altersinzidenzkurven, die sporadische NZK mit denen von VHL-Patienten verglichen, Hinweise auf die Mutation eines rezessiven Tumorsuppressors (Maher et al., 1990). Als Grundlage dieser Überlegungen diente die Hypothese von Knudson, wonach in der Entstehung von Tumoren zwei Mutationen („Hits“) nötig sind. Bei erblichen Tumorformen wurde bereits eine Mutation (erster „Hit“) vererbt, was eine deutlich frühere und häufigere Tumorentstehung begünstigt. Der zweite „Hit“ folgt im Sinne einer somatischen Mutation (Knudson, 1971). Diese kann durch unterschiedlichste Mechanismen wie Punktmutationen, Deletionen oder über eine Promoter Hypermethylierung entstehen (Nielsen et al., 2016; Prowse et al., 1997). Das *VHL*-Gen wurde 1993 von Latif et al. erstmals durch positionelle Klonierung in Position 3p25–26 als ursächlich verändertes Gen der VHL-Erkrankung identifiziert. Kurze Zeit später konnte nachgewiesen werden, dass dieses Gen auch in der Mehrzahl der sporadischen kNZK biallelisch verändert ist. Dadurch erscheint eine wichtige Rolle des *VHL*-Gens in der Tumorgenese des kNZK sehr wahrscheinlich (Gnarra et al., 1994). Das *VHL*-Gen kodiert für das Tumorsuppressorprotein pVHL. In seiner physiologischen Funktion dient pVHL als Wahrnehmungsuntereinheit eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, bestehend aus Elongin B, Elongin C, RBX1 und Cullin2. Dieser Komplex vermittelt die sauerstoffabhängige Proteolyse der Transkriptionsfaktoren Hypoxie-induzierter Faktor-1- $\alpha$  (HIF-1- $\alpha$ ) und HIF-2 $\alpha$ . (Frew and Moch, 2015; Maxwell et al., 1999) Der vollständige Verlust des Wildtyp *VHL*-Gens führt daher zu einer Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ . Diese dienen wiederum als Transkriptionsfaktoren für verschiedene Wachstumsfaktoren wie z.B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und den Glukosetransporter GLUT 1. Dadurch imitieren die Zellen ein Verhalten, als würden sie sich in einem chronisch hypoxischen Umfeld befinden und fördern somit das Tumorwachstum. (Gaur et al., 2017; Gossage et al., 2015; Frew and Moch, 2015) Neben diesen HIF-vermittelten Prozessen scheint pVHL noch weitere HIF-unabhängige Funktionen zu besitzen. Dazu zählen: der Aufbau und die Regulation der extrazellulären Matrix (Kurban et al., 2008), die Mikrotubuli Stabilisierung und die Aufrechterhaltung des Primärziliums (Thoma et al., 2007), die Regulierung der Apoptose (Lee et al., 2005), die Regulierung der zellulären Seneszenz (Welford et al., 2010; Young et al., 2008), die Aktivierung von p53 (Roe et al., 2006) und die Regulierung der Transkription (Kuznetsova et al., 2003). (Frew and Moch, 2015) Inwieweit diese HIF-unabhängigen Mechanismen mit der HIF-Deregulierung in der Tumorgenese zusammen spielen, ist noch nicht bekannt (Gossage et al., 2015). Die Untersuchung von Patienten mit erblichen kNZK brachte große Erkenntnisse in der Erforschung des sporadischen kNZK. Mittels immunhistochemischer Verfahren wurden in Nieren von VHL-Patienten tausende einzelne Zellen oder Zellverbände ohne pVHL

Funktion nachgewiesen (Montani et al., 2010; Mandriota et al., 2002). Die tatsächliche Anzahl an Zellen, welche später zu einem NZK heranwachsen, ist jedoch viel geringer. Diese Beobachtung impliziert, dass ein alleiniger Verlust von pVHL nicht ausreichend für die Entstehung eines Tumors ist, sondern dies vermutlich eher durch ein Zusammenspiel verschiedener Mutationen im richtigen Zelltyp geschieht (Frew and Moch, 2015).

### 2.5.3 Mechanismus des 3p Verlusts im sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinom

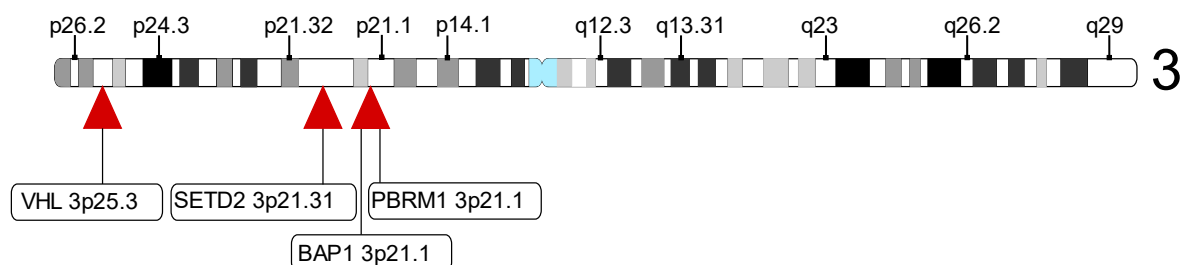
Mehrere großangelegte Studien konnten den Verlust der 3p Region mit dem darauf befindlichen *VHL*-Gen als häufigstes (> 90 %) und den Hinzugewinn von 5q (65–70 %) als zweithäufigstes Ereignis im sporadischen kNZK nachweisen (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013; Beroukhim et al., 2009). Auch die Arbeitsgruppe von Mitchell (2018) zeigte in zwei unabhängigen Kohorten einen kombinierten 3p Verlust und 5q Hinzugewinn als häufigste strukturelle Abweichung. Der zugrundeliegende Mechanismus wurde auf das Phänomen der Chromothripsis zurückgeführt. Analysen zeigten eine wilde, ungeordnete Neuordnung aus einer Vielzahl von Bruchstücken beider Chromosomenregionen. Dadurch ließen sich die Kriterien der Chromothripsis, nach ihrem Erstbeschreiber, als eine zelluläre Katastrophe erfüllen (Korbel and Campbell, 2013; Stephens et al., 2011). Eine weitere wichtige Erkenntnis ist die Tatsache, dass sich somatische Mutationen in Nierenzellen in einer konstanten Rate über das gesamte Leben ereignen (Mitchell et al., 2018; Alexandrov et al., 2013). Der Großteil dieser Mutationen geschieht über zwei Prozesse, welche Signatur 1 und 5 genannten werden und denen eine lineare Korrelationen mit dem Alter nachgewiesen werden konnte (Alexandrov et al., 2015). Durch das zuvor beschriebene Ereignis des 5q Hinzugewinns können Mutationen, die sich nur auf einer Kopie des 5q Arms befinden, von denen vor der t(3;5) unterschieden werden. Vergleicht man nun den jeweiligen Anteil der Mutationen vor und nach der Translokation, kann mit Hilfe der Mutationsraten das Phänomen der Chromothripsis zeitlich datiert werden. Nach den statistischen Schätzungen von Mitchell und Kollegen (2018) muss dieses entscheidende Ereignis in der Tumorgenese bereits in der Kindheit der Patienten stattgefunden haben und somit 30–50 Jahre vor der eigentlichen Krebsdiagnose. Ebenso konnte ermittelt werden, zu welchem Zeitpunkt der Most Recent Common Ancestor (MRCA), also die Stammzelle, von der alle bestehenden Tumorzellen abstammen, entstand. In den meisten Fällen ist dies viele Jahre nach dem initialen 3p Verlust. Erst eine oder mehrere darauffolgende Driver-Mutationen triggern vermutlich den entscheidenden Mechanismus, der zur klonalen Expansion des MRCA führt. Laut diesen Berechnungen scheint es nur einige Hundert Zellen mit dem beschriebenen 3p Verlust zu benötigen, um für eine weitere Mutation empfänglich zu sein und so zur Entstehung eines kNZK zu führen. (Mitchell et al., 2018)

#### 2.5.4 Driver-Mutationen

Krebs-Driver können als „Zell-autonome oder auch nicht-autonome Veränderung angesehen werden, welche die Tumorevolution zu jeder Stufe – was sowohl Entstehung, Progression, Metastasierung als auch Entwicklung von Therapieresistenzen beinhaltet – durch eine Vielfalt an Funktionen wie Proliferation, Überleben oder (Immun-)Invasion vorantreiben“ (Alizadeh et al., 2015).

Auch für die Tumorgenese des kNZK konnten mehrere solche Driver-Gene identifiziert werden. Neben dem bereits erwähnten *VHL*-Gen befinden sich auf dem häufig deletierten kurzen Arm von Chromosom 3, zwischen 3p21 und 3p25, zusätzlich die Chromatin und Histon regulierenden Tumorsuppressorgene *PBRM1*, *SETD2* und *BAP1* (Abbildung 1). Eine vollständige Inaktivierung dieser Gene durch Mutationen im nicht deletierten zweiten Allel konnten mehrere Arbeitsgruppen mit einer Häufigkeit von ca. 40 % bei *PBRM1*, 10 – 20 % bei *BAP1* und 10 % bei *SETD2* nachweisen (Scelo et al., 2014; Sato et al., 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Mit Hilfe von Immunfärbungen fanden Bihr und Kollegen (2019) auf Ebene der Proteinexpression noch höhere Aktivitätsverluste der Genprodukten dieser drei Driver-Gene. Ein Ausfall dieser Gene konnte weiterhin mit einem erhöhten Tumorstadium und einer schlechteren Tumordifferenzierung assoziiert werden. Neben den bereits erwähnten wurden noch eine Vielzahl weiterer mutmaßlicher Driver-Mutationen entdeckt. Das Cancer Genome Atlas Research Network identifizierte in einer Analyse von mehr als 400 kNZK häufig mutierte Gene mit besonders hoher Signifikanz. Darunter fanden sich *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *KDM5C*, *PTEN*, *BAP1*, *MTOR* und *TP53*. Der Nachweis von Mutationen in diesen Driver-Genen kann für einen zusätzlichen Informationsgewinn genutzt werden. So teilten Turajlic und Kollegen (2018b) Tumoren mit Hilfe von sechs Variablen in sieben evolutionäre Gruppen ein und wiesen ihnen sowohl klinische als auch prognostische Eigenschaften zu. Unter den Variablen waren Mutationen in den Driver-Genen *VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2* sowie Mutationen des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs und somatische Copy Number Alterations.

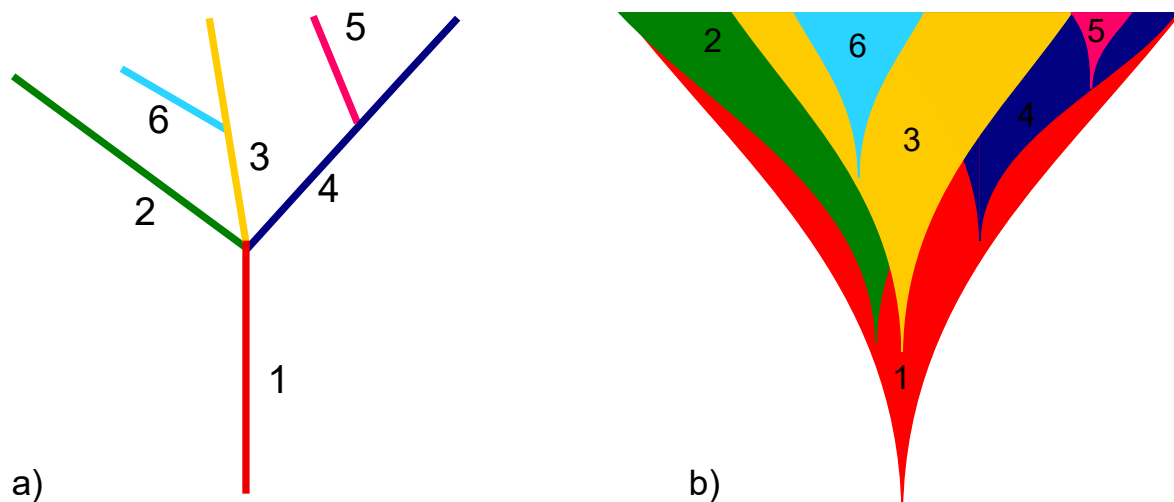
Abbildung 1: Ideogramm des Chromosoms 3 mit Lage der vier Driver-Gene (Zeichnung in Anlehnung an <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap/phegeni> (Ramos et al., 2014))



## 2.6 Tumorheterogenität

Intratumorale Heterogenität (ITH) kann definiert werden als das Auftreten genetisch unterschiedlicher Zellpopulationen in räumlich oder zeitlich getrennten Regionen des selben Primärtumors (Soultati et al., 2015). Dieses Phänomen wurde bereits an den unterschiedlichsten Tumorentitäten nachgewiesen. Dabei ergab sich eine große Varianz von bis zu 8000 Mutationen, die innerhalb eines Patiententumors heterogen verteilt sind (McGranahan and Swanton, 2017). Die ITH gilt dabei als einer der Hauptgründe für das Therapieversagen, die Ausbildung von Medikamentenresistenzen und dem damit verbundenen tödlichen Ausgang von Krebserkrankungen (Greaves, 2015). Darüber hinaus bietet die ITH jedoch auch Möglichkeiten, mehr über die Tumorentstehung und deren zeitlichen Ablauf zu erfahren. Gerlinger und Kollegen (2014a) zeigten in einer Analyse von 10 kNZK, in der bis zu 12 räumlich getrennte Tumorklone untersucht wurden, ein heterogenes Auftreten von 73 – 75 % der genetischen Driver-Ereignisse (Driver-Mutationen bzw. CNVs). Die evolutionäre Verwandtschaft der gefundenen Klone und Subklone eines Tumors kann mit Hilfe von phylogenetischen Bäumen dargestellt werden. Dabei muss das herkömmliche Modell einer linearen Tumorevolution im Falle des kNZK verworfen werden. Die Theorie der linearen Tumorevolution beschreibt, wie sich ein neuer Tumorklon durch eine Driver-Mutation einen evolutionären Vorteil verschafft und so seine Vorgänger ersetzt. Beim kNZK findet sich nach den Erkenntnissen aus Gerlingers Forschungen vielmehr eine verzweigte Tumorentwicklung: Verschiedene Klone entwickeln sich parallel und weisen eine gemeinsame Stammmutation (in *VHL*) und mehrere heterogene Driver-Mutationen auf (vgl. Abbildung 2). (Mitchell et al., 2018; McGranahan and Swanton, 2017; Gerlinger et al., 2014a) Einzelne Tumorklone eines kNZK können sich dabei stärker von ihren Subklonen unterscheiden, als von Tumoren eines anderen Patienten. Diese Heterogenität kann die Identifizierung von molekularen Subtypen und die Etablierung von Biomarkern erschweren. (Martinez et al., 2013)

Abbildung 2: Phylogenetischer Baum a) und schematische Darstellung der Tumorphilosophie b) bei paralleler Tumorevolution mit Stamm (1) und Subklonen (2-6) nach (Barber et al., 2015; Gerlinger et al., 2014a)



## 2.7 Kontingenz und Konvergenz in der Tumorevolution

Die evolutionären Theorien der Kontingenz und Konvergenz, nach ihren Hauptvertretern Stephen Gould bzw. Simon Morris, werden in der Wissenschaft kontrovers diskutiert und lassen sich auf die Evolution des Tumorgenoms übertragen (Morris, 2003; Gould, 1989). Auch in Bezug auf die ITH des kNZK führen beide Theorien zu interessanten Überlegungsansätzen (McGranahan and Swanton, 2017). Patienten mit VHL-Syndrom bieten eine für genetische Untersuchungen besondere Situation, da sie synchron mehrere kNZK entwickeln, die klonal unabhängig voneinander sind. Dabei kann jeder Tumor als eigenständig entstandene Neoplasie angesehen werden. Dadurch lassen sich evolutionäre Vorgänge in besonderer Art und Weise nachvollziehen, da alle Tumoren derselben Gewebe- Mikroumwelt ausgesetzt sind und den gleichen genetischen Ursprung besitzen. Fisher et al. (2014) machten sich diesen Sachverhalt zu Nutze und untersuchten vier parallel entstandene Tumoren eines VHL-Patienten. Abgesehen von der krankheitsbestimmenden 3p Keimbahnmutation war keine Mutation ubiquitär in allen kNZK vorhanden. Dies folgt der Theorie der kontingenten Evolution, welche auf zufälligen Ereignissen, der „Historical Contingency“, beruht und sich nicht vorhersagen lässt (Gould, 1989). Weiterhin wurde der Verlust des zweiten 3p Arms, der in jedem der vier Tumore einem unterschiedlichen Mechanismus folgte, als zufälliges Ereignis interpretiert. Zugleich fanden sich in der Arbeit Hinweise auf eine konvergente Evolution. So wurde in allen Tumoren eine erhöhte Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR Signalweges festgestellt, der zugrunde liegende Mechanismus war jedoch nicht immer identisch. Diese „wiederkehrende Tendenz der biologischen Organisation, zur selben Lösung zu gelangen“ folgt der Beschreibung der evolutionären Konvergenz nach Morris. (Fisher et al., 2014) Übertragen auf die Tumorgenese trägt die Konvergenz in Form der parallelen Entwicklung (vgl. Abbildung 2) verschiedener Tumorklone aus einer Ursprungszelle zur ITH bei (McGranahan and Swanton, 2017). Als konkretes Beispiel hierfür wurden im kNZK eines Patienten unterschiedliche Mutationen im Driver-Gen *SETD2* festgestellt, die jedoch alle phänotypisch konvergent zum Ausfall der SETD2 Proteinfunktion führten (Gerlinger et al., 2012).

## 2.8 Prognose

### 2.8.1 Klinische Prognosefaktoren

Die Einschätzung der individuellen Prognose eines Patienten mit NZK gilt als sehr schwierig. Im klinischen Alltag sind die TNM-Klassifikation und das Tumor-Grading weiterhin die wichtigsten Methoden zur Erfassung der Prognose (S3 Leitlinien AWMF, DKG, DKH, 2017). In einer Konsensuskonferenz der ISUP wurden Tumor-Stadium, Grading, Nekrosen, Morphotyp und sarkomatoide/rhabdoide Differenzierung als klinisch relevante prognostische Faktoren anerkannt (Delahunt et al., 2013). Tabelle 5 zeigt die Zunahme der Hazard Ratio (HR) des krebsspezifischen Überlebens bei steigendem TNM-Stadium und höherem Tumor-Grading aus einer Studie mit mehr als

17.000 Patienten (Keegan et al., 2012). Unter allen untersuchten klinischen Variablen (Patientenalter, Geschlecht, Rasse, TNM-Stadium, Grading und Histologie) war das TNM-Stadium, wie auch in vielen anderen Studien, der beste Prognosemarker. Das Grading ist hierbei, wie in Tabelle 5 zu sehen, erst ab Grad 3 aussagekräftig. Den größten Einfluss auf das Überleben hat der Metastasierungsstatus.

*Tabelle 5: Hazard Ratio (95% KI) des krebsspezifischen Überlebens anhand von TNM-Stadium und Tumor-Grading (Keegan et al., 2012)*

<b>Tumorstadium</b>	<b>HR (95% KI)</b>
T1N0M0	Referenzwert
T2N0M0	2,71 (2,17–3,39)
T3N0M0	5,20 (4,36–6,21)
T4N0M0	16,88 (12,40–22,98)
N+M0	16,33 (12,89–20,73)
M+	33,23 (28,18–39,18)
Grade 1	Referenzwert
Grade 2	1,16 (0,94–1,42)
Grade 3	1,97 (1,60–2,43)
Grade 4	2,82 (2,08–3,31)

Zur Aussagekraft des histologischen Subtyps ist die Studienlage sehr unterschiedlich. So zeigte die Unterscheidung zwischen kNZK, pNZK und chNZK in einigen Arbeiten keine Auswirkung auf die Prognose (Capitanio et al., 2009; Patard et al., 2005). Ebenso finden sich Studien, in denen, auch nach Abgleich mit Tumorstadium und Grading, das kNZK mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (Leibovich et al., 2010; Teloken et al., 2009; Cheville et al., 2003). Eine multizentrische Analyse mit fast 5000 Patienten verglich pNZK mit kNZK und kam zu einer interessanten Beobachtung: pNZK waren im organbegrenzten Stadium mit einer positiven und im metastasierten Stadium mit einer negativen Prognose verbunden (Steffens et al., 2012). Die Autoren vermuteten, dass sich unter den metastasierten NZK hauptsächlich die aggressiveren papillären Typ 2 Tumoren befanden (vgl. Tabelle 1).

### 2.8.2 Multivariable Prognosemodelle

Weiterhin wurden für das NZK multivariable Prognosemodelle entwickelt, die auf mehreren klinischen und paraklinischen Faktoren basieren. Sie können in prä- und postoperative Scores eingeteilt werden und sollen in ihrer Aussagekraft präziser sein als einzelne Faktoren (Karakiewicz und Hutterer, 2007). Das International Metastatic RCC Database Consortium (IMDC) entwickelte das erste Prognosemodell seit Verwendung der Targeted Therapy und verglich dieses in einer groß angelegten Studie mit vier weiteren gängigen Prognosemodellen (Heng et al., 2013). Tabelle 6 fasst die Variablen, aus denen die Scores ermittelt werden, zusammen. Interessanterweise zeigten alle Modelle einen sehr ähnlichen Concordance Index, welcher deren Aussagegenauigkeit auf das Gesamtüberleben (Overall Survival OS) angibt.

Tabelle 6: Vergleich fünf verschiedener postoperativer Prognosemodelle nach verwendeten Kriterien und Concordance Index (Heng et al., 2013)

	Database Consortium Model	CCF Model	French Model	IKCWG Model	MSKCC/Motzer Score
<b>Risikofaktor</b>					
Karnofsky-Index/ECOG Performance Status	✓	✓	✓	✓	✓
Zeit von Diagnose bis zur Behandlung	✓	✓	-	✓	✓
Zeit von Diagnose bis Metastasierung	-	-	✓	-	-
Anzahl der Metastasenlokalisationen	-	-	✓	✓	-
Lebermetastasen	-	-	✓	-	-
Vorangegangene Immuntherapie	-	-	-	✓	-
Hämoglobinkonzentration	✓	-	-	✓	✓
Kalziumkonzentration	✓	✓	-	✓	✓
Neutrophilenzahl	✓	✓	-	-	-
Thrombozytenzahl	✓	✓	-	-	-
LDH Konzentration	-	-	-	✓	✓
Leukozytenzahl	-	-	-	✓	-
Alkalische Phosphatase Konzentration	-	-	-	✓	-
<b>Concordance Index</b>	0,664	0,662	0,640	0,668	0,657

ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group; CCF = Cleveland Clinic Foundation; IKCWG = International Kidney Cancer Working Group; MSKCC = Memorial Sloan Kettering Cancer Center

### 2.8.3 Molekulare Prognosemarker

In der Literatur findet sich eine Vielzahl prognostischer Marker für das kNZK. Jedoch haben bis zum heutigen Datum im Speziellen keine molekularen Marker Einzug in die Leitlinien gefunden. Dies ist unter anderem mit deren fehlender Validierung durch unabhängige und prospektive Studien zu begründen (Delahunt et al., 2017; S3 Leitlinien AWMF, DKG, DKH, 2017). Neben der Entwicklung prognostischer Biomarker ist auch die Etablierung prädiktiver Biomarker Ziel verschiedener Untersuchungen. Diese sollen ein Therapieansprechen voraussagen, um so einen weiteren Schritt in Richtung der individualisierten Therapie zu gehen (Graham et al., 2018). Im Folgenden soll speziell auf das Prognosemodell eingegangen werden, welches der hier vorgestellten Arbeit zugrunde liegt.

Mit Hilfe der hochauflösenden array-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH) konnten Sanjmyatav et al. (2011) im kNZK mehrere prognostisch relevante CNVs identifizieren, die mit der Metastasierung und dem krankheitsspezifischen Überleben korrelieren. Dabei handelt es sich um Zugewinne in den Chromosomenregionen 1q21.3; 7q36.3; 20q11.21q13.32 und Verluste in 9p21.3p24.1. Der Nachweis dieser CNVs gelang auch mittels speziell entwickelter FISH-Protokolle unter Verwendung kommerziell erhältlicher Fluoreszenzsonden. In einer weiterführenden Studie an einem größeren Patientenkollektiv wurden 100 Patienten auf CNVs in den genannten Chromosomenregionen untersucht. Die Summe der CNVs wurde in der neu eingeführten Variable Total Number of Specific Aberrations (TNSA) zusammengefasst (Sanjmyatav et al., 2014). Die TNSA korrelierte dabei, im Vergleich zu herkömmlichen klinischen Parametern, am besten mit dem Metastasierungsstatus der Patienten.



Durch die zusätzliche Kombination der TNSA als genetischer Score mit dem T-Stadium als klinischer Faktor wurde weiterführend ein Prognosemodell entwickelt. Dieses konnte bereits in zwei unabhängigen Kohorten von je 100 Patienten an unterschiedlichen Tumorgeweben validiert werden. Mit dem Prognosemodell lassen sich Patienten in eine Niedrig- und eine Hochrisikogruppe einteilen. Die beiden Gruppen zeigen signifikante Unterschiede im rezidivfreien Überleben (Recurrence Free Survival RFS), im Gesamtüberleben (Overall Survival OS) und im krebspezifischen Überleben (Cancer Specific Survival CSS). Das Risikomodelle konnte zudem in der Subgruppe der organbegrenzten Tumore eine Metastasierung mit einer Genauigkeit von 83 % vorhersagen. (Grimm et al., 2019)

Als weiterer molekularer Prognosemarker des kNZK ist ein Modell von Heinzlmann und Kollegen (2019) zu nennen, welches auf der Expression von 4 miRNAs basiert. Auch dieses Prognosemodell erreichte eine überlegene Vorhersage von Metastasierungs- und Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu herkömmlichen klinischen und pathologischen Prognosemodellen. Rini et al. (2015) entwickelten für das kNZK einen sogenannten Recurrence Score, welcher anhand des unterschiedlichen Expressionsmusters von 16 Genen eine prognostische Aussage erlaubt. Das Klassifikationssystem „ClearCode34“ basiert auf 34 Genen und versucht durch Unterteilung des kNZK in eine A und B Subgruppe, prognostische Aussagen über das Metastasierungsrisiko nach Nephrektomie bei lokal begrenzten Tumoren zu gewinnen (Brooks et al., 2014; Brannon et al., 2010).

## 2.9 Therapie

### 2.9.1 Behandlung des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms

Als Grundlage der hier aufgeführten Therapien dienen sowohl die evidenzbasierten Empfehlungen der deutschen S3-Leitlinien als auch die der EAU. Verfahren zur Überwachung oder lokalablativen Therapien des NZK sind diskutierbare Optionen innerhalb bestimmter Patientengruppen, beispielsweise bei Patienten mit sehr niedriger Lebenserwartung. Die einzige kurative Therapie des lokal begrenzten NZK ist jedoch die chirurgische Tumornephrektomie (Ljungberg et al., 2015). In der Wahl zwischen offener oder laparoskopischer Nephrektomie brachte keine Operationsmethode einen eindeutigen Vorteil hinsichtlich des Überlebens (Tait et al., 2011). Jedoch war insbesondere der postoperative stationäre Aufenthalt nach minimalinvasiven Methoden deutlich kürzer (Hemal et al., 2007). Ebenso deuten Studien darauf hin, dass ein laparoskopisches Vorgehen mit einer niedrigeren Komplikationsrate und einem geringeren Blutverlust verbunden ist (Gratzke et al., 2009; Peng et al., 2006).

In dem bisher größten Vergleich von laparoskopischen und roboterassistierten radikalen Nephrektomien zeigte sich vor allem eine Tendenz dazu, roboterassistierte Methoden auch bei komplizierteren Eingriffen anzuwenden (Anele et al., 2019). Da die Datenlage nicht eindeutig ist, liegt die Entscheidung über die Operationstechnik hauptsächlich an der technischen Ausstattung und Expertise des Operateurs (Ljungberg et al., 2015). Eine nierenerhaltende Teilnephrektomie sollte, wenn möglich, in den Stadien

T1 und T2 einer radikalen Nephrektomie vorgezogen werden. Die Überlebensvorteile scheinen bei beiden Methoden ähnlich zu sein. Jedoch konnten eine geringere Komplikationsrate, eine bessere Nierenfunktion und eine erhöhte Lebensqualität bei teilresezierten Patienten festgestellt werden (MacLennan et al., 2012a, 2012b; Van Poppel et al., 2011). Die Leitlinien sehen zudem aufgrund der derzeitigen Datenlage keine Notwendigkeit einer begleitenden Lymphadenektomie oder Adrenalektomie, sofern keine nachweisbare Tumorinfiltration vorliegt (Bekema et al., 2013; Blom et al., 2009). (S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom, 2020; EAU Guidelines, 2017)

### 2.9.2 Systemische Therapie des fortgeschrittenen klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Insbesondere das kNZK zeigt ein sehr geringes Ansprechen auf klassische Chemotherapeutika (Buti et al., 2013; Motzer et al., 2000). Ebenso gehören Therapieschemata mit alleiniger Verwendung von Zytokinen, wie Interleukin 2 (IL2) und Interferon  $\alpha$  (IF $\alpha$ ) oder deren Kombination mit Zytostatika der Vergangenheit an. Seit der ersten Zulassung im Jahr 2006 wurden bisher 14 Medikamente aus der Gruppe der Targeted Therapy in die deutschen Leitlinien zur Behandlung des fortgeschrittenen kNZK aufgenommen und revolutionierten diese (Bamias et al., 2017). Dabei handelt es sich um Substanzen aus den drei Gruppen: VEGF/R-Inhibitoren, mTOR-Signalweg-Inhibitoren und Checkpointinhibitoren (PD1/PD-L1- bzw. CTLA4-Inhibitoren). (S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom, 2020)

Die Wahl der Erstlinientherapie wird vornehmlich vom Risikoprofil des Patienten bestimmt. Der Grund hierfür ist der Aufbau der Zulassungsstudien, nach denen sich die Therapieempfehlungen richten. Das Risikoprofil errechnet sich in den deutschen Leitlinien aus den Kriterien des bereits in 2.8.2 vorgestellten IMDC-Scores (vgl. Tabelle 6). Einen Überblick der vorhandenen Therapieoptionen bietet Tabelle 7. Angemerkt sei, dass die Therapieempfehlungen einem stetigen Wandel unterzogen sind und sich zusätzlich zu den genannten Medikamenten eine Vielzahl weiterer Medikamente in der klinischen Erprobung befinden. Neoadjuvante oder adjuvante Therapieschemata können wegen der unklaren Datenlage derzeit nicht empfohlen werden und finden sich nur in Studien. Zwei bereits veröffentlichte randomisierte Phase-III-Studien untersuchten die Wirksamkeit mit den Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) Sunitinib bzw. Sorafenib bei lokal begrenztem NZK nach Tumornephrektomie (Haas et al., 2016; Ravaud et al., 2016). Ravaud und Kollegen (2016) zeigten ein signifikant höheres progressionsfreies Überleben (Progression Free Survival PFS) im Vergleich zum Placeboarm der Untersuchung. Im Gegensatz dazu sah das Forscherteamteam von Haas (2016) keinen Überlebensvorteil in der adjuvanten Therapie. (S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom, 2020)

Tabelle 7: Systemische zielgerichtete Therapieoptionen des fortgeschrittenen kNZK (S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom, 2020)

		Standard	Option
	IMDC Risikoprofil		
Erstlinientherapie nach Risikoprofil	Gut (0 Risikofaktoren)	Pembrolizumab + Axitinib *Avelumab + Axitinib	Bevazumab + IFN Pazopanib Sunitinib Tivozanib
	Intermediär (1–2 Risikofaktoren)	Pembrolizumab + Axitinib Ipilimumab + Nivolumab *Avelumab + Axitinib	Cabozantinib (B)** Sunitinib (B)** Pazopanib (B)** Tivozanib (B)** Bevazumab + IFN (0)**
	Ungünstig (≥ 3 Risikofaktoren)	Pembrolizumab + Axitinib Ipilimumab + Nivolumab *Avelumab + Axitinib	Cabozantinib (B)** Sunitinib (B)** Temsirolimus(0)** Pazopanib (0)**
	Vortherapie		
Zweitlinientherapie nach Vortherapie	VEGF/R-Inhibitor	Cabozantinib Nivolumab	Lenvatinib + Everolimus Alternativ anderer TKI
	CPI	-	TKI-basierte Therapie
	Kombination CPI/TKI	-	TKI-basierte Therapie
	Temsirolimus	-	TKI Nivolumab
* Zu dieser Kombination liegen noch keine hinreichenden Überlebensdaten vor			
** Empfehlungsgrade: (B)=Sollte, (0)=Kann			
CPI Checkpoint Inhibitor			
TKI Tyrosinkinase-Inhibitor			

### 2.9.3 Lokale Therapie des fortgeschrittenen klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Bei etwa 20–30 % aller Patienten findet sich bereits bei Diagnose eine synchrone Metastasierung (Dabestani et al., 2016). Derzeit wird empfohlen, diesen Patienten eine Tumornephrektomie des Primarius anzubieten. Jedoch basieren die Grundlagen dieses Vorgehens auf Arbeiten wie der von Flanigan et al. aus dem Jahr 2004, vor der Etablierung der Targeted Therapy. In einer kürzlich veröffentlichten prospektiven Studie war eine alleinige Sunitinib Therapie der Kombination aus Sunitinib und Nephrektomie nicht unterlegen (Méjean et al., 2018). Ungeachtet der Kritik am Design der Untersuchung könnten sich diese Ergebnisse auf das therapeutische Vorgehen bei Patienten mit schlechter Prognose und fortgeschrittenem Tumorstadium auswirken (Motzer and Russo, 2018). Im Krankheitsverlauf entwickeln zusätzlich 20–30 % der Patienten metachrone Metastasen, wobei Lunge, Lymphknoten und Knochen die häufigsten Absiedlungsorte darstellen (Bianchi et al., 2012; Dabestani et al., 2016). Insbesondere solitäre Metastasen sollten in kurativer Absicht chirurgisch entfernt werden (Alt et al., 2011; Kavolius et al., 1998). Zur Krankheitskontrolle können bei disseminiertem Befall oder bei nicht resektablen Metastasen zusätzlich unterschiedliche Methoden der Radiotherapie zum Einsatz kommen. (S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom, 2020)

## 2.10 Ziel dieser Arbeit

Die prognostische Wertigkeit von Copy Number Variations (CNVs) in den chromosomalen Regionen (+) 1q21.3, (+) 7q36.3, (-) 9p21.3–p24.1 und (+) 20q11.21–q13.32 des kNZK konnte bereits erfolgreich gezeigt werden (Grimm et al., 2019; Sanjmyatav et al., 2011, 2014). Die Detektion der genannten Aberrationen erfolgt dabei mittels FISH. Ein wesentlicher Aspekt, der bei molekulargenetischen Untersuchungen von Tumoren eine Rolle spielt, ist die intratumorale Heterogenität (ITH). Diese wurde in mehreren Arbeiten auch beim kNZK nachgewiesen. (Gerlinger et al., 2014a; McGranahan and Swanton, 2017) Die Heterogenität wird von vielen Autoren als wesentliches Problem bei der Entwicklung von genetischen Prognosemarkern angeführt. Aufgrund der räumlichen ITH ist nicht bekannt, ob zur Detektion der genannten CNVs Einzelproben beim kNZK ausreichend sind. Daher ist es Ziel dieser Arbeit, einen möglichen Effekt der ITH auf die prognostische Aussagekraft der genannten CNVs mittels FISH zu evaluieren.

Dazu sind folgende Fragen zu klären:

1. Besteht bei Untersuchung räumlich getrennter Tumorareale eine ITH, die sich auf die Identifizierung der genannten CNVs mittels FISH auswirkt? Wie lässt sich diese Heterogenität definieren und wie ist diese auf die unterschiedlichen Sonden verteilt?
2. Beeinflusst die ITH das entwickelte Prognosemodell und führt sie zu einer unterschiedlichen Risikobewertung eines Tumors?
3. Wie viele Areale eines Tumors müssen untersucht werden, um eine valide Aussage unter Berücksichtigung der ITH bezgl. des Metastasierungsrisikos treffen zu können?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Heterogenität und klinischen/histopathologischen Faktoren?
5. Lassen sich die bisherigen Ergebnisse der prognostischen Wertigkeit der vier untersuchten chromosomalen Regionen auch in diesem Patientenkollektiv reproduzieren?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Patientenkollektiv

Zu Erstellung dieser Arbeit wurde Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE) Tumorgewebe von 20 Patienten mit kNZK verwendet. Die Probengewinnung erfolgte im Zeitraum von 2005 bis 2011 an der Klinik für Urologie der Universität des Saarlandes im Rahmen der Tumorthherapie durch partielle oder radikale Tumornephrektomien. Das Kollektiv wurde so ausgewählt, dass es zu 50 % (10) aus nicht metastasierten und zu 50 % (10) aus metastasieren Patienten bestand. Unter den metastasierten Patienten waren drei bereits zum Operationszeitpunkt metastasiert, die restlichen entwickelten im Zeitraum von 3 bis 73 Monaten Fernmetastasen.

Das Kollektiv bestand insgesamt zu 70 % (14) aus männlichen und 30 % (6) aus weiblichen Patienten. Zum Zeitpunkt der OP waren die Patienten zwischen 42 und 82 Jahren alt. Das Durchschnittsalter betrug 65 Jahre (Median: 68,5). Die Nachbeobachtungszeit erstreckte sich zwischen 4 und 133 Monaten (Mittelwert: 75,1 Monate; Median: 79,5 Monate). Bei nicht metastasierten Patienten betrug die Nachbeobachtungszeit mindestens 3 Jahre. Die histopathologische Einordnung des Gewebes wurde aus den Pathologieberichten entnommen, welche vom Institut für Pathologie der Universität des Saarlandes erstellt wurden. Das Grading setzt sich zusammen aus 85 % (17) G2, 10 % (2) G3 und 5 % (1) G4 Tumoren. Die Verteilung der T-Kategorien kann in Tabelle 8 nachgelesen werden. Sie erfolgte zu der damals gültigen TNM-Klassifikation von 2002.

*Tabelle 8: Klinische Daten des Patientenkollektivs*

	Prozent	Absolut
<b>Metastasierung</b>		
M0	50	10
M1	50	10
<b>Geschlecht</b>		
Männlich	70	14
Weiblich	30	6
<b>T-Kategorie</b>		
1a	15	3
1b	25	5
2	5	1
3a	20	4
3b	30	6
3c	0	0
4	5	1
<b>Grading</b>		
G1	0	0
G2	85	17
G3	10	2
G4	5	1
	<b>Mittelwert</b>	<b>Median</b>
Alter (Jahre)	66,1	68,5
Tumorgröße (cm)	7,0	6,3
Überlebenszeit (Monate)	75,1	79,5

Tabelle 9: Patientenkollektiv

Patienten Nr.	Tumorgroße (cm)	Lymphknotenstatus	Metastasierung	Metastasenzeit (Monate)	Grading	Überlebenszeit (Monate)	tumorbedingter Tod	Geschlecht	Alter (Jahre)
10016/06	3,8	N0	M0	-	G2	133	nein	weiblich	46
14779/10	4,6	N0	M0	-	G2	69	nein	weiblich	76
21039/05	5,5	N0	M0	-	G2	126	nein	weiblich	51
21723/05	4,9	Nx	M0	-	G2	113	nein	männlich	65
2224/06	2,8	N0	M0	-	G3	118	nein	männlich	77
22367/08	3,5	Nx	M0	-	G2	104	nein	männlich	71
22816/05	6,2	N2	M0	-	G3	125	nein	männlich	76
5550/10	6,3	Nx	M0	-	G2	73	nein	männlich	49
7328/11	5,8	N0	M0	-	G2	58	nein	männlich	53
9666/06	6	N0	M0	-	G2	61	nein	weiblich	79
15083/08	9	Nx	M1	54	G2	105	nein	männlich	59
15587/06	8,9	N0	M1	23	G2	91	nein	männlich	70
219/09	4,2	Nx	M1	22	G2	86	nein	männlich	75
21915/06	10	N0	M1	73	G2	114	nein	männlich	42
22273/11	8,8	N0	M1	3	G2	45	ja	männlich	75
23665/08	6,5	N2	M1	0	G2	11	ja	weiblich	82
3319/10	13,5	Nx	M1	5	G2	21	ja	männlich	62
5967/10	12,5	Nx	M1	0	G2	33	ja	männlich	71
6901/08	8,5	N2	M1	5	G2	12	ja	männlich	67
9278/08	8,5	N0	M1	0	G4	4	ja	weiblich	55

### 3.2 Verwendete Materialien

Zur Durchführung der FISH wurde das ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (ZytoVision GmbH, Bremerhaven) mit dem dazugehörigen Protokoll verwendet. Eine genaue Auflistung der verwendeten Sonden, die sowohl von Kreatech (Kreatech Biotechnology B.V. Amsterdam, Niederlande) als auch von ZytoVision stammten, findet sich in Tabelle 10. Alle weiteren Reagenzien und Materialien, die zur experimentellen Durchführung der FISH benötigt wurden, sind in Tabelle 11 aufgeführt. Da Produkte verschiedener Hersteller zum Einsatz kamen, musste an einigen Stellen ein eigens für diese Sonden entwickeltes Protokoll angewendet werden. An gegebener Stelle wird im Text explizit darauf hingewiesen.

Tabelle 10: Für die FISH verwendete Sonden, Sondenpuffer und DAPI

Handelsname	Zielregion	Farbe und Wellenlänge
ZytoLight® SPEC MCL1/1p12 Dual Color Probe	1q21.3/1p12	ZyGreen (Abs: 503 nm; Emi: 528 nm) / ZyOrange (Abs: 547 nm, Emi: 572 nm)
ZytoLight® SPEC CDKN2A/CEN 9 Dual Color Probe	9p21.3/Zentromer Chromosom 9 (D9Z3)	ZyGreen (Abs: 503 nm; Emi: 528 nm) / ZyOrange: (Abs: 547 nm, Emi: 572 nm)
DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) DuraTect™-Solution	DNA	Blau: (Abs: 358 nm, Emi: 461 nm)
Kreatech™ 20q- (20q12) / 20q11 FISH probe	20q12/20q11.2	Rot: PlatinumBright™550 (Abs: 546nm; Emi:580nm) / Grün: PlatinumBright™495 (Abs: 495nm; Emi: 525nm)

Kreatech™ Sub Telomere 7qter Red	7q36 (Subtelomer 7q)	Rot: PlatinumBright™550 (Abs: 546nm; Emi: 580nm)
Kreatech™ SE (Satellite Enumeration) 2 FISH probe	Zentromer Chromosom 2	Blau: PlatinumBright™415 (Abs: 429nm; Emi: 479nm)
Kreatech™ FISH Hybridization Buffer (Kre-HYB-40)	-	-
Kreatech™ (LK-095A) DAPI Counterstain (0.1 g/mL)	DNA	Blau: (Abs: 358 nm; Emi: 461 nm)
Abs = Absorption; Emi = Emission;		

Tabelle 11: Sonstige für die FISH verwendete Materialien

<b>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</b>
PT1 Heat Pretreatment Solution Citric
ES1 Pepsin Solution
Wash Buffer SSC (WB1)
25x Wash Buffer A (WB2)
Reagenzien und Materialien
Waschpuffer I: 0,4 x SSC (saline-sodium citrate) / 0,3 % IGEPAL (Octylphenoxypolyethoxyethanol)
Waschpuffer II: 2 x SSC / 0,1 % IGEPAL
Ethanolreihen (70 %, 90 % und 100 %)
Wärmeplatte
Xylol
Wasserbad
Hybridisierungsöfen/Wärmeschrank
Waschküvetten 50-80 ml
Feuchtkammer
Pipetten
Rubber Cement (Marabu Fixogum)
Destilliertes Wasser (Aquadest)
Deckgläser (Ø 13 mm; 24 mm x 32 mm)

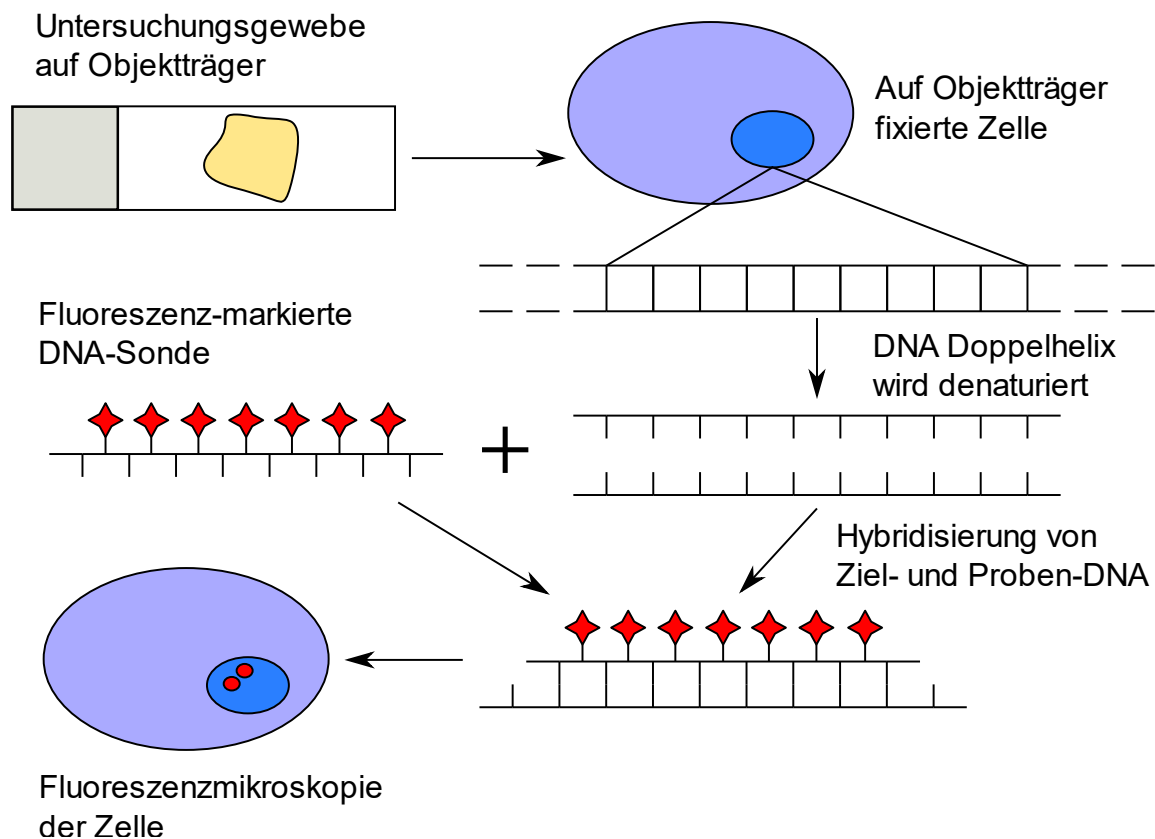
### 3.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die in-situ-Hybridisierung ist eine molekulargenetische Methode zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen von DNA und RNA auf Einzelzellniveau. Sie beruht auf der Eigenschaft der DNA-Doppelhelix, sich unter bestimmten Voraussetzungen sowohl aufzutrennen als auch wieder zu renaturieren. Diese Eigenschaft wird genutzt, um eine speziell markierte Probensonde an die zu untersuchende Zielsequenz zu hybridisieren und die Zielsequenz dadurch für den Betrachter sichtbar zu machen. Während die Erstbeschreiber diese Methode noch Radioisotope zur Markierung und Detektion der Zielsequenz einsetzten (Gall and Pardue, 1969), wurde die Technik im Laufe der Zeit immer weiterentwickelt. Heute werden meist direkt markierte Fluoreszenzsonden genutzt, was zum Verfahren der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung führte.

Die Länge der verwendeten Sonden variiert je nach zu untersuchender Zielsequenz von 30 – 40 kb bis hin zu mehreren hundert kb. Dadurch können spezifisch einzelne Chromosomenabschnitte, Genloci oder ganze Zentromerregionen detektiert werden. Die zu untersuchenden Zellen müssen dabei nicht in der Metaphase vorliegen oder zur Zellteilung angeregt werden. Die FISH ist auch an Interphasekernen

möglich, wodurch sie an einer Vielzahl von konservierten Geweben angewandt werden kann. Die DNA, die natürlicherweise im Zellkern als Doppelstrang vorliegt, wird durch Hitze und Änderung des pH-Wertes denaturiert. Dadurch kann die hinzugefügte komplementäre Sonde, die ebenfalls im Einzelstrang vorliegt, durch Bildung von Wasserstoffbrücken an die Zielsequenz binden. In einem anschließenden Waschschrift wird der nicht gebundene Anteil der Sonde entfernt. Die entstandenen Hybride aus Ziel- und Sonden-DNA können unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Dazu wird mit Hilfe einer geeigneten Lichtquelle und Farbfiltern das an die Sonde gebundene Fluorochrom angeregt. Das als Fluoreszenz bezeichnete emittierte Licht ist das eigentliche SONDENSIGNAL. Durch die Verwendung mehrerer verschiedener Fluorochrome lassen sich gleichzeitig eine Vielzahl unterschiedlicher Zielsequenzen untersuchen. So können mit dem sogenannten Multicolor-FISH Verfahren beispielsweise alle humanen Chromosomen mit nur einem Hybridisierungsschritt detektiert werden (Schröck et al., 1996). Dadurch lassen sich numerische Amplifikationen und Deletionen, aber auch Translokationen und Rearrangements bestimmter chromosomaler Bereiche in einem Zellkern nachweisen. (Jehan and Al-Kuraya, 2012; Levsky and Singer, 2003; Savic and Bubendorf, 2007; Sugita and Hasegawa, 2017; Trask, 2002)

Abbildung 3: Verfahren der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit Darstellung der Hybridisierung von Ziel- und Sonden-DNA auf Zellebene

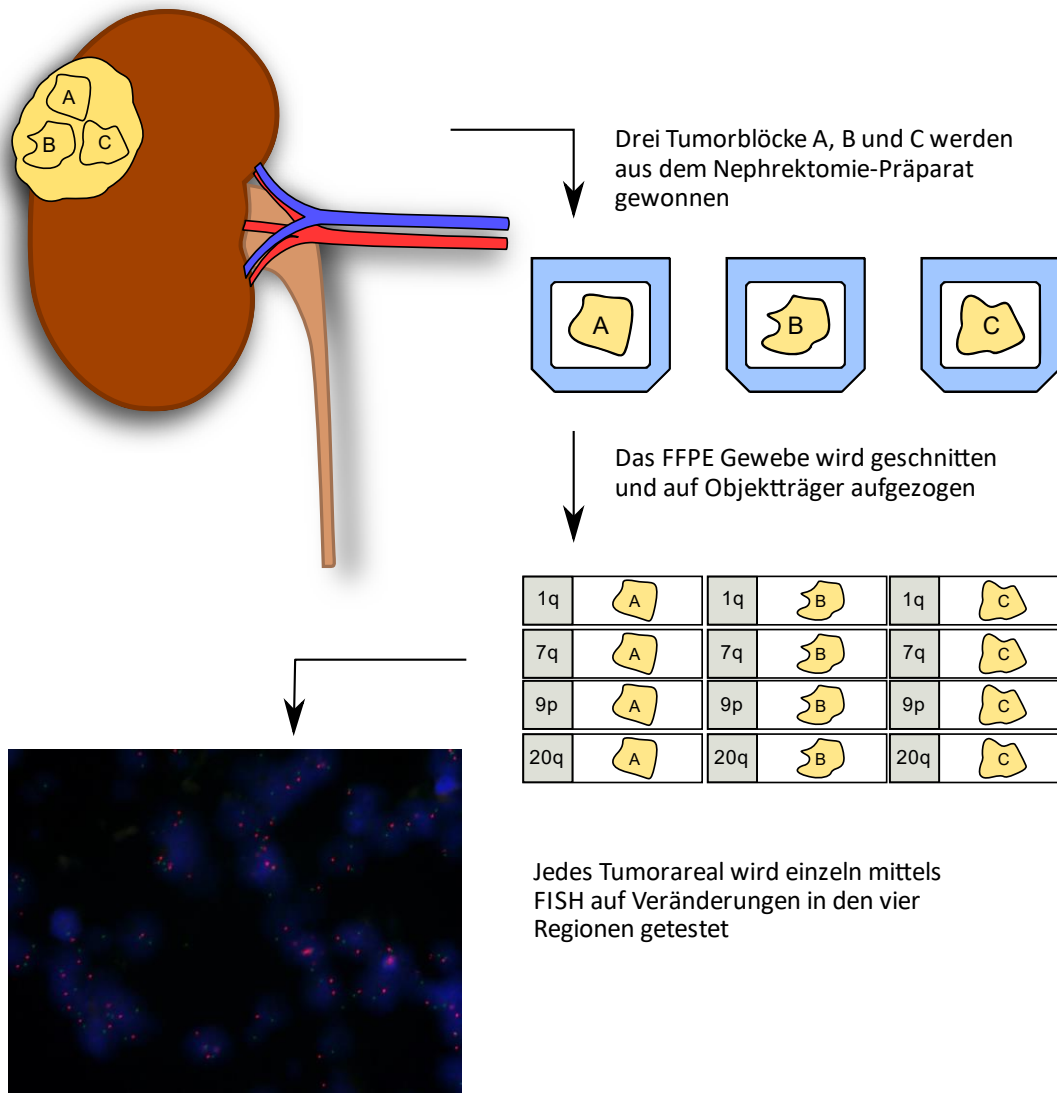




### 3.4 Übersicht des Versuchsablaufs

Der in Abbildung 4 dargestellte Versuchsablauf soll beispielhaft das experimentelle Vorgehen von der Gewinnung der Tumorblöcke bis zur fertigen FISH verdeutlichen. Nach diesem Schema wurden von jedem Patienten jeweils drei Tumorareale (A, B und C) auf CNVs der vier chromosomalen Regionen 1q21.3, 7q36.3, 9p21.3p24.1 und 20q11.21q13.32 untersucht. Wie in der Abbildung dargestellt, wurden dafür je zwölf Gewebeproben pro Patienten benötigt. Das letzte Bild zeigt ein Falschfarbenbild des fertigen FISH Präparats. Die Tumorgewinnung, die Herstellung der Paraffinblöcke und das anschließende Schneiden der Proben erfolgten durch Mitarbeiter des Instituts für Pathologie bzw. der Klinik für Urologie. Auch die Auswahl der Proben mittels HE-Färbungen wurde, um eine verblindete Auswertung zu gewährleisten, von Dritten im Labor durchgeführt.

Abbildung 4: Schematischer Versuchsablauf



### 3.5 Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

#### 3.5.1 Schneiden, Auswahl und Markierung des Tumorgewebes

Die FFPE Gewebeschnitte wurden mit Hilfe des Microtoms RM2125 RT (Leica Biosystems Nussloch GmbH) hergestellt. Sie hatten eine Dicke von 4 µm und wurden auf positiv geladene Adhäsions-Objektträger aufgezogen. Bereits im Vorfeld wurden Übersichtspräparate von jedem Tumorblock mittels HE-Färbung angefertigt. Durch mikroskopische Betrachtung konnten so diejenigen Areale, die für die spätere Auswertung relevant waren, identifiziert werden. Diese Areale wurden mit einem Diamantschneider auf die für die FISH benutzten Objektträger übertragen. Es wurden bevorzugt Tumorböcke ausgewählt, die ein ausreichend großes Areal mit eindeutig klarzelligem Tumorgewebe ohne Einblutungen oder Nekrosen zeigten.

#### 3.5.2 Vorbehandlung: Entparaffinieren und Proteolyse

Als erster Schritt wurden die Objektträger für 10 Minuten bei 70°C (bei späterer Verwendung der Kreatech Sonden für 2 Stunden bei 80°C) auf einer Heizplatte inkubiert. Um das Gewebe vom Paraffin zu trennen, wurde es für 2x 10 Minuten in Xylol entparaffiniert. Es folgte eine Rehydrierung in Ethanolreihen absteigender Konzentration (2x 100 %, 90 % und 70 %) für jeweils 5 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger für 2x 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

Im Heat Pretreatment Solution Citric, welches zuvor mit Hilfe eines Wasserbades auf 98°C vorgewärmt wurde, erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte für 15 Minuten.

Direkt danach wurden die Proben erneut für 2x 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

Zur Proteolyse des Gewebes wurde die ebenfalls im Implementation Kit enthaltene Pepsin Solution auf das zuvor markierte Gewebe zellbedeckend aufgetropft. In einer feuchten Kammer inkubierten die Proben bei 37°C für 10 Minuten.

Zum Abbruch der Proteolyse dienten der Wash Buffer SSC (WB1) und destilliertes Wasser. In diesen beiden Flüssigkeiten wurden die Gewebeschnitte für jeweils 1 Minute gewaschen.

In einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 % und 100 %) dehydrierten die Schnitte jeweils für 1 Minute und wurden anschließend an der Luft getrocknet.

#### 3.5.3 Sondaufbereitung, Denaturierung und Hybridisierung

Um die Fluoreszenz der Sonden zu erhalten, erfolgten alle folgenden Arbeitsschritte lichtgeschützt, in einem leicht abgedunkelten Raum.

Zur Homogenisierung der FISH Sonden wurden diese vor Gebrauch kurz mit einem Vortexmischer geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Die Firma Zytovision lieferte gebrauchsfertige Sondenmischungen, die ohne weitere Vorbehandlung direkt auf die Gewebeproben gegeben wurden. Die Sonden der Firma Kreatech mussten in der gewünschten Menge und im angegebenen Verhältnis (siehe

Tabelle 12) mit einer Mikropipette gemischt und für 10 Minuten bei 90°C in einem abgedunkelten Thermomixer erhitzt werden.

Je 3 µl der Sondenmischung wurden auf die zuvor mit dem Diamantschneider markierten Areale pipettiert, mit einem Deckglas (Ø 13 mm) luftblasenfrei abgedeckt und die Ränder mit Rubber Cement versiegelt. Auf einer Wärmeplatte erfolgte die Denaturierung der Gewebeschnitte für 10 Minuten bei 80°C. Anschließend hybridisierten die Objektträger abgedunkelt in einer feuchten Kammer bei 37°C für mindestens 48 Stunden.

Tabelle 12: Verhältnisse der Sondenmischungen zur Untersuchung der Zielregion 7q36.3 und 20q11.21q13.32

Zielregion	Sondenbezeichnung	Anteil
7q36.3	Sub Telomere 7pter	10 %
	SE2 FISH probe	40 %
	FISH Hybridization Buffer	50 %
20q11.21q13.32	20q- (20q12.3) / 20q11.2 FISH probe	20 %
	SE2 FISH probe	30 %
	FISH Hybridization Buffer	50 %

### 3.5.4 Post-Hybridisierungs-Waschschritte und Gegenfärbung

Das Waschen der Objektträger nach der Hybridisierung unterschied sich je nach verwendeter Sonde. Beide Vorgehensweisen dienten dazu, den nicht gebundenen Anteil der Sonde zu entfernen. Die unterschiedlichen Vorgehensweisen werden im Folgenden beschrieben.

#### 3.5.4.1 Waschschritte bei ZytoVision FISH Sonden

Zunächst wurde der Rubber Cement vorsichtig abgezogen und die Deckgläser durch Inkubation für 3 Minuten im aufgeheizten 1x Wash Buffer A (WB2) mit 37°C entfernt. Die nun wieder freiliegenden Objektträger wurden dann ebenfalls bei 37°C in 2 separaten Küvetten für jeweils 5 Minuten mit 1x Wash Buffer A (WB2) gewaschen, um überschüssiges Sondenmaterial zu entfernen. Zuletzt wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) jeweils 1 Minute lang dehydriert und dann an der Luft getrocknet.

#### 3.5.4.2 Waschschritte bei Kreatech FISH Sonden

Auch hier wurde zunächst der Rubber Cement vorsichtig abgezogen. Durch kurze Inkubation für 3 Minuten im Waschpuffer II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) bei Raumtemperatur konnten die Deckgläser abgelöst werden. Das eigentliche Waschen erfolgte für 2 Minuten im Waschpuffer I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) bei 72°C und für 1 Minute bei Raumtemperatur im Waschpuffer II (2 x SSC / 0,1 % Igepal). Danach wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 % und 100 %) für jeweils 1 Minute dehydriert und anschließend an der Luft getrocknet.

### 3.5.5 Gegenfärbung

Zuletzt wurden die Zellschnitte mit 15 µl DAPI und einem Deckglas (24 mm x 32 mm) luftblasenfrei eingedeckt. Objektträger mit FISH Sonden von Zytovision wurden mit dem herstellereigenen DAPI/DuraTect™ bearbeitet, im Gegenzug wurde für die Sonden von Kreotech das Kreotech™ DAPI Counterstain benutzt.

### 3.5.6 Zur mikroskopischen Auswertung verwendete Geräte

Die Betrachtung der fertigen Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte frühestens 1 Stunde nach der Gegenfärbung mit DAPI. Zum Erhalt der Sondensignale wurden die Gewebeschnitte abgedunkelt bei 2°C gelagert.

Die Auswertung der hybridisierten Objektträger erfolgte mit dem Mikroskop Nikon Eclipse E600 unter 600-facher Vergrößerung (Objektiv: Plan Apo 60x/1,40 Oil, ∞/0,17, WD 0,21). Als Lichtquelle diente eine 100 Watt Quecksilberlampe. Die Filtersätze wurden so gewählt, dass sie den Herstellerangaben der Absorptions- und Emissionsspektren entsprachen. Die in dieser Arbeit enthaltenen Falschfarbenbilder, die zur Veranschaulichung der Auswertung dienen, wurden mit dem Mikroskop BX 61 (Olympus Corporation Tokyo, Japan) der Kamera ProgRes® MF (JENOPTIK Jena) und dem Aufnahmeprogramm Isis (Version 5.7.2 MetaSystems GmbH Altlußheim) erstellt.

## 3.6 Datenerfassung und Statistik

Die bei der Auswertung der FISH gezählten Veränderungen wurden mittels Excel Tabellen geordnet. Zusammenfassend wurden die Patientendaten in IBM® SPSS® Statistics (Version 24.0.0.4 und 26.0.0.0) übertragen. Mit diesem Programm wurden auch alle statistischen Tests durchgeführt. Die Berechnung der Standardabweichung (*SD*) erfolgte nach folgender Formel:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Zum Vergleich zweier unverbundener quantitativer Merkmale wurde bei normalverteilten Werten der t-Test benutzt. Lag keine Normalverteilung vor, diente der Mann-Whitney-U-Test, um signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen festzustellen. Als Test auf Normalverteilung kam der Kolmogorov-Smirnov-Test zum Einsatz. Um signifikante Unterschiede quantitativer Merkmale aus mehr als zwei abhängigen Gruppen zu ermitteln, wurde der Friedman-Test verwendet. Der Chi-Quadrat-Test wurde bei unverbundenen qualitativen Ausprägungen zum Vergleich eingesetzt und parallel dazu der Cochran-Q-Test bei verbundenen Merkmalen. Kaplan-Meier-Analysen dienten zur Darstellung von Überlebensraten, wobei mittels Log-Rank-Test die Überlebensfunktionen verschiedener Gruppen verglichen wurden. Mittels Cox-Regressionsanalysen ließ sich das Hazard Ratio einer Variablen

schätzen. Durch den Korrelationskoeffizient nach Pearson konnte ein Maß des Zusammenhangs zweier metrisch skaliertes Merkmale festgestellt werden. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von 0,05 festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kriterien und Vorgehensweise zur optischen Auswertung der FISH

Zu jedem der 20 Patienten wurden jeweils drei unterschiedliche Tumoreale (A, B und C) auf Zugewinne bzw. Verluste (Aberrationen) in den vier für die Auswertung relevanten chromosomalen Regionen untersucht. Dazu wurden je 100 Zellkerne nach den Kriterien, welche in den Abschnitten 4.1.1 bis 4.1.4 beschrieben werden, ausgewertet. Die Auszählung der Sondersignale erfolgte ohne Kenntnis über die klinischen Daten der Patienten, im Speziellen des Metastasierungsstatus. Zur Untersuchung auf Veränderungen in der jeweiligen Region wurde immer eine für die Zielregion spezifische Sonde und eine Kontrollsonde benutzt. Kontrollsonden dienen der Bestimmung des Ploidiestatus der Zelle. Da sich das Zentromer 2 in vorangegangenen Untersuchungen des kNZK mittels array-CGH als selten verändert zeigte, wurde die Zentromer 2 Sonde zur Kontrolle der Ploidie verwendet (Sanjmyatav et al., 2011).

#### 4.1.1 Untersuchung auf Zugewinne der chromosomalen Region 1q21.3

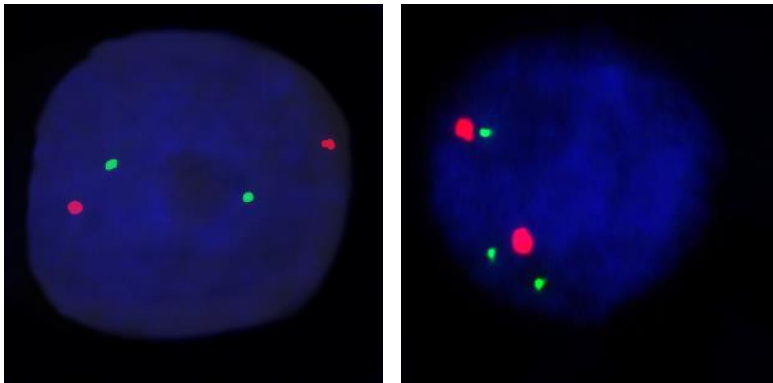


Abbildung 5: Falschfarbenbild zweier mittels DAPI blaugefärbter Zellkerne: grüne Signale (Sonde 1q21.3) und rote Signale (Sonde 1p12)

Im linken Bild der Abbildung 5 ist eine normale diploide Zelle mit zwei roten und zwei grünen Signalen zu sehen. Diese wurde in der mikroskopischen Auszählung als nicht verändert gewertet. Das rechte Bild zeigt neben den beiden roten Signalen durch ein drittes Grünsignal einen spezifischen Zugewinn in der Region 1q21.3. Diese Zelle ging beispielhaft als verändert in die Auswertung mit ein.

#### 4.1.2 Untersuchung auf Zugewinne der chromosomalen Region 7q36.3

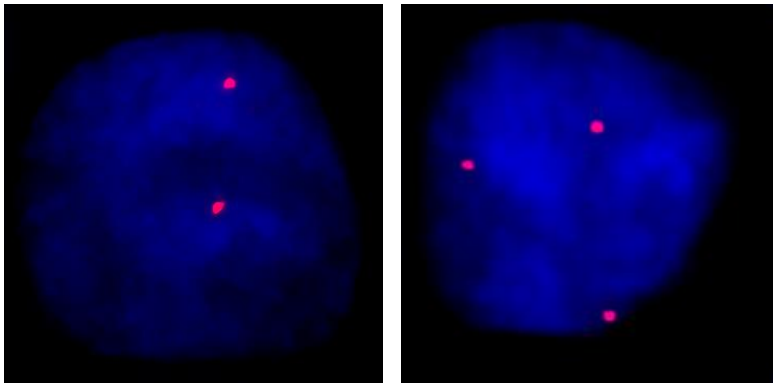


Abbildung 6: Falschfarbenbild zweier mittels DAPI blaugefärbter Zellkerne: rote Signale (Region 7q36.3)

Die beiden in

Abbildung 6 gezeigten Zellkerne wurden mit der Sonde für die Subtelomerregion 7q.36 hybridisiert. Der Zellkern links zeigt eine unveränderte Zelle mit zwei roten Sondensignalen. Auf der rechten Seite ist ein Zellkern mit einem Zugewinn (drei Signale) in der Region 7q36 zu sehen. Solche Zellen wurden als verändert gewertet.

#### 4.1.3 Untersuchung auf Verluste in der chromosomalen Region 9p21.3–p24.1

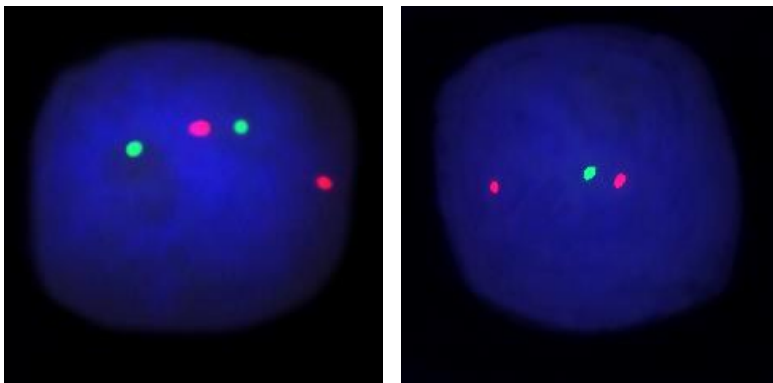


Abbildung 7: Falschfarbenbild zweier mittels DAPI blaugefärbter Zellkerne: grüne Signale (Sonde 9p21.3) und rote Signale (Zentromersonde 9)

Im linken Teil der Abbildung 7 ist ein unveränderter Zellkern mit zwei roten und zwei grünen Signalen zu sehen. Zellen mit Verlusten in der chromosomalen Region 9p21.3 waren, wie im rechten Bild, an nur einem grünen Sondensignal zu erkennen.

## 4.1.4 Untersuchung auf Zugewinne der chromosomalen Region 20q11.21–q13.32

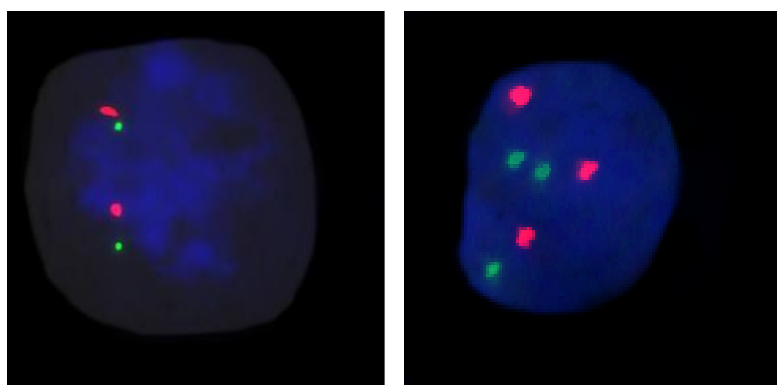


Abbildung 8: Falschfarbenbild zweier mittels DAPI blaugefärbter Zellkerne: rote Signale (Region 20q12) und grüne Signale (Region 20q11)

Die in Abbildung 8 dargestellten Zellkerne wurden mit Sonden für die chromosomalen Regionen 20q11.2 und 20q12.3 hybridisiert. Der Zellkern auf der linken Seite zeigt eine normale Konstellation von zwei grünen und zwei roten Signalen. Der Zellkern rechts in der Abbildung weist dagegen einen kombinierten Zugewinn der Regionen 20q11.2 und 20q12.3 auf und ist somit ein Beispiel für einen genomischen Zugewinn in dieser Region.

## 4.2 Deskriptive Auswertung der FISH-Ergebnisse

## 4.2.1 Absolute Anzahl der Aberrationen je Sonde und Areal

Nach den in 4.1 genannten Kriterien wurden 60 Tumorareale von 20 Patienten auf Aberrationen untersucht. Die gezählten Aberrationen werden in Tabelle 13 zusammengefasst. Die Arealbezeichnungen A, B und C sind unter den 20 Patienten nicht vergleichbar und wurden nur zur besseren Übersicht gleich benannt.

Tabelle 13: Anzahl der Aberrationen je 100 Zellen in den drei Tumorarealen A, B und C aufgeteilt nach chromosomaler Region

Patient	1q21 A	1q21 B	1q21 C	7q36 A	7q36 B	7q36 C	9p21 A	9p21 B	9p21 C	20q12 A	20q12 B	20q12 C
M0 10016/06	32	20	35	33	55	39	11	9	5	10	26	9
M0 14779/10	1	0	2	5	2	0	6	44	30	8	6	7
M0 21039/05	1	1	1	13	13	10	1	9	8	10	9	13
M0 21723/05	10	7	19	12	16	9	38	25	34	19	16	18
M0 2224/06	62	57	45	25	28	53	16	20	10	54	46	24
M0 22367/08	84	85	13	54	66	23	11	11	4	52	42	40
M0 22816/05	22	9	26	40	57	22	12	11	4	90	26	50
M0 5550/10	23	26	44	26	22	77	8	5	5	5	28	81
M0 7328/11	10	0	4	26	18	27	54	85	80	64	51	30
M0 9666/06	6	6	2	10	8	9	8	7	5	10	9	9
M1 15083/08	6	4	3	8	6	5	40	34	92	9	9	6
M1 15587/06	22	55	52	23	41	22	2	6	3	39	76	45



## Ergebnisse

M1	219/09	58	23	65	16	26	26	13	8	11	58	90	85
M1	21915/06	70	3	55	32	11	12	12	24	10	70	14	9
M1	22273/11	1	8	6	11	7	40	49	10	80	14	6	26
M1	23665/08	65	39	16	35	44	22	88	75	98	20	46	24
M1	3319/10	9	26	38	22	24	41	9	9	5	5	9	31
M1	5967/10	3	2	49	4	1	8	6	21	6	7	4	14
M1	6901/08	42	3	7	8	5	24	81	31	61	17	14	8
M1	9278/08	15	46	11	8	15	5	85	45	8	18	45	6

### 4.2.2 Mittelwerte der Aberrationen

Die Mittelwerte ( $M$ ) der Aberrationen, geordnet nach Region, sind in Tabelle 14 zu sehen. Es wurden die nicht metastasierte (M0), die metastasierte (M1) sowie die gesamte Kohorte (M0 + M1) jeweils einzeln betrachtet. Im Durchschnitt wurden zwischen 22,5 (Sonde 7q36) und 28,1 (Sonde 20q21) Aberrationen je 100 Zellen pro Tumorareal gefunden. Die Sonden 1q21 und 9p21 zeigten insgesamt mehr Aberrationen in der Gruppe der metastasierten Tumoren. Die Sonden 7q36 und 20q12 hatten dagegen mehr Veränderungen in der Gruppe der nicht metastasierten Tumoren. In der Anzahl der gezählten Zugewinne bzw. Verluste konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den vier untersuchten chromosomalen Regionen beobachtet werden ( $p = 0,796$ ).

Tabelle 14: Mittelwerte (Median) der Aberrationen pro 100 Zellen aufgeteilt nach Metastasierungsstatus

Sonden:	1q21	7q36	9p21	20q12	Alle Sonden
M0	21,77 (11,5)	26,60 (22,5)	19,20 (10,5)	28,73 (21,5)	24,08 (16,0)
M1	26,73 (19,0)	18,40 (15,5)	34,07 (17,0)	27,47 (15,5)	26,67 (16,0)
M0 + M1	24,25 (15,5)	22,50 (22,0)	26,63 (11,0)	28,10 (18,0)	25,37 (16,0)

### 4.3 Untersuchung der intratumoralen Heterogenität

#### 4.3.1 Standardabweichung der Aberrationen zwischen den Tumorarealen A, B und C eines Patienten

Eine Möglichkeit, ein absolutes Streuungsmaß der Aberrationen zwischen den drei Arealen eines Tumors zu erhalten, ist die Berechnung der Standardabweichung ( $SD$ ). Tabelle 15 fasst die  $SD$  der Aberrationen sowie die durchschnittliche Standardabweichung ( $\overline{SD}$ ) geordnet nach Metastasierungsstatus und untersuchter chromosomaler Aberration zusammen. Die Auswertung ergab in Region 7q36 die niedrigste (9,95) und in Region 1q21 die höchste (14,02) Streuung der Aberrationen eines Tumors. Über alle Patienten hinweg fand sich eine  $\overline{SD}$  von 12,21 Aberrationen zwischen den Arealen. Die  $SD$  zwischen den vier untersuchten chromosomalen Regionen unterschied sich nicht signifikant voneinander ( $p = 0,475$ ).

Ergebnisse

Tabelle 15:  $SD$  und  $\overline{SD}$  der Aberrationen zwischen den Arealen A, B und C eines Tumors

	Patient	$SD$ 1q21	$\overline{SD}$ 1q21	$SD$ 7q36	$\overline{SD}$ 7q36	$SD$ 9p21	$\overline{SD}$ 9p21	$SD$ 20q12	$\overline{SD}$ 20q12	$\overline{SD}$ aller Sonden
M0	10016/06	7,94		11,37		3,06		9,54		9,88
M0	14779/10	1,00		2,52		19,22		1,00		
M0	21039/05	0,00		1,73		4,36		2,08		
M0	21723/05	6,24		3,51		6,66		1,53		
M0	2224/06	8,74	9,28	15,37	11,08	5,03	6,66	15,53	12,52	
M0	22367/08	41,28		22,19		4,04		6,43		
M0	22816/05	8,89		17,50		4,36		32,33		
M0	5550/10	11,36		30,66		1,73		38,97		
M0	7328/11	5,03		4,93		16,64		17,16		
M0	9666/06	2,31		1,00		1,53		0,58		
M1	15083/08	1,53		1,53		31,90		1,73		14,54
M1	15587/06	18,25		10,69		2,08		19,86		
M1	219/09	22,50		5,77		2,52		17,21		
M1	21915/06	35,16		11,85		7,57		33,87		
M1	22273/11	3,61	18,76	18,01	8,82	35,08	16,53	10,07	14,04	
M1	23665/08	24,52		11,06		11,53		14,00		
M1	3319/10	14,57		10,44		2,31		14,00		
M1	5967/10	26,85		3,51		8,66		5,13		
M1	6901/08	21,46		10,21		25,17		4,58		
M1	9278/08	19,16		5,13		38,51		19,97		
M0+M1			14,02		9,95		11,60		13,82	12,21

Bei Vergleich der  $SD$  zwischen M0 und M1 Patienten (siehe Abbildung 9), war diese im metastasierten Teil der Kohorte ( $\overline{SD} = 14,54$ ) im Mittel signifikant höher als im nicht metastasierten Teil ( $\overline{SD} = 9,88$ ) ( $p = 0,014$ ).

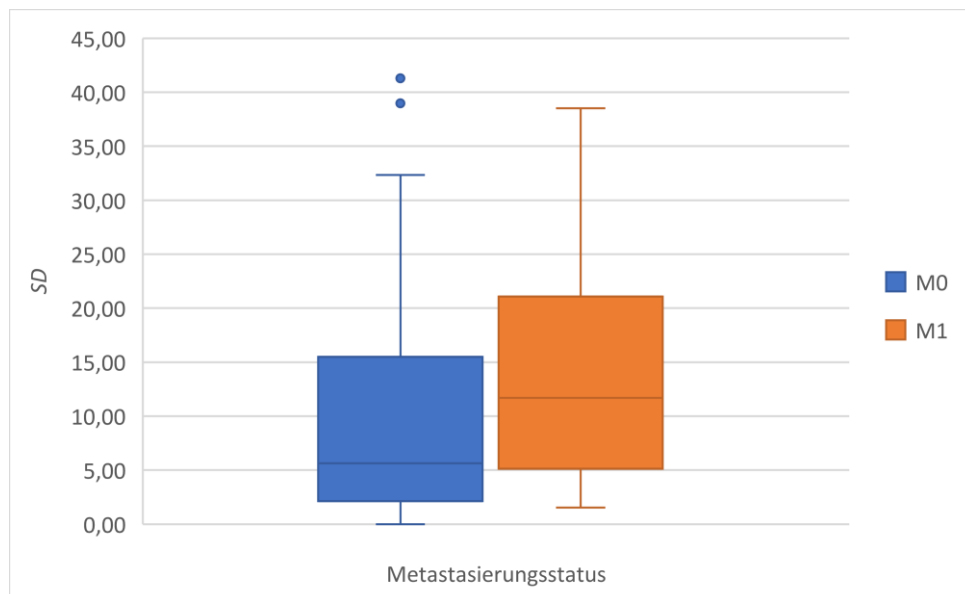


Abbildung 9: Verteilung der  $SD$  aus Tabelle 15 zwischen M0 und M1 Patienten ( $p = 0,014$ )

#### 4.3.2 Variationskoeffizient der Aberrationen zwischen den drei Tumorarealen A, B und C eines Patienten

Zur besseren Beurteilung der Heterogenität der gezählten Veränderungen innerhalb der drei Areale (A, B und C) wird ein von Absolutwerten unabhängiges Streuungsmaß benötigt. Dafür eignet sich der auch als relative Standardabweichung bezeichnete Variationskoeffizient ( $v$ ). Dieser ist sehr gut geeignet, um die Heterogenität zwischen den verschiedenen Sonden und Patienten zu vergleichen, da es sich um ein relatives Streuungsmaß handelt. Dieses zeichnet sich dadurch aus, dass es unbeeinflusst von der Skalierung der Messwerte bleibt. Der  $v$  wird definiert als der Quotient aus der  $SD$  und dem arithmetischen Mittelwert ( $M$ ) und kann in Prozent angegeben werden.

$$v = \frac{SD}{M}$$

Werte über 100 % deuten auf eine sehr große Streuung bzw. Heterogenität zwischen den Arealen hin, da in diesem Fall die  $SD$  der gezählten CNVs zwischen den Arealen A, B und C größer ist als deren Mittelwert. Die errechneten Variationskoeffizienten variierten in dieser Kohorte zwischen 0 und 148,2 % (vgl. Tabelle 16). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde ebenfalls der durchschnittliche Variationskoeffizienten ( $\bar{v}$ ) bestimmt. Über alle untersuchten genetischen Veränderungen hinweg betrug der  $\bar{v}$  zwischen Areal A, B und C 50,8 % (Median 46,4 %). CNVs in der Region 20q12 waren bei M0 Patienten mit einem  $\bar{v}$  von 36,1 % am homogensten verteilt. Die größte Heterogenität zwischen den ausgewerteten Aberrationen fand sich im metastasierten Teil der Kohorte, in der Region 1q21, mit einem  $\bar{v}$  von 75,2 %. Der  $\bar{v}$  war in allen untersuchten chromosomalen Regionen in der M0 Gruppe geringer als im metastasierten Teil der Kohorte. Die Verteilung des  $v$  zwischen den vier chromosomalen Regionen zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,348$ ).

Tabelle 16: Variationskoeffizient ( $v$ ) und durchschnittlicher Variationskoeffizient ( $\bar{v}$ ) der gezählten CNVs zwischen den Arealen A, B, und C in Prozent [%]

	Patient	1q21		7q36		9p21		20q12		Sonden gesamt	
		$v$	$\bar{v}$	$v$	$\bar{v}$	$v$	$\bar{v}$	$v$	$\bar{v}$	$\bar{v}$	$\bar{v}$
M0	10016/06	27,4		26,9		36,7		63,6		38,6	
M0	14779/10	100,0		107,9		72,1		14,3		73,6	
M0	21039/05	0,0		14,4		72,6		19,5		26,6	
M0	21723/05	52,0		28,5		20,6		8,6		27,4	
M0	2224/06	16,0		43,5		32,8		37,6		32,5	
M0	22367/08	68,0	50,4	46,5	41,7	46,6	40,4	14,4	36,1	43,9	42,2
M0	22816/05	46,8		44,1		48,4		58,4		49,4	
M0	5550/10	36,6		73,6		28,9		102,6		60,4	
M0	7328/11	107,9		20,8		22,8		35,5		46,7	
M0	9666/06	49,5		11,1		22,9		6,2		22,4	

## Ergebnisse

M1	15083/08	35,3		24,1		57,6		21,7		34,7
M1	15587/06	42,4		37,3		56,8		37,2		43,4
M1	219/09	46,2		25,5		23,6		22,2		29,4
M1	21915/06	82,4		64,6		49,4		109,2		76,4
M1	22273/11	72,1		93,2		75,7		65,7		76,7
M1	23665/08	61,3	75,2	32,9	53,2	13,3	51,3	46,7	58,0	38,5
M1	3319/10	59,9		36,0		30,1		93,3		54,8
M1	5967/10	149,2		81,0		78,7		61,6		92,6
M1	6901/08	123,8		82,8		43,6		35,3		71,4
M1	9278/08	79,8		55,0		83,7		86,8		76,3
M0 + M1			62,8		47,5		45,8		47,0	50,8

Bei Vergleich aller  $v$  (siehe Abbildung 10) ließ sich bei den metastasierten Tumoren mit einem  $\bar{v}$  von 59,4 % (Median: 63,1 %) eine signifikant höhere ITH ( $p = 0,007$ ) ermitteln, als bei den nicht metastasierten Patienten mit einem  $\bar{v}$  von 42,2 % (Median 41,3 %).

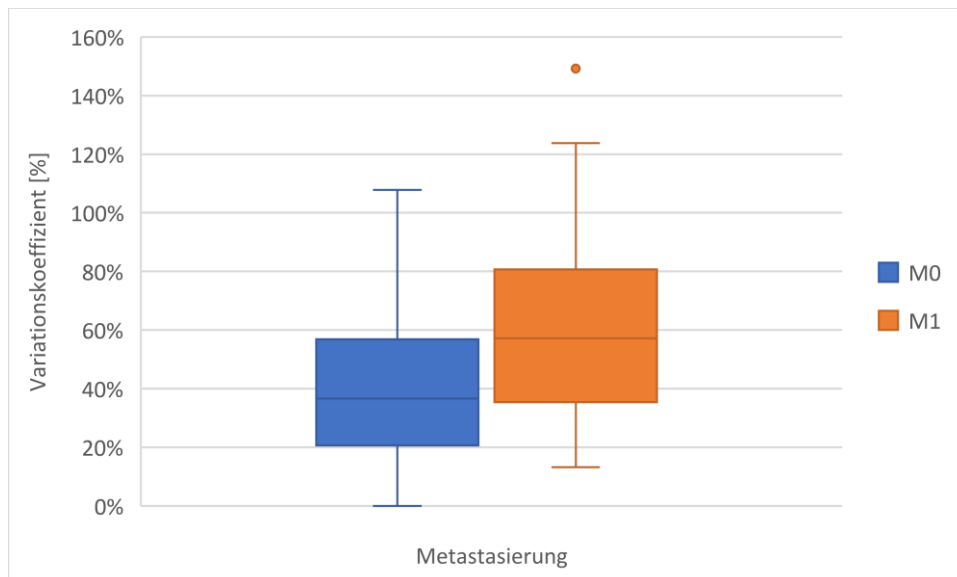


Abbildung 10: Verteilung der  $v$  aus Tabelle 16 zwischen M0 und M1 Patienten ( $p = 0,007$ )

### 4.3.3 Intratumorale Heterogenität und Tumorgröße

Bei Betrachtung der ITH mit weiteren klinischen Daten ließ sich ein Korrelationskoeffizient nach Pearson von 0,581 zwischen der Tumorgröße und der ITH feststellen ( $p = 0,007$ ). Dabei diente der  $v$  eines jeden Patienten (Tabelle 16) als Maßzahl für die ITH. In Abbildung 11 wurde der  $\bar{v}$  der vier Aberrationen eines Patienten gegen die Tumorgröße aufgetragen. Das durch die Gerade  $y = 0,22 + 0,0413x$  dargestellte lineare Regressionsmodell führt bei einer Zunahme der Tumorgröße um 1 cm zu einer durchschnittlichen Steigerung des  $\bar{v}$  um 0,041 bzw. 4,1 Prozentpunkte ( $p = 0,007$ ). Das Regressionsmodell erbrachte ein korrigiertes  $R^2$  von 30,0 %.

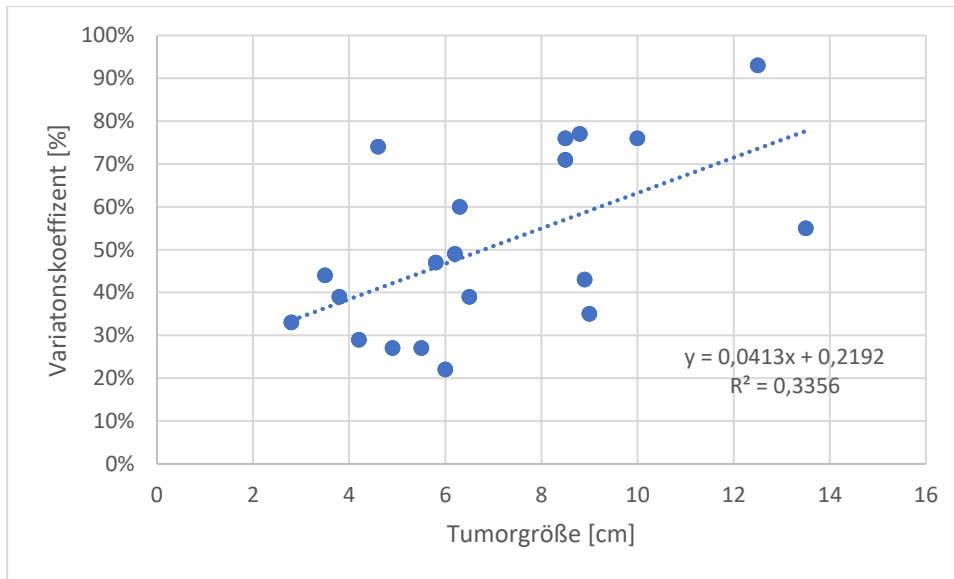


Abbildung 11: Durchschnittlicher Variationskoeffizient ( $\bar{v}$ ) der Aberrationen eines Patienten in Abhängigkeit von der Tumorgröße mit eingezeichneter Regressionsgerade ( $y = 0,22 + 0,0413x$ )

Tabelle 17: Regressionsanalyse des Einflusses der Tumorgröße auf die ITH

Variable	Unstandardisiert	Standardisiert	Standardfehler
Konstante	0,218 ( $p = 0,049$ )		
Tumorgröße	0,041 ( $p = 0,007$ )	0,581	0,014
R <sup>2</sup>	0,337		
Korrigiertes R <sup>2</sup>	0,300		
F (df = 1;18)	9,152 ( $p = 0,007$ )		

#### 4.3.4 Intratumorale Heterogenität und Overall Survival

Der  $\bar{v}$  wurde weiterhin dichotomisiert und in eine Gruppe von Patienten mit niedriger ITH ( $\bar{v} \leq 0,5$ ) und hoher ITH ( $\bar{v} > 0,5$ ) eingeteilt. Diese Einteilung wurde gewählt, da sich im Kolmogorov-Smirnov-Test ( $p = 0,200$ ) eine annähernde Normalverteilung des  $\bar{v}$  bei einem Mittelwert von 0,51 und einem Median von 0,45 zeigte. In der Kaplan-Meier-Analyse des OS lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen Patienten mit niedriger und Patienten mit hoher ITH erkennen, welcher mit einem p-Wert von 0,012 im

Log-Rank-Test statistisch signifikant ist (vgl.

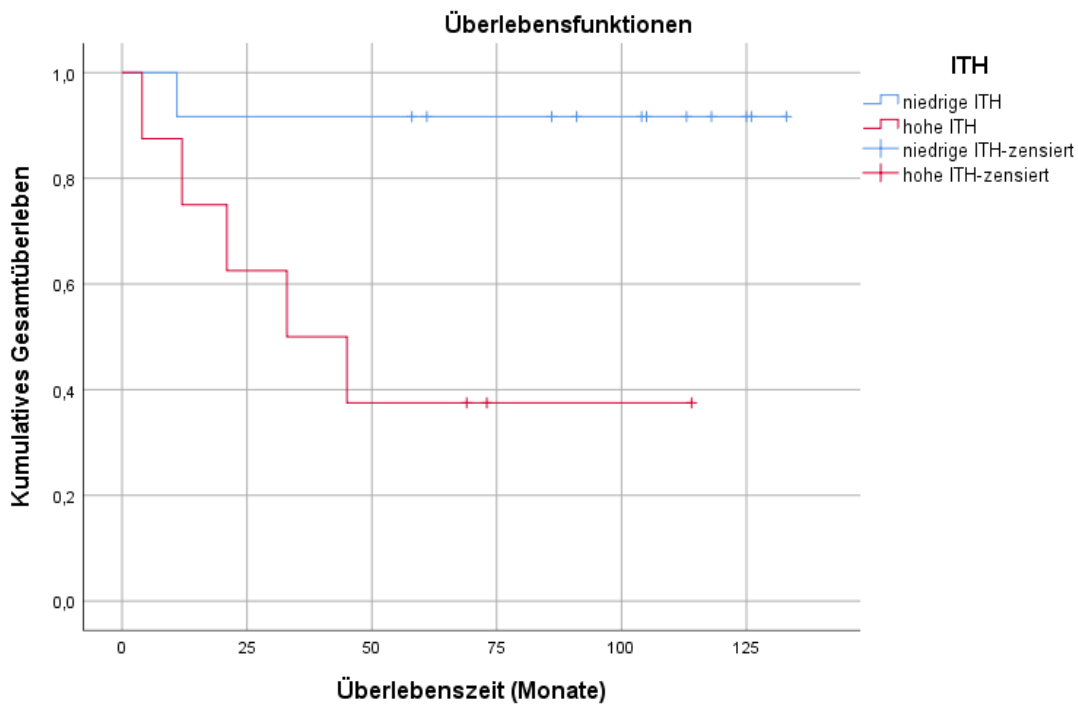


Abbildung 12). Die Cox-Regressionsanalyse ergab im univariaten Modell einen Risikozuwachs der Mortalität um das 9,56-Fache (95 % KI: 1,11–82,44) bei Vorliegen eines heterogenen Tumors. Dieser Zusammenhang bleibt jedoch nach Abgleich mit weiteren Prognosefaktoren (vgl. Tabelle 19) wie T-Kategorie und Tumorgrad nicht signifikant ( $p = 0,065$ ).

Tabelle 18: Datentabelle zur Kaplan-Meier-Analyse des OS zwischen Tumoren mit niedriger und hoher ITH

ITH	Anzahl Gesamt	Anzahl Ereignisse (Tod)	Anzahl Zensiert	p-Wert (Log-Rank)
niedrig	12	1	11	0,012
hoch	8	5	3	

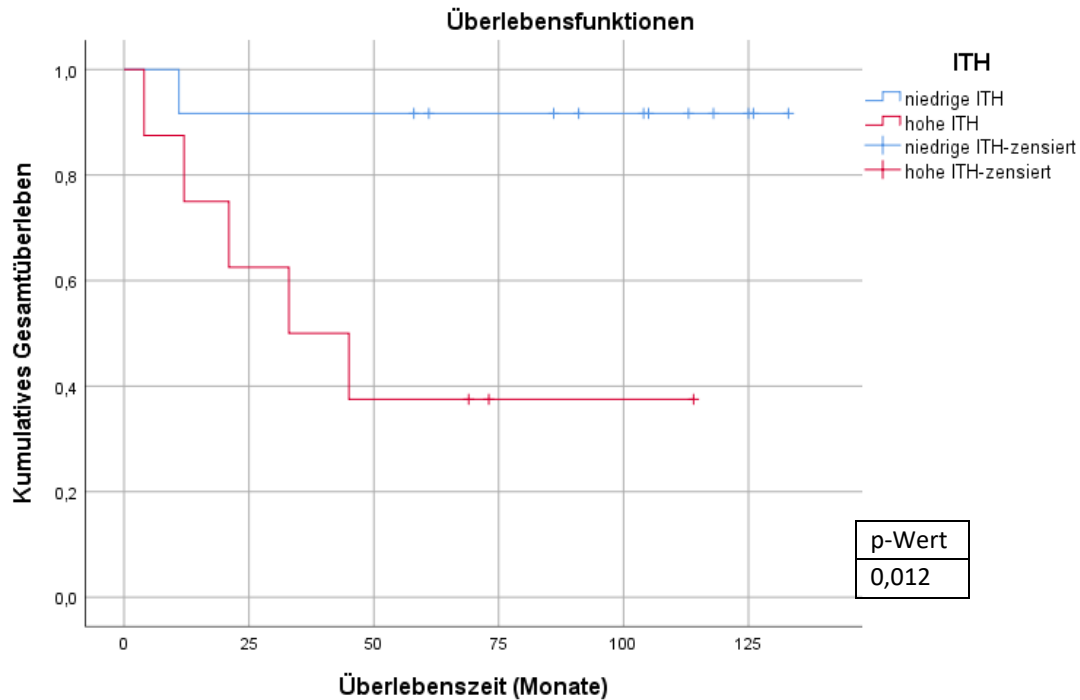


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Analyse des OS zwischen Patienten mit niedriger ( $\bar{v} \leq 0,5$ ) und hoher ( $\bar{v} > 0,5$ ) ITH

Tabelle 19: Cox-Regressionsanalyse des OS

Faktor	p-Wert		Hazard Ratio (95 % CI)	
	univariat	multivariat	univariat	multivariat
ITH	0,040	0,065	9,56 (1,11 - 82,44)	10,3 (0,87 - 123,21)
T-Kategorie	0,025	0,052	2,75 (1,14 - 6,66)	2,741 (0,99 - 7,59)
Grading	0,198	0,172	2,70 (0,60 - 12,21)	3,71 (0,57 - 24,38)

#### 4.4 Auswirkung der intratumorale Heterogenität auf das Prognosemodell

##### 4.4.1 Auswirkung der intratumorale Heterogenität auf die Bewertung der Tumorareale A, B und C

Zur Auswertung der FISH wurden außerdem für jede Sonde Cut-off-Werte benutzt (vgl. Tabelle 20). Diese Grenzwerte konnten bereits an einer größeren Kohorte von 100 Patienten in unserer Arbeitsgruppe bestimmt werden. Die Cut-offs wurden dabei mittels Receiver-Operating-Characteristic-Kurven (ROC-Kurven) und der Metastasierung als Endpunkt ermittelt (Grimm et al., 2019). So konnte für jede Sonde ein Grenzwert an gezählten Aberrationen bestimmt werden, welcher am besten zwischen metastasierten und nicht metastasierten CNVs unterscheidet.

Aus diesem Blickwinkel ist zur Beurteilung der Heterogenität eines Tumors nicht die absolute Streuung der gezählten Aberrationen entscheidend. Um die Auswirkungen auf das bestehende Prognosemodell und die Metastasierungswahrscheinlichkeit zu beurteilen, bietet sich die dichotome Betrachtung jedes der drei Tumorareale in „verändert“ bzw. „nicht verändert“ an. Lag die Anzahl der Veränderungen aller

drei Areale A, B und C eines Patienten gleichzeitig über oder unter dem Cut-off, war dies ein Zeichen für **Homogenität** („alle Areale identisch“). Im Gegenzug waren Tumoren, deren drei untersuchte Areale nicht in dieselbe Kategorie fielen, als **heterogen** einzustufen („unterschiedliche Areale“).

Tabelle 20: Verteilung homogener und heterogener CNVs eines Tumors, geordnet nach untersuchter chromosomaler Region (schwarze Schriftfarbe = unter dem Cut-off / rote Schriftfarbe = über dem Cut-off)

Patient	1q21			7q36			9p21			20q12		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
M0 10016/06	32	20	35	33	55	39	11	9	5	10	26	9
M0 14779/10	1	0	2	5	2	0	6	44	30	8	6	7
M0 21039/05	1	1	1	13	13	10	1	9	8	10	9	13
M0 21723/05	10	7	19	12	16	9	38	25	34	19	16	18
M0 2224/06	62	57	45	25	28	53	16	20	10	54	46	24
M0 22367/08	84	85	13	54	66	23	11	11	4	52	42	40
M0 22816/05	22	9	26	40	57	22	12	11	4	90	26	50
M0 5550/10	23	26	44	26	22	77	8	5	5	5	28	81
M0 7328/11	10	0	4	26	18	27	54	85	80	64	51	30
M0 9666/06	6	6	2	10	8	9	8	7	5	10	9	9
M1 15083/08	6	4	3	8	6	5	40	34	92	9	9	6
M1 15587/06	22	55	52	23	41	22	2	6	3	39	76	45
M1 219/09	58	23	65	16	26	26	13	8	11	58	90	85
M1 21915/06	70	3	55	32	11	12	12	24	10	70	14	9
M1 22273/11	1	8	6	11	7	40	49	10	80	14	6	26
M1 23665/08	65	39	16	35	44	22	88	75	98	20	45	24
M1 3319/10	9	26	38	22	24	41	9	9	5	5	9	31
M1 5967/10	3	2	49	4	1	8	6	21	6	7	4	14
M1 6901/08	42	3	7	8	5	24	81	31	61	17	14	8
M1 9278/08	15	46	11	8	15	5	85	45	8	18	45	6
<b>Cut-Off-Wert</b>	1q21: 15			7q36: 25			9p21: 20			20q12: 15		
<b>Areale A, B und C homogen</b>						<b>Areale A, B und C heterogen</b>						

Nach diesen Kriterien verteilte sich die Heterogenität zwischen den chromosomalen Regionen und dem Metastasierungsstatus wie in Abbildung 13 dargestellt. In 31 von insgesamt 80 ausgewerteten Arealtripletts konnte keine übereinstimmende Kategorisierung erfolgen. Aberrationen verteilten sich in der Region 9p21 am homogensten und der Region 7q36 am heterogensten. Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der Heterogenität zwischen den verschiedenen chromosomalen Sonden ( $p = 0,576$ ).



Mit 20 heterogenen Arealtripletts war in der M1 Gruppe die Heterogenität beinahe doppelt so hoch wie in der M0 Gruppe mit nur 11 heterogenen Arealtripletts. Die Ausprägung der Heterogenität in Abhängigkeit vom Metastasierungsstatus war mit einem p-Wert von 0,039 signifikant.

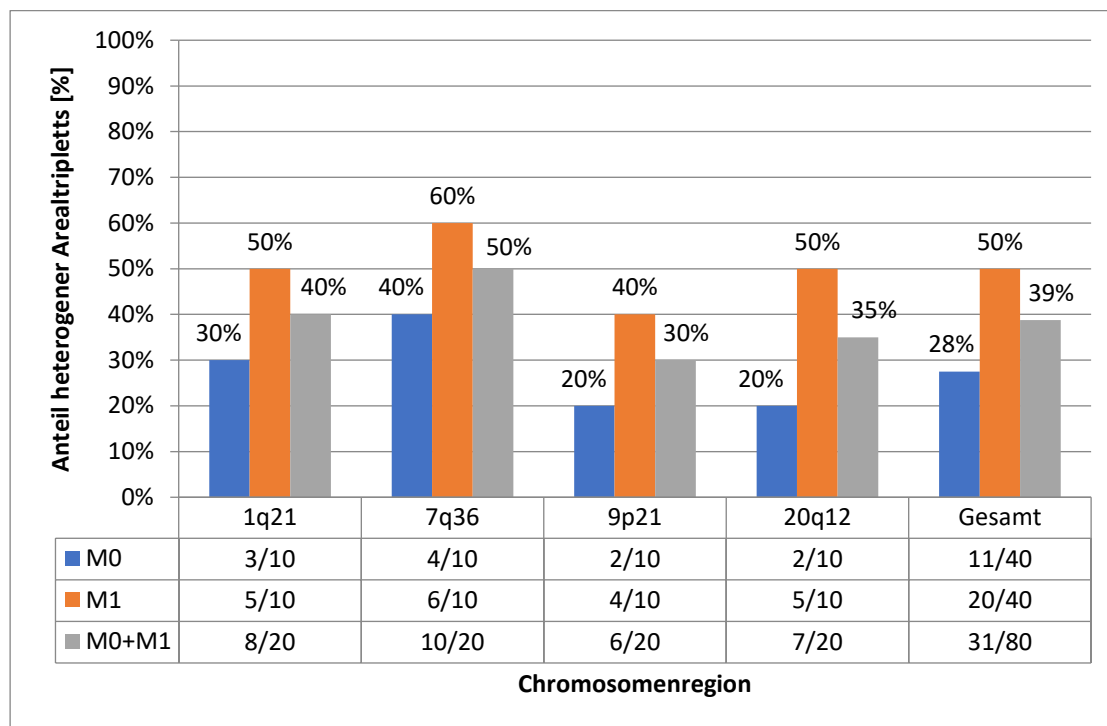


Abbildung 13: Prozentualer Anteil heterogener Tumorareale (A, B und C) geordnet nach untersuchter chromosomaler Region und dem Metastasierungsstatus

#### 4.4.2 Auswirkung der intratumorale Heterogenität auf die Total Number of Specific Aberrations (TNSA)

In dem bereits in Abschnitt 2.8.3 vorgestellten Prognosemodell wird die Verwendung der TNSA als prognostischer Score beschrieben. Die TNSA ist die Summe aller chromosomalen Regionen in denen die gezählten Aberrationen über dem festgelegten Cut-off lagen. Da die Tumoren auf CNVs in vier verschiedenen Regionen untersucht wurden, kann die TNSA Werte von 0 bis 4 annehmen. (Sanjmyatav et al., 2014)

Weil in dieser Arbeit bei jedem Patienten drei unterschiedliche Tumorareale ausgewertet wurden, konnte jeweils auch dreimal eine TNSA bestimmt werden. Zur Betrachtung der Heterogenität wurde daher weiterhin jeder Patient in die Kategorien „0, 2 oder 3 identische TNSA-Werte“ eingeteilt. 0 identische TNSA-Werte sind dabei als Maß für große Heterogenität anzusehen, in umgekehrter Schlussfolgerung gelten Tumoren mit 3 identischen TNSA-Werten als sehr homogen. Wie in Abbildung 14 zu erkennen, ließen sich für den Großteil (15/20) aller Tumoren 2 identische TNSA-Werte belegen. In der Gruppe der M0 Patienten betrug deren Anteil 80 %, in der M1 Gruppe 70 %. Im nicht metastasierten Teil der Kohorte konnten immer mindestens 2 identische TNSA-Werte festgestellt

werden. Ein weiterer Unterschied war der Anteil 3 identischer TNSA-Werte, also sehr homogener Tumoren, der mit 20 % bei M0 Patienten doppelt so hoch war wie bei M1 Patienten (10%). Zusammenfassend besaßen 90 % der Kohorte in mindestens zwei von drei Arealen einen identischen TNSA-Wert.

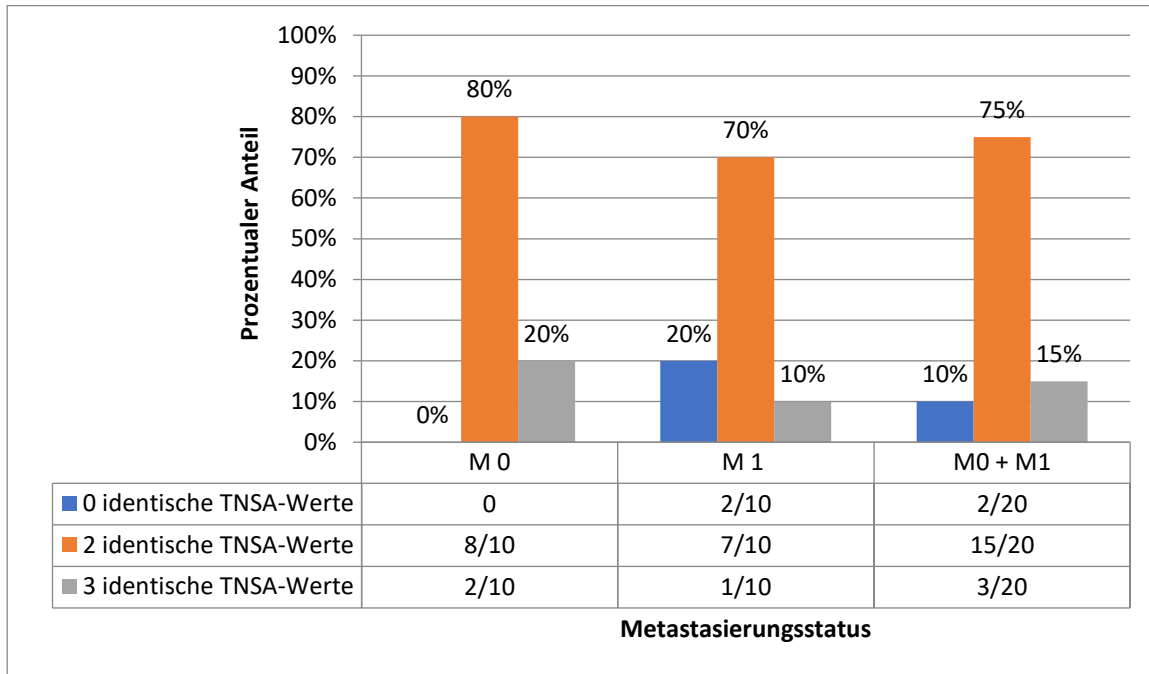


Abbildung 14: Anzahl identischer TNSA-Werte in den drei Tumorarealen eines Patienten aufgeteilt nach Metastasierungsstatus

#### 4.4.3 Auswirkungen der intratumorale Heterogenität auf die Einteilung in Risikogruppen aus TNSA und T-Kategorie

Die höchste Genauigkeit in der Vorhersage des RFS, OS und CSS konnte in den bisherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe der Prediction Probability  $PP$  (Prognosewahrscheinlichkeit) der Metastasierung erzielt werden (Grimm et al., 2019). Sie wurde über ein multivariates Regressionsmodell mit Hilfe der TNSA und T-Kategorie als unabhängige Variablen entwickelt.

$$PP = \frac{e^{\eta}}{1 + e^{\eta}} ;$$

$$\eta = -5,197 + 1,319 \times TNSA + 0,976 \times T - \text{Kategorie}$$

$$(T1a \triangleq 1; T1b \triangleq 2; T2 \triangleq 3; T3a \triangleq 4; T3b \text{ und } c \triangleq 5; T4 \triangleq 6)$$

Mit ihr lassen sich Patienten in eine Niedrigrisikogruppe ( $PP \leq 0,5$ ) und eine Hochrisikogruppe ( $PP > 0,5$ ) einteilen. Die Entwicklung dieses Regressionsmodells erfolgte anhand zweier Patientenkohorten mit je 100 Patienten in einer multizentrischen Studie unserer Arbeitsgruppe. (Grimm et al., 2019)

In Tabelle 21 ist der Einfluss der ITH nach Einteilung der Patienten in die beiden Risikogruppen dargestellt. Dabei wurde die  $PP$  für jedes Areal A, B und C einzeln bestimmt. War die  $PP$  einheitlich  $\leq$

oder  $> 0,5$ , so war die Bestimmung der Risikogruppe homogen. Demnach fand sich durch die gleichzeitige Auswertung von drei Arealen eine heterogene Bewertung der Risikogruppen in 40 % (8/20) der Fälle. Die Heterogenität war über die Gruppen M0 und M1 gleich verteilt.

Tabelle 21: Prediction Probability PP der Tumoreale und Verteilung der Heterogenität nach Kategorisierung in Risikogruppen

M0 Patient	Areal			Areal			M1 Patient
	A	B	C	A	B	C	
10016/06	0,17	0,434	0,17	0,279	0,279	0,279	15083/08
14779/10	0,215	0,506	0,506	0,911	0,974	0,911	15587/06
21039/05	0,038	0,038	0,038	0,353	0,671	0,671	219/09
21723/05	0,911	0,911	0,974	0,935	0,506	0,506	21915/06
2224/06	0,434	0,742	0,434	0,506	0,215	0,935	22273/11
22367/08	0,434	0,434	0,052	0,993	0,993	0,974	23665/08
22816/05	0,974	0,911	0,911	0,659	0,878	0,99	3319/10
5550/10	0,353	0,353	0,671	0,215	0,506	0,506	5967/10
7328/11	0,671	0,353	0,671	0,974	0,731	0,731	6901/08
9666/06	0,038	0,038	0,038	0,974	0,974	0,421	9278/08

Legende: schwarze Schriftfarbe  $\hat{=}$   $PP \leq 0,5$  / Niedrigrisikogruppe  
rote Schriftfarbe  $\hat{=}$   $PP > 0,5$  / Hochrisikogruppe

Areale A, B und C homogene Risikobewertung
Areale A, B und C heterogene Risikobewertung

#### 4.5 Einfluss der intratumorale Heterogenität auf die Trefferwahrscheinlichkeit in Anhängigkeit von der Anzahl ausgewerteter Areale

##### 4.5.1 Trefferwahrscheinlichkeit Copy Number Variations

Da nicht immer in allen drei Tumorealen A, B, und C eines Patienten dieselben CNVs nachweisbar sind, ist die Patientenprävalenz einer CNV immer höher als dessen Arealprävalenz (vgl. Abbildung 15). Die Wahrscheinlichkeit, eine vorhandene chromosomale Aberration bei Untersuchung eines einzelnen Tumoreals zu erkennen, kann mittels der intratumoralen Aberrationsprävalenz geschätzt werden. Dazu wird angenommen, dass Patienten ohne eine einzige Aberration in den drei untersuchten Arealen A, B und C auch keine Aberration im restlichen Tumorgewebe aufweisen. Die intratumorale Aberrationsprävalenz berechnet sich aus dem Quotienten:

$$\frac{\text{Tumorealprävalenz einer CNV}}{\text{Patientenprävalenz einer CNV}}$$

Die Tumorarealprävalenz ist der Anteil derjenigen Tumorareale, die eine bestimmte CNV tragen, an allen 60 untersuchten Tumorarealen. Die Patientenprävalenz ist der Anteil der Patienten mit einer CNV in mindestens einem untersuchten Areal an allen 20 Patienten. Die Berechnung der intratumoralen Aberrationsprävalenz aus den beiden Prävalenzen wird für jede CNV in Tabelle 22 zusammengefasst.

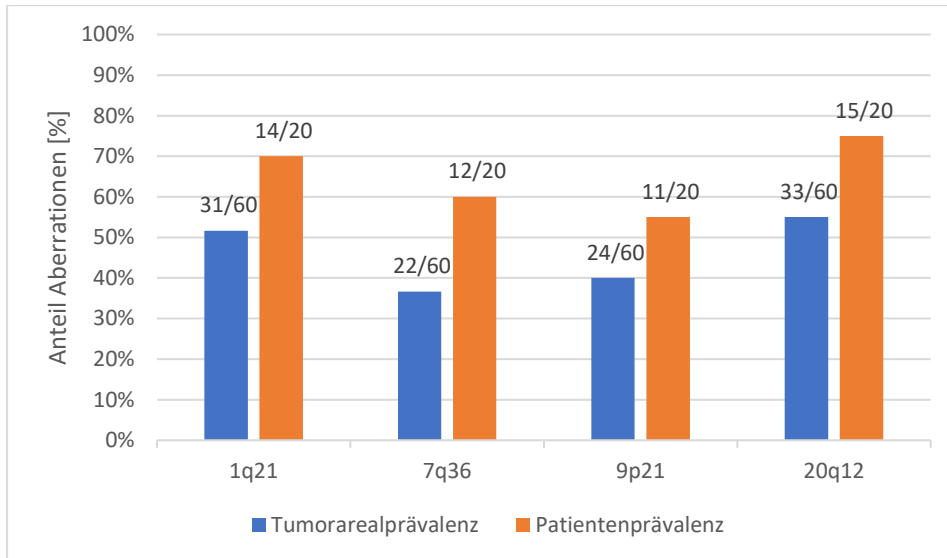


Abbildung 15: Tumorareal- und Patientenprävalenz der CNVs

Tabelle 22: Prävalenzen bzw. Wahrscheinlichkeiten der CNVs

Sonde	1q21	7q36	9p21	20q12	gesamt
Tumorarealprävalenz	31/60	22/60	24/60	33/60	110/240
Patientenprävalenz	14/20	12/20	11/20	15/20	52/80
intratumorale Aberrationsprävalenz	73,8 %	61,1 %	72,7%	73,3%	70,5 %

Um nun die Steigerung der Trefferwahrscheinlichkeit bei jedem zusätzlich untersuchten Tumorareal zu bestimmen, wurde eine Binomialverteilung angewandt. Die intratumorale Aberrationsprävalenz dient als konstante Wahrscheinlichkeit  $p$ , eine Aberration zu erkennen. Weiterhin entspricht  $n$  der Anzahl der untersuchten Areale und  $k$  der Anzahl der korrekt erkannten Aberrationen. Die Wahrscheinlichkeit, eine vorhandene chromosomale Aberration eines Tumors in mindestens einem Tumorareal zu finden  $P(X \geq 1)$ , wird mittels der Gegenwahrscheinlichkeit  $1 - P(X = 0)$  ausgedrückt.

$$P(X \geq 1) = 1 - P(X = 0);$$

$$P(X = k) = f(k; n; p) = \binom{n}{k} p^k (1 - p)^{n-k};$$

So kann für jedes zusätzlich untersuchte Tumorareal die Trefferwahrscheinlichkeit berechnet werden (vgl. Tabelle 23). Die geringste Trefferwahrscheinlichkeit findet sich in Region 7q36. Hier kann in nur 61,1 % der Fälle bei Untersuchung einer einzelnen Tumorprobe eine Aberration korrekt erkannt werden. Die chromosomalen Regionen 1q21, 9p21 und 20q12 haben jeweils sehr ähnliche

Trefferwahrscheinlichkeiten von 73,8 %, 72,7 % bzw. 73,3 %. Aus diesem Grund erscheinen deren Funktionskurven in Abbildung 16 zur Darstellung der Trefferwahrscheinlichkeit bei steigender Probenzahl beinahe deckungsgleich. Bei Untersuchung von drei Tumorproben steigt die Trefferwahrscheinlichkeit bei allen untersuchten chromosomalen Regionen bereits deutlich über 90 %. Bei weiterer Zunahme des Probenumfangs nähert sich die Trefferwahrscheinlichkeit einer Sättigung von 100 % an (vgl. Abbildung 16). (Sankin et al., 2014)

Tabelle 23: Datentabelle zur Trefferwahrscheinlichkeit, eine vorhandene CNV korrekt zu erkennen, bei steigender Anzahl der untersuchten Tumorareale n

Anzahl untersuchter Tumorareale n		1	2	3	4	5	6
Trefferwahrscheinlichkeit bei n untersuchten Tumorarealen je Sonde	1q21	73,81%	93,14%	98,20%	99,53%	99,88%	99,97%
	7q36	61,11%	84,88%	94,12%	97,71%	99,11%	99,65%
	9p21	72,73%	92,56%	97,97%	99,45%	99,85%	99,96%
	20q12	73,33%	92,89%	98,10%	99,49%	99,87%	99,96%

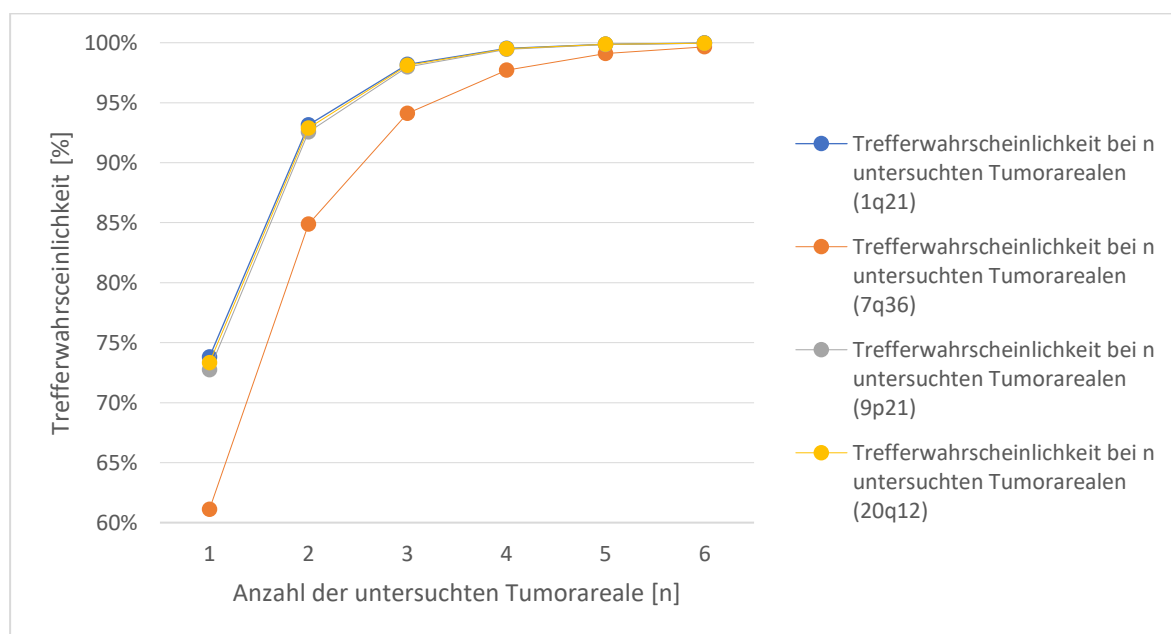


Abbildung 16: Zunahme der Trefferwahrscheinlichkeit, eine vorhandene CNV korrekt zu erkennen, bei steigender Anzahl untersuchter Tumorareale n

#### 4.5.2 Trefferwahrscheinlichkeit Hochrisikopatienten

Ebenso wie für die chromosomalen Aberrationen kann die Trefferwahrscheinlichkeit für die Erkennung von Hochrisikopatienten (vgl. 4.4.3) in Abhängigkeit vom Probenumfang bestimmt werden. 75 % der Patienten (15/20) besaßen mindestens ein Tumorareal, welches sie in die Hochrisikogruppe einordnen ließ. Jedoch waren nur 58,3 % (35/60) aller Tumorareale Teil der Hochrisikogruppe, woraus sich eine intratumorale Prävalenz von 77,78 % ergab.

Tabelle 24: Prävalenz von Hochrisikopatienten und Trefferwahrscheinlichkeiten, einen Hochrisikopatienten korrekt zu erkennen, in Abhängigkeit von der Anzahl ausgewerteter Tumorareale  $n$

		Anteil Hochrisikogruppe					
Tumorarealprävalenz		35/60 (58,3 %)					
Patientenprävalenz		15/20 (75,0 %)					
Intratumorale Prävalenz		77,78 %					
Anzahl untersuchter Tumorareale $n$		1	2	3	4	5	6
Trefferwahrscheinlichkeit bei $n$ untersuchten Tumorarealen (Hochrisikopatient)		77,78 %	95,06 %	98,90 %	99,76 %	99,95 %	99,99 %

Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, steigt die Wahrscheinlichkeit, einen Hochrisikopatienten zu identifizieren, bei zwei ausgewerteten Tumorarealen bereits auf 95,1 %. Mit der in dieser Arbeit gewählten Auswertung von drei Tumorarealen lässt sich die Trefferwahrscheinlichkeit weiter auf 98,9 % steigern.

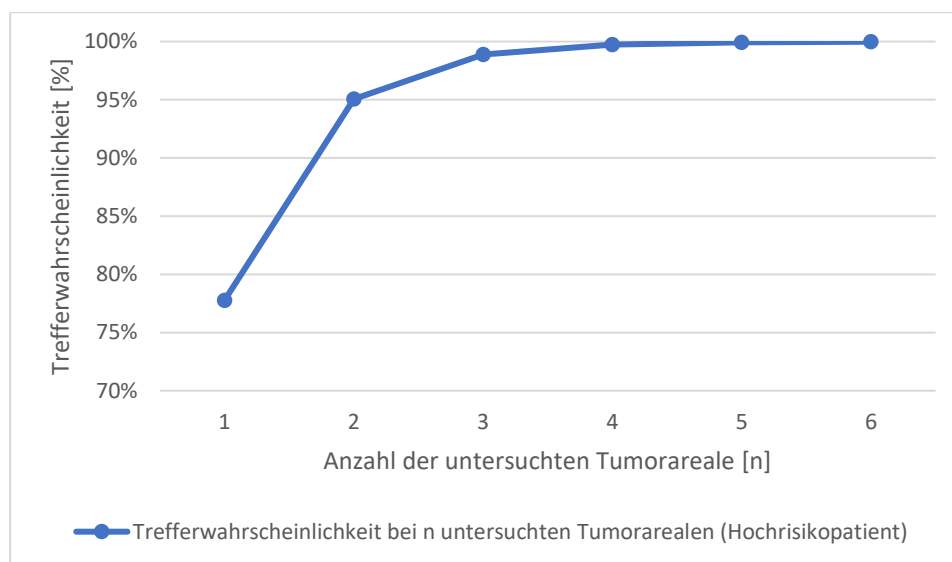


Abbildung 17: Zunahme der Trefferwahrscheinlichkeit, einen Hochrisikopatienten korrekt zu erkennen, bei steigender Anzahl untersuchter Tumorareale  $n$

## 4.6 Validierung des Prognosemodells am Patientenkollektiv

### 4.6.1 Metastasierung

Auch an diesem Patientenkollektiv sollte die prognostische Wertigkeit der *PP* überprüft werden und eine Validierung des in Abschnitt 4.4.3 dargestellten Prognosemodells erfolgen. Die Genauigkeit des Prognosemodells bezüglich der Vorhersage einer Metastasierung wurde in Tabelle 25 zusammengefasst. Da durch die parallele Auswertung drei verschiedener Areale eines Tumors auch mehrere uneinheitliche

*PP*-Werte zu einem Patienten berechnet werden konnten, erfolgte die weitere Betrachtung des Prognosemodells in unterschiedlichen Gruppen. Zur Einteilung in eine Risikogruppe wurden sowohl alle *PP*-Werte einzeln, als auch der Modalwert (häufigster *PP*-Wert), der Mittelwert und der Maximalwert der *PP* aus den drei Arealen A, B und C eines Patienten herangezogen.

Die exakteste Vorhersage gelang durch den Modalwert aus den Risikoscores der drei Areale eines Tumors. Durch ihn ließ sich die Metastasierung mit einer Sensitivität von 90 % und einer Spezifität von 60 % prognostizieren. Bei Verwendung des Maximalwertes der Risikoscores aus den Arealen A, B und C sank die Spezifität auf 40 % ab. Durch die unabhängige Auswertung aller drei Tumorareale eines Patienten betrug die Sensitivität 77 % und die Spezifität weiterhin 60 %.

Tabelle 25: Vergleich der Sensitivität und Spezifität in der Vorhersage der Metastasierung

<b>Prognose Metastasierung</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>
Risikoscores aller Areale	77 %	60 %
Modalwert Risikoscore	90 %	60 %
Maximalwert Risikoscore	90 %	40 %
Mittelwert Risikoscore	80 %	60 %

#### 4.6.2 Recurrence Free Survival

Das rezidivfreie Überleben (RFS), also die Zeit bis zum Auftreten von Fernmetastasen oder dem Versterben, zwischen Hoch- und Niedrigrisikogruppe wird in den Abbildung 18 bis Abbildung 21 durch die Kaplan-Meier-Diagramme dargestellt. Es erfolgte ebenfalls, wie im Absatz zuvor, die getrennte Betrachtung der Risikogruppen unter Verwendung aller Einzelwerte der *PP* sowie der Modalwerte, der Mittelwertes und der Maximalwerte der *PP* aus den drei Tumorarealen. Unabhängig davon fand sich in der Niedrigrisikogruppe stets ein längeres RFS. Das Risikomodell erbrachte, bei Einbeziehung aller Einzelwerte und des Modalwertes der *PP*, signifikante Unterschiede im RFS der beiden Risikogruppen (Log-Rank-Test:  $p = 0,004$  bzw.  $p = 0,018$ ). Das Cox-Regressionsmodell lieferte ebenfalls einen statistisch signifikanten Risikozuwachs um das 3,08 bzw. 8,06-Fache im Vergleich zum Niedrigrisikoarm der Kohorte. Bei Berechnung eines Mittelwertes der Areale A, B und C oder bei Verwendung der Maximalwerter der *PP* waren die Unterschiede in der Prognose des Risikomodells nicht signifikant.

## Ergebnisse

Tabelle 26: Datentabelle der Kaplan-Meier-Analyse des RFS zwischen Hoch- und Niedrigrisikopatienten; eingeteilt nach gewähltem Risikoscore

	Risikogruppe	Anzahl Gesamt	Anzahl Ereignisse (Metastasierung)	Anzahl Zensiert	p-Wert (Log-Rank)
<b>Risikoscores aller Areale</b>	niedrig	25	7	18	0,004
	hoch	35	23	12	
<b>Modalwert Risikoscore</b>	niedrig	7	1	6	0,018
	hoch	13	9	4	
<b>Maximalwert Risikoscore</b>	niedrig	5	1	4	0,124
	hoch	15	9	6	
<b>Mittelwert Risikoscore</b>	niedrig	8	2	6	0,088
	Hoch	12	8	4	

Tabelle 27: Cox-Regressionsanalyse des RFS in Abhängigkeit von der Risikogruppe und verwendetem Risikoscore/PP-Wert

Faktor: Hoch-/Niedrigrisikopatienten	p-Wert	Hazard Ratio (95 % CI)
Risikoscores aller Areale	0,009	3,08 (1,32 – 7,21)
Modalwert Risikoscore	0,049	8,06 (1,01 – 64,59)
Maximalwert Risikoscore	0,167	4,31 (0,54 – 34,23)
Mittelwert Risikoscore	0,117	3,48 (0,73 – 16,52)

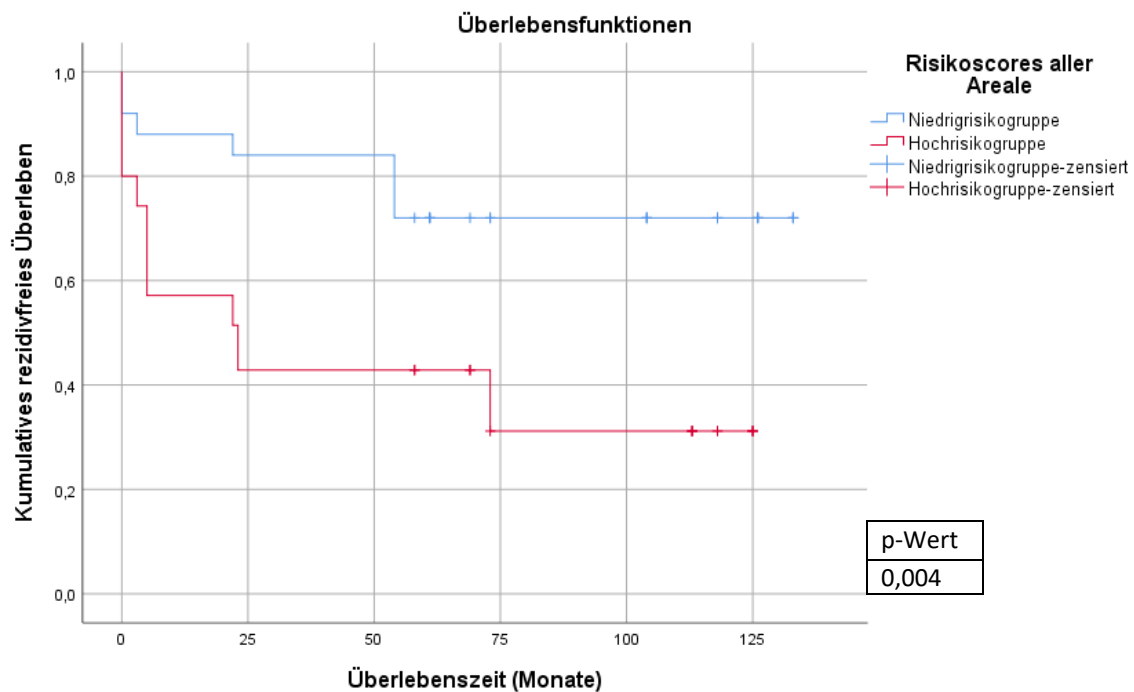


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven des RFS der Risikogruppen; berechnet aus der PP-Werten aller Areale



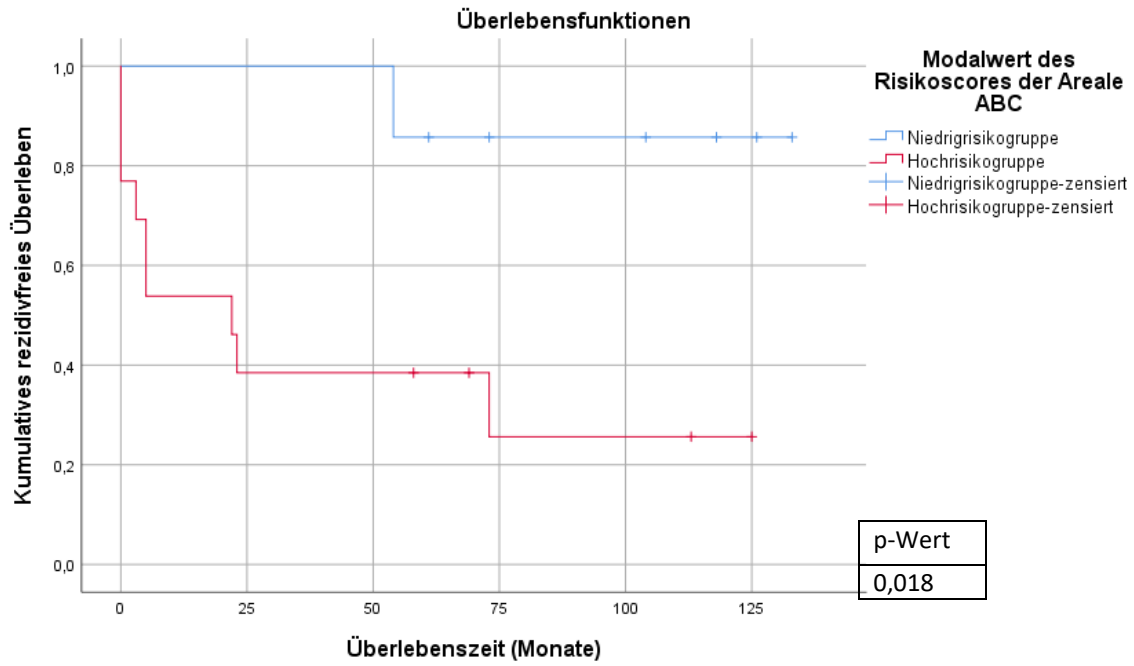


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurven des RFS der Risikogruppen; berechnet aus den PP-Modalwerten der Areale A, B und C eines Patienten

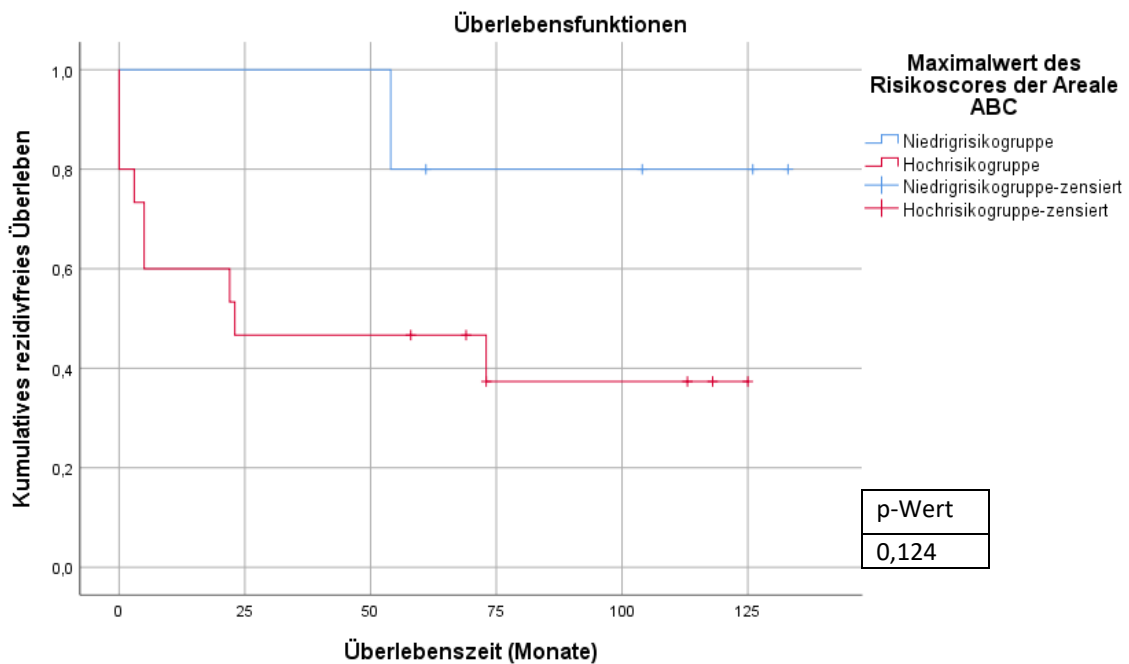


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurven des RFS der Risikogruppen; berechnet aus den PP-Maximalwerten der Areale A, B und C eines Patienten

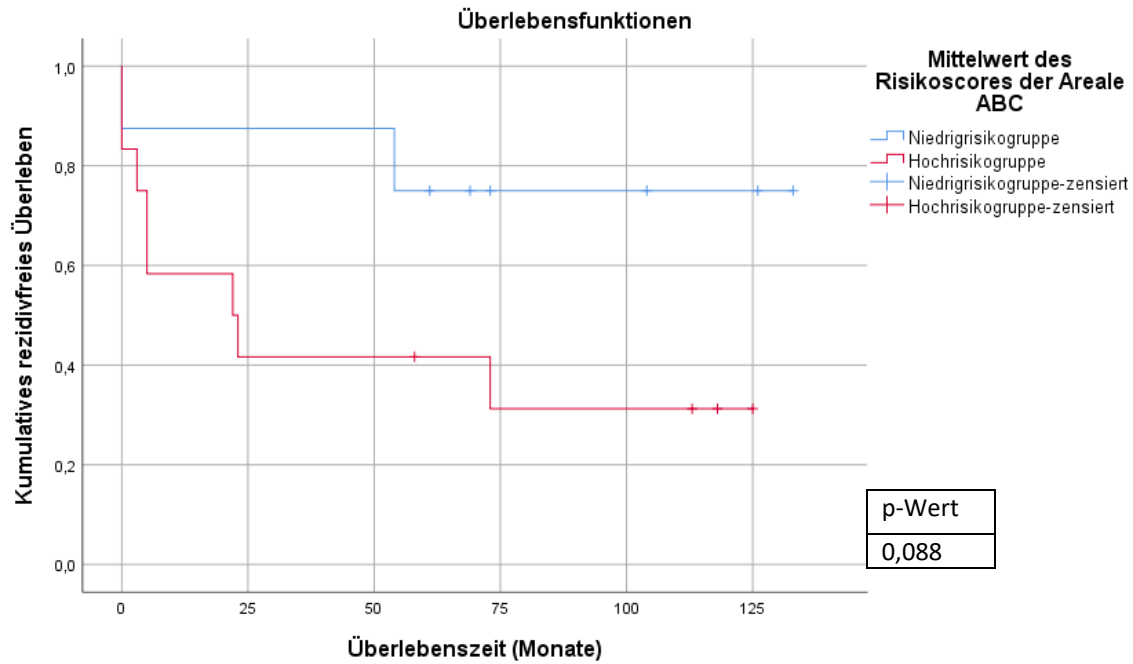


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurven des RFS der Risikogruppen; berechnet aus den PP-Mittelwerten der Areale A, B und C eines Patienten

#### 4.6.3 Overall Survival

In den Überlebenskurven der Abbildung 22 bis Abbildung 25 wird das OS zwischen der Hoch- und der Niedrigrisikogruppe verglichen. Wie in den Abschnitten zuvor wurde erneut ein Modalwert, ein Mittelwert als auch der Maximalwert aus den drei Tumorarealen eines Patienten zur Berechnung der *PP* verwendet. Tabelle 28 fasst die Unterschiede im OS, die sich daraus ergeben, zusammen. Wurde für jedes der 60 Tumorareale das Prognosemodell eigenständig angewandt, so ergab sich ein signifikanter Unterschied im OS zwischen den Niedrig- und den Hochrisikotumoren von 0,010 im Log-Rank-Test. Wurde pro Patienten nur ein *PP*-Wert (Modalwert, Mittelwert oder Maximalwert) zur Beurteilung seiner Risikogruppe verwendet, so zeigte sich lediglich bei Verwendung des Modalwerts signifikante Unterschiede im OS ( $p = 0,043$ ). Der maximale *PP*-Wert war dem Mittelwert der *PP* in der Prognose des OS überlegen. Die Cox-Regressionsanalyse war nur bei Betrachtung aller *PP*-Werte signifikant ( $p = 0,021$ ). Das Hazard Ratio betrug 4,3 (95 % KI: 1,24 – 14,87) in der Hochrisikogruppe.

## Ergebnisse

Tabelle 28: Datentabelle der Kaplan-Meier-Analyse des OS der Hoch- und Niedrigrisikopatienten; eingeteilt nach gewähltem Risikoscore

	Risikogruppe	Anzahl Gesamt	Anzahl Ereignisse (Tod)	Anzahl Zensiert	p-Wert (Log-Rank)
Risikoscores aller Areale	niedrig	25	3	22	0,010
	hoch	35	15	20	
Modalwert Risikoscore	niedrig	7	0	7	0,043
	hoch	13	6	7	
Maximalwert Risikoscore	niedrig	5	0	5	0,118
	hoch	15	6	9	
Mittelwert Risikoscore	niedrig	8	1	7	0,161
	Hoch	12	5	7	

Tabelle 29: Cox-Regressionsanalyse des OS in Abhängigkeit von der Risikogruppe und verwendetem Risikoscore/PP-Wert

Faktor: Hoch-/Niedrigrisikopatienten	p-Wert	Hazard Ratio (95 % CI)
Risikoscores aller Areale	0,021	4,30 (1,24 – 14,87)
Modalwert Risikoscore	0,263	47,46 (0,06 – 40,880*10 <sup>3</sup> )
Maximalwert Risikoscore	0,352	34,66 (0,02 – 60,598*10 <sup>3</sup> )
Mittelwert Risikoscore	0,197	4,12 (0,48 – 35,35)

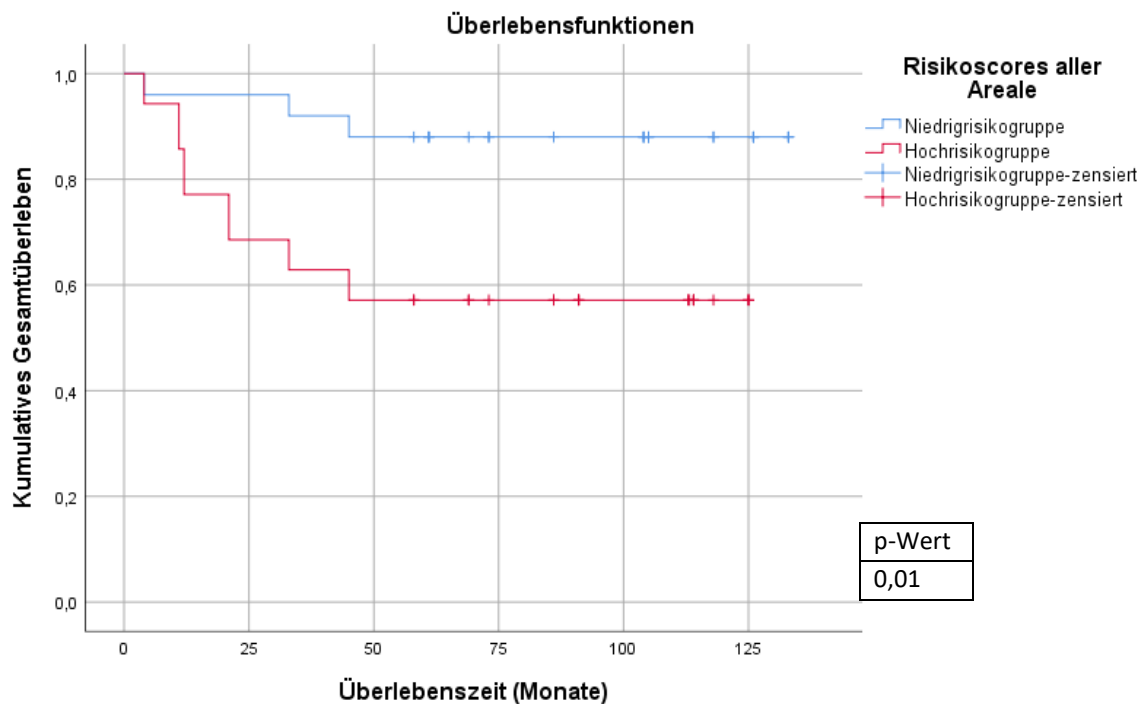


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurven des OS der Risikogruppen; berechnet aus den PP-Werten aller Areale

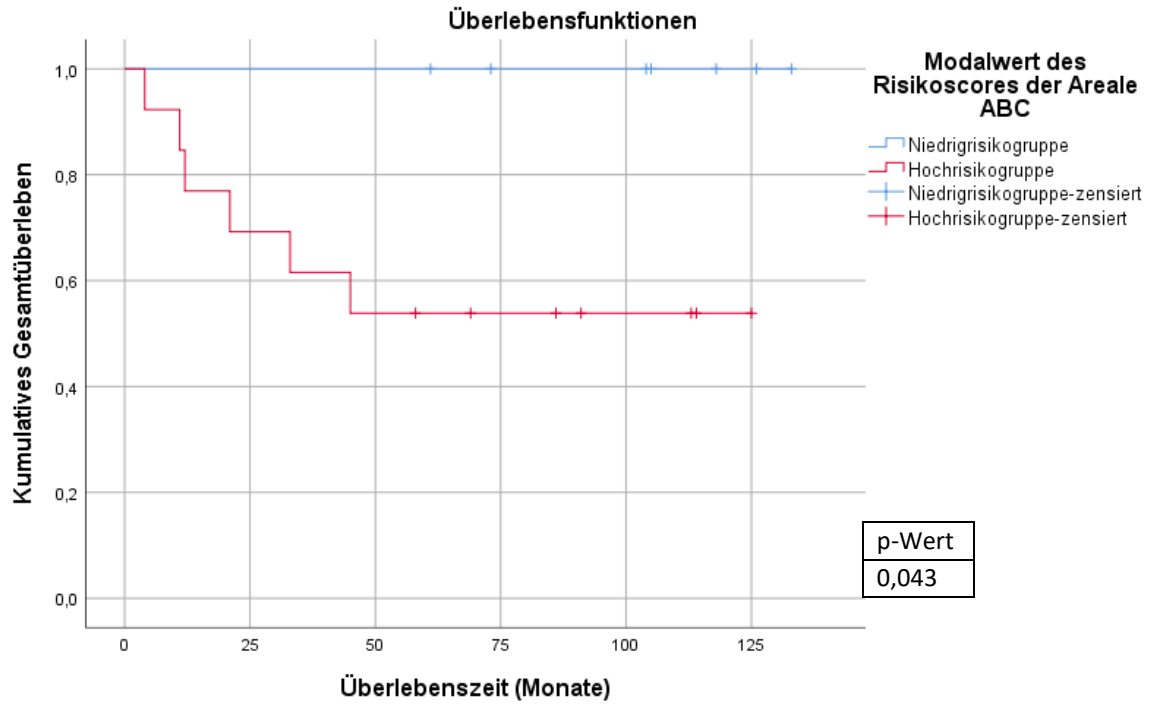


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven des OS der Risikogruppen; berechnet aus den PP-Modalwerten der Areale A, B und C eines Patienten

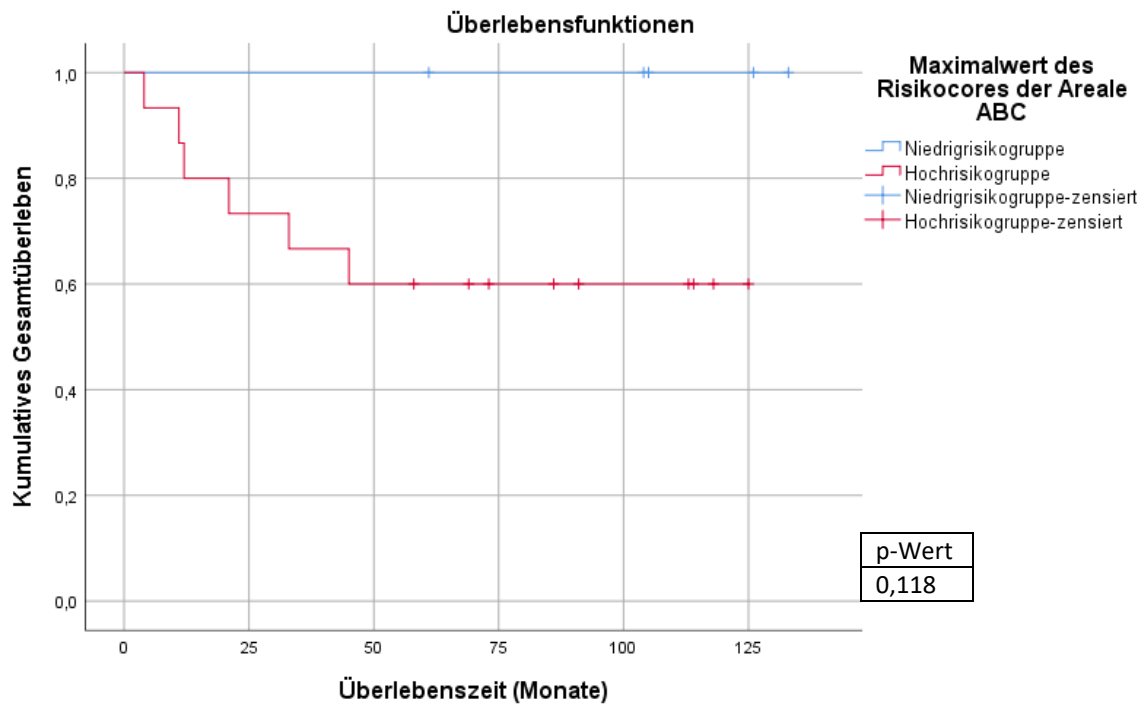


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurven des OS der Risikogruppen; berechnet aus den PP-Maximalwerten der Areale A, B und C eines Patienten

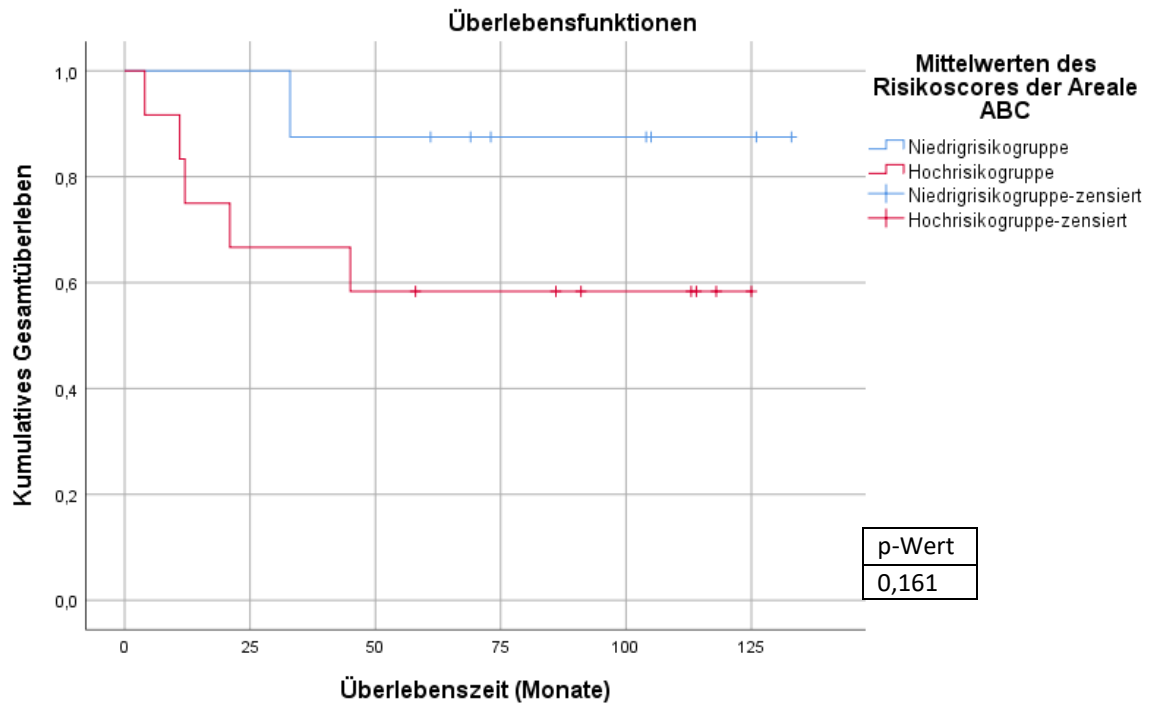


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurven des OS der Risikogruppen; berechnet aus den PP-Mittelwerten der Areale A, B und C eines Patienten

## 5 Diskussion

### 5.1 Intratumorale Heterogenität von Copy Number Variations (CNVs)

Durch die multiregionale Tumorauswertung war in 39 % der Fälle eine ITH der untersuchten CNVs nachweisbar. In dieser grundlegenden Beobachtung stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit den bisherigen Erkenntnissen aus der Literatur überein. Das TRACERx Renal Konsortium veröffentlichte die bisher größte Studie zur Erfassung der ITH beim kNZK mit 101 Patienten und 1206 dazugehörigen Tumorproben. Die Autoren gaben in Ihrer Arbeit einen Medianen ITH-Index von 1 an, was bedeutet, dass der Anteil heterogen auftretender Mutationen und CNVs in ihrer Kohorte 50 % betrug. (Turajlic et al., 2018b) Auch andere Autoren versuchten, die ITH im kNZK durch multiregionale Tumorproben zu erfassen. So bezifferten Gerlinger und Kollegen (2014) die heterogene Verteilung von CNVs ebenfalls auf 41 % (57 von 140 Tumorproben) in ihren Analysen. Auch Martinez et al. (2013) konnten nur 40 % der chromosomalen Aberrationen eines kNZK in allen Tumorarealen nachweisen. Auch wenn die beobachteten Werte für die genetische Heterogenität in den genannten Arbeiten sehr ähnlich scheinen, so sind deren Ergebnisse aus vielerlei Hinsicht nur schwer miteinander vergleichbar. Zum einen schlossen die beiden letztgenannten Studien nur 10 bzw. 8 Patienten in ihre Untersuchungen mit ein. Ebenso variierte die Menge des Untersuchungsmaterials stark, von 3 bis hin zu 75 untersuchten Tumorarealen pro Patienten. Zudem beinhaltete das Untersuchungsmaterial oft zusätzlich Metastasengewebe. In den hier untersuchten Patienten wurden ausschließlich Anteile des Primärtumors verwendet. Außerdem war das Spektrum der erfassten CNVs in den verschiedenen Arbeiten sehr unterschiedlich. Martinez et al. (2013) verglichen bis zu 44 verschiedene CNVs, wohingegen sich die Untersuchungen Gerlingers und des TRACERx Renal Konsortiums auf 14 CNVs beschränkten. Weiterhin erfassten die drei genannten Arbeiten den Verlust der Region 3p in ihren Daten. Da diese jedoch ubiquitär im kNZK zu finden ist (Mitchell et al., 2018), verzerrt dies zusätzlich den Vergleich der genannten Werte mit dieser Arbeit. In Tabelle 30 werden verschiedene Studien aufgelistet, die sich ebenfalls dem Nachweis von CNVs am kNZK widmeten. Klar zu unterscheiden gilt es dabei zwischen Publikationen, die sich auf Einzeltumorproben (Grimm et al., 2019; Sato et al., 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013; Beroukhim et al., 2009) beschränkten und Arbeiten, wie der vorliegenden, die multilokuläre Tumorproben (Gerlinger et al., 2014a; Turajlic et al., 2018b) zum Nachweis von CNVs nutzten.

*Tabelle 30: Relative Patienten- und Arealprävalenzen der in dieser Arbeit untersuchten CNVs im Vergleich mit anderen Arbeiten zum kNZK*

CNV		1q21.3	7q36.3	9p21.3	20q11.21q12
Vorliegende Arbeit multiregional	Patientenprävalenz (n = 20)	70 %	60 %	55 %	75 %
	Arealprävalenz (60 Tumorproben)	52 %	37 %	40 %	55 %

(Grimm et al., 2019) Einzelproben	Patientenprävalenz (n = 200)	33 %	34 %	56 %	37 %
(Turajlic et al., 2018b) multiregional	Patientenprävalenz (n = 101; 1206 Tumorproben)	-	-	60 %	-
(Gerlinger et al., 2014a) multiregional	Patientenprävalenz (n = 10)	-	-	60 %	-
	Arealprävalenz (61 Tumorproben)	-	-	18 %	-
(The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013) Einzelproben	Patientenprävalenz (n = 417)	-	-	32 %	-
(Sato et al., 2013) Einzelproben	Patientenprävalenz (n = 240)	-	41 %	15 %	-
(Beroukhir et al., 2009) Einzelproben	Patientenprävalenz (n = 90)	-	-	29 %	-

Dabei fällt auf, dass die Prävalenzen der CNVs in der hier gezeigten Arbeit tendenziell höher sind, als in vergleichbaren, auf Einzeltumorproben basierenden Studien. Dieser Sachverhalt lässt sich durch die multiregionale Auswertung von mehreren Tumorarealen erklären. So war die Prävalenz, eine CNV in mindestens einem Tumorareal nachzuweisen (=Patientenprävalenz), mit 65 % (52/80) deutlich höher als die Prävalenz der CNVs in allen Tumorarealen (=Arealprävalenz) mit nur 45,8 % (110/240). Dies scheint auch der Grund, weshalb die ebenfalls multilokulären Tumoranalysen von Gerlinger et al. (2014a) und Turajlic et al. (2018b) dieser Arbeit in ihren hohen Patientenprävalenzen der gemeinsam untersuchten Aberration in 9p21.3 gleichen. Die Arbeitsgruppe von Turajlic et al., die ihre Ergebnisse ebenfalls den hier erwähnten Arbeiten gegenüberstellte, konnten noch für eine Vielzahl weiterer Mutationen und CNVs höhere Patientenprävalenzen als Arealprävalenzen feststellen. Die Autoren argumentierten, dass ein multiregionaler Untersuchungsansatz für die vollständige Erfassung des genetischen Potentials eines Karzinoms unerlässlich sei. Dies würde auch erklären, weshalb die Arealprävalenzen der vorliegenden Arbeit deutlich stärker den Patientenprävalenzen aus den Studien mit nur einem untersuchten Tumorareal gleichen. Obwohl Gerlinger et al. und Turajlic et al. im Schnitt zwei- bis viermal mehr Tumorproben pro Patienten auswerteten, ließ sich die Prävalenz der Aberration 9p21.3 nicht merklich steigern (vgl. Tabelle 30). Dies unterstreicht die wichtige Rolle des 9p Verlustes für das kNZK, da er sich scheinbar, wenn vorhanden, auch in einem Großteil aller Tumoranteile nachweisen lässt und so ein wesentliches Merkmal für die Tumorgenese darstellt. Als Beleg dafür finden sich in der Literatur zahlreiche Nachweise, die einen Zusammenhang zwischen einem 9p21 Verlust und der damit verbundenen Tendenz zur Metastasierung im kNZK zeigen (El-Mokadem et al., 2014; La Rochelle et al., 2010; Brunelli et al., 2008).

Für die doch bestehenden Unterschiede in der Prävalenz der einzelnen Aberrationen ist zu vermuten, dass bei der Analyse von sehr vielen Tumorarealen auch Bereiche aus der Peripherie des Tumors

ausgewertet werden, die nicht alle genetischen Veränderungen tragen. Zudem sind die Studien aus Tabelle 30 sehr heterogen in den klinischen Daten ihrer Kohorten. Insbesondere der Anteil der M0 bzw. M1 Patienten ist ein entscheidender Faktor in der Prävalenz der untersuchten Aberrationen. Außerdem besitzt jede Untersuchungsmethode eine begrenzte Sensitivität. Durch die Versuchswiederholung entsteht folglich auch eine Streuung der Ergebnisse im Rahmen der Messungenauigkeit.

## 5.2 Die FISH als Methode zur Untersuchung der intratumorale Heterogenität

Die in dieser Arbeit verwendete Interphase-FISH findet ein breites Anwendungsspektrum in der molekularen Diagnostik (Sugita and Hasegawa, 2017; Savic and Bubendorf, 2007; Wolman, 1997). Ein großer Vorteil der auf FFPE Gewebe angewandten FISH ist die damit verbundene räumliche Auflösung. Von jedem Tumorblock können Übersichtspräparate angefertigt werden, um die Gewebehistologie zu bestimmen. Dabei lassen sich diejenigen Areale, die für die Untersuchungen am besten geeignet sind, vorab selektieren. Ein klarer Kritikpunkt an der vorliegenden Arbeit ist, dass dieser methodische Vorteil der FISH nicht vollkommen ausgenutzt wurde. Durch die zufällige Auswahl der Tumorareale A, B und C war eine spätere Zuordnung von zentralen bzw. peripheren Tumorabschnitten nicht mehr nachvollziehbar. Dies hätte womöglich noch zusätzliche Aussagen zur räumlichen Verteilung der ITH erlaubt. Eine dreidimensionale Rekonstruktion der Tumorerogenität wurde bereits erfolgreich beim Kolonkarzinom durchgeführt (Mamlouk et al., 2017). Als zusätzlicher Schwachpunkt der vorliegenden Studie kann betrachtet werden, dass kein separates Grading der einzelnen Tumorabschnitte erfolgte. Das Grading hätte dadurch ebenfalls im Zusammenhang mit der genetischen Heterogenität betrachtet werden können.

Ein weiterer Vorteil der FISH ist deren hohe Sensitivität, die ermöglicht, CNVs auch in einem nur geringen Anteil der Zellen zu detektieren. Durch die separate Auswertung von 100 Zellkernen, wie in dieser Arbeit, wird ein Teil der vorhandenen ITH bereits erfasst. Grundlage für diese Aussage sind die Ergebnisse einer Studie, die genetische Heterogenität beim kNZK auf dem Level der Einzelzellsequenzierung nachweisen konnten (Xu et al., 2012). Ein Nach- bzw. Vorteil der FISH ist, dass für jede CNV sowie für jede Gewebeart spezielle Cut-off-Werte bestimmt werden müssen. (Junker et al., 2013; Tibiletti, 2004, 2007). Beim vorliegenden kNZK wurden diese Grenzwerte an Tumorzellen, die eine Aberration zeigen müssen, um für die Metastasierung relevant zu sein, ebenfalls in Vorarbeiten ermittelt. So wurde je nach chromosomaler Region dieser Anteil an Zellen mit Aberration zwischen 15 und 25 % festgelegt (Grimm et al., 2019). So kann eine Aberration mit der FISH, selbst bei heterogener Verteilung, bei Erreichen des Cut-off-Wertes als solche erkannt werden. Die vorliegende Arbeit ergab eine durchschnittliche Streuung von 12,21 Aberrationen (pro 100 Zellen) zwischen den drei ausgewerteten Tumorarealen. Dies zeigt einerseits, wie sensitiv chromosomale Zugewinne und Verluste auf dem Einzelzellniveau durch die FISH detektiert werden können. Gleichzeitig ist diese geringe Streuung ein



Hinweis auf die Robustheit der Methode, Aberrationen mittels FISH für ein Prognosemodell zu bestimmen und dabei der Heterogenität gerecht zu werden.

Dabei gib es mehrere mögliche Ansätze, die Genauigkeit der FISH noch weiter zu erhöhen bzw. eine womöglich heterogene Aberration besser zu erfassen. Zum einen kann, wie im vorliegenden Versuchsaufbau, die Auswertung mehrerer Tumorareale erfolgen. Denkbar ist zudem die Verwendung von „Cut-off-Bereichen“: Ist die Anzahl der gezählten Aberrationen z.B. in einem Grenzbereich nahe dem Cut-off-Wert, so kann die Zahl der auszuwertenden Zellen erweitert oder ein zusätzliches Tumorareal untersucht werden. Da das Tumorgrading ebenfalls eine große ITH zeigen kann (Ball et al., 2015), sollte bei bereits mikroskopisch heterogen imponierenden kNZK eine routinemäßige Auswertung verschiedener Tumorareale erfolgen. Sehr ähnliche Ansätze, um der ITH zu begegnen, wurden bereits bei der Erfassung von HER2-positiven Mammakarzinomen verwendet. Hier wird eine ITH dann festgestellt, wenn der Anteil der Zellen mit amplifizierter *HER2*-Genregion in der FISH zwischen 5 und 50 % beträgt (Vance et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit, um mit Tumoren in diesem Grenzbereich umzugehen, ist eine Ausweitung des Probenmaterials (Öhlschlegel et al., 2010).

In den zuvor genannten Vergleichsarbeiten zur ITH des kNZK kamen vorwiegend Verfahren der Next-Generation Sequenzierung zum Einsatz. Diese Methode weist jedoch besonders bei der Untersuchung der ITH Nachteile auf. Wie erst kürzlich gezeigt werden konnte, ist auch bei einer hohen Sequenzierungstiefe der Anteil falsch positiver Ergebnisse nicht zu vernachlässigen, was zu einer Überbewertung der ITH führen kann (Shi et al., 2018). Um dies zu vermeiden, schlagen die Autoren insbesondere eine gezielte Untersuchung von relevanten CNVs und Driver-Mutationen vor.

### 5.3 Anzahl der Tumorproben und Trefferquote

Wie bereits erwähnt sehen viel Autoren die Entwicklung von genetischen Prognosemarkern auf Grund der ITH als problematisch an (Turajlic et al., 2018a; Lubbock et al., 2017; Martinez et al., 2013; Gerlinger et al., 2014a; Gulati et al., 2014). Sie argumentieren, dass eventuelle Biomarker durch Einzelproben nur unzureichend erfasst werden. Um diese Aussage auch statistisch zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit Wahrscheinlichkeitsrechnungen angewandt. Dabei betrug die Wahrscheinlichkeit, unter Einbeziehung der genetischen Heterogenität eine chromosomale Aberration mit nur einer Tumorprobe korrekt zu erkennen, zwischen 61 % (+7q36) und 74 % (+20q12). Ebenso wurde, wie bereits in der Arbeit von Sankin et al. (2014) beschrieben, die Trefferwahrscheinlichkeit bei steigender Probenzahl mittels Binomialverteilung geschätzt. Mit dem in dieser Arbeit gewählten Versuchsaufbau von drei parallelen Tumorproben ließen sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 94 bis 98 % alle relevanten Aberrationen korrekt ermitteln. Die besonders wichtige Identifizierung von Hochrisikopatienten gelang zu 78 % mit nur einer Tumorprobe und stieg bei der Diagnostik von drei Tumorarealen auf 99 % an. Somit ist statistisch gesehen bei ca. vier von fünf Patienten ein einzelnes Tumorareal ausreichend, um deren Risikogruppe korrekt zu bestimmen.

Sankin und Kollegen (2014) legten in ihrer Veröffentlichung ebenfalls den Fokus auf die Erfassung der ITH von vier prognostisch relevanten genetischen Veränderungen. Auch hier konnte eine Trefferwahrscheinlichkeit von über 90 % bei der Untersuchung von drei Arealen eines kNZK erreicht werden. Eine der Mutationen im *BAP1*-Gen war dabei in nur 13 % des gesamten Untersuchungsmaterials nachweisbar. Dies zeigt eindrücklich, dass selbst Mutationen mit sehr niedriger Prävalenz noch mit hoher Wahrscheinlichkeit durch drei Tumorproben erkannt werden.

Die Erkenntnisse über die ausgeprägte ITH beim kNZK stammen vornehmlich aus Arbeiten mit dem Ziel, die phylogenetische Evolution eines Karzinoms mit all seinen Subklonen zu rekonstruieren. Daher wurde in diesen Studien eine deutlich größere Probenmenge benötigt, um die genetische Vielfalt eines Tumors abzubilden. So konnten Gerlinger und Kollegen in einigen kNZK sogar eine fehlende Sättigung der ITH bei steigender Probenzahl nachweisen (Gerlinger et al., 2014a). Auch in der TRACERx Renal Studie benötigten die Autoren bis zu 8 Biopsien, um nur 75 % der Mutationen eines Tumors vollständig zu erfassen (Turajlic et al., 2018b). Jedoch beschränkte sich deren Diagnostik nicht auf einige wenige CNVs, sondern auf ein umfangreiches Panel an Driver-Mutationen und CNVs. Doch auch hier geben die Autoren an, dass in einer Subgruppe von Tumoren mit kleiner Größe bereits zwei Gewebeproben ausreichen, um einen Großteil aller Mutationen zu erfassen.

#### 5.4 Intratumorale Heterogenität und Tumorgroße

Die Beobachtung, in kleineren Tumoren eine geringere ITH vorzufinden, deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen dieser Arbeit. So stieg bei Zunahme der Tumorgroße um 1 cm die ITH um 4,1 Prozentpunkte an ( $r = 0,581$  nach Pearson,  $p = 0,007$ ). Ebenso untersuchte die Arbeitsgruppe um Ueno (2018) das Ausmaß der ITH bei kleinen ( $\leq 4$  cm) und großen ( $\geq 7$ cm) kNZK. Auch hier war die heterogene Verteilung von 15 untersuchten CNVs in der Kategorie der großen Tumoren signifikant erhöht. Eine Erklärung für die positive Korrelation von ITH und Tumorgroße könnte durch das Modell der parallelen Entwicklung gegeben werden. Da die genetische Vielfalt im Laufe der Tumorevolution stetig zunimmt, wächst mit der Tumorgroße auch die Anzahl der gleichzeitig nachweisbaren Subklone. Die genetische Diversität trägt zudem zur Anpassungsfähigkeit eines Tumors bei. Damit lässt sich auch eine Assoziation zur vermehrten Metastasierung bei hoher ITH und somit auch großen Tumoren herstellen (Marusyk and Polyak, 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass jede zusätzliche Driver-Mutation die Zellteilungsrate eines Tumors erhöht und so das Wachstum fördert. (Gerlinger et al., 2014b; Reiter et al., 2013) Eine hohe ITH kann somit sowohl Voraussetzung als auch Ergebnis großer Tumoren sein.

Wie diese Daten zeigen, scheint die ITH besonders in fortgeschrittenen Tumorstadien an Bedeutung zu gewinnen. Jedoch hat gerade die Subgruppe der kleinen Nierentumoren, in der Literatur meist als Small Renal Mass (SRM)  $\leq 4$  cm bezeichnet, im klinischen Alltag eine immer größere Relevanz. Durch die Zunahme abdomineller Bildgebungen in der Routinediagnostik stieg auch der Anteil der im frühen T1

Stadium diagnostizierten Nierentumoren auf ca. 60 % (Kane et al., 2008; Chow et al., 1999). Mit einer mittleren Tumorgröße von 7 cm der Karzinome dieser Arbeit weicht diese deutlich von der durchschnittlichen Größe des NZK von 4,2 bis 5,0 cm zum Zeitpunkt der Nephrektomie ab (Dabestani et al., 2018; Bhindi et al., 2017; Umbreit et al., 2012). Auch die TRACERx Renal Kohorte umfasste vornehmlich große Tumoren (Mittelwert 8,2 cm). Ebenso in den beiden Arbeiten von Gerlinger et al. (2014a) und Martinez et al. (2013) zur ITH des kNZK waren keine T1 Tumoren enthalten. Zu erklären ist diese Stichprobenverzerrung wahrscheinlich mit dem multiregionalen Untersuchungsansatz, der eine ausreichende Tumorgröße verlangt. In Anbetracht dieser Daten hat die ITH im klinischen Alltag, gemessen an der durchschnittlichen Tumorgröße des kNZK, eine geringere Bedeutung. Große Untersuchungen, die sich auf die Heterogenität von T1 Tumoren fokussieren, fehlen leider bisher.

Gerade jedoch für kleine Nierentumore sollten die Auswirkungen der ITH einschätzbar sein, um dringend benötigte genetische Prognosemarker entwickeln zu können. Mit synchronen Metastasierungs-raten von 7 % und weiteren 16 % für eine metachrone Metastasierung besitzen die SRMs ein nicht zu vernachlässigendes Risiko, das mit klinischen Prognosemodellen nur unzureichend erfasst wird (Klatte et al., 2008). Bewährte Hilfsmittel wie der Leibovich-Score ziehen vor allem das Tumorstadium bzw. die Tumorgröße als wichtigste Prognosefaktoren heran. Gerade jedoch der Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Metastasierungstendenz ist bei Nierentumoren  $\leq 4$  cm umstritten. Dadurch ist die Tumorgröße innerhalb der Gruppe der SRMs kein geeignetes Mittel, um das Risiko eines Krankheitsprogresses adäquat einzuschätzen. (Lughezzani et al., 2009; Klatte et al., 2008; Leibovich et al., 2003) Um die Problematik von kleinen renalen Läsionen im klinischen Management zu lösen, werden daher molekulare Marker mit folgenden Fähigkeiten benötigt: i) Unterstützung bei der Bestimmung des histologischen Subtyps, ii) Erkennen von aggressiven Krankheitsverläufen und iii) benignen Läsionen (Sanchez et al., 2018). Als wichtiges Werkzeug zur Erfüllung dieser Aufgaben könnte die FISH genutzt werden (Junker et al., 2013). Durch die Kombination von FISH-Protokollen mit der Tumorhistologie ließen sich bereits benigne Läsionen und verschiedene Subtypen des NZK mit hoher Genauigkeit voneinander unterscheiden (Gowrishankar et al., 2014; Sanjmyatav et al., 2013, 2005; Wunderlich et al., 2005). Zudem kann mit Hilfe der FISH das hier verwendete Prognosemodell aus genetischem Score (TNSA) und T-Kategorie bestimmt werden. Dieses Risikomodell konnte bereits seine prognostische Wertigkeit unter Beweis stellen. Dabei war dieses dem lediglich aus klinischen Daten bestehendem Leibovich-Score überlegen. (Grimm et al., 2019) Durch die Kombination von klinischen und molekularen Markern ließe sich insbesondere die schwierige Prognosebewertung von potentiell metachron metastasierten kNZK erheblich verbessern. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen außerdem, dass CNVs trotz ihrer potentiell heterogenen Verteilung zu einem hohen Prozentsatz mit nur einer Tumorprobe identifiziert werden können.

Außerdem denkbar wäre die klinische Anwendung des genetischen Prognosemodells als präoperative Entscheidungshilfe. Die Durchführung mehrerer ultraschallgesteuerter Biopsien aus sehr kleinen Tumoren ( $\leq 4$  cm) stellt wie bereits gezeigt keine technischen Probleme dar. Auch die anschließende

Untersuchung des Probenmaterials mittels FISH konnte erfolgreich demonstriert werden (Chyhai et al., 2010). So könnten die gewonnenen Informationen in der Behandlung von SRMs bei alten und multimorbiden Patienten genutzt werden. Hier werden bereits Methoden der Active Surveillance erfolgreich eingesetzt, um Patienten eine belastende Tumornephrektomie zu ersparen (Jewett et al., 2011). Mit Hilfe von genetischen Prognosemarkern ließe sich deren Behandlung noch weiter verbessern und konservative Therapiemodelle ausweiten. Voraussetzung für diesen Untersuchungsansatz ist jedoch, dass die genetischen Veränderungen, die für eine spätere Metastasierung nötig sind, bereits in der frühen Tumorevolution nachweisbar sind. Darauf deuten genetische Untersuchungen hin, die Primärtumoren mit ihren Metastasen vergleichen. Zwischen diesen beiden Tumorstadien konnte ein enges evolutionäres Verhältnis und nur ein geringer Anteil unterschiedlicher Driver-Mutationen festgestellt werden. (Turajlic et al., 2018a)

### 5.5 Intratumorale Heterogenität und Krankheitsprogress

Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der Heterogenität zwischen den vier chromosomalen Sonden ( $p = 0,348$ ). Jedoch war bei Tumoren mit einer erhöhten ITH eine starke Assoziation zur Metastasierung gegeben ( $p = 0,007$ ). Dadurch ließ sich zwischen Patienten mit niedriger und hoher Heterogenität ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben darstellen (Log-Rank-Test:  $p = 0,012$ ). Das Hazard Ratio stieg bei hoher Heterogenität im univariaten Cox-Regressionsmodell um das 9,56-Fache (95 % KI: 1,11–82,44). Bei Abgleich mit der T-Kategorie und dem Tumorgrad blieb die ITH jedoch kein unabhängiger Prognosefaktor des OS ( $p = 0,065$ ). Auch die TRACERx Renal Studie dient unter anderem dazu, die Zusammenhänge zwischen ITH und Krankheitsprogress zu beschreiben. In ihren bisherigen Ergebnissen stellten die Wissenschaftler ebenfalls ein signifikant erniedrigtes PFS bei Tumoren mit hoher ITH fest. In ihrer ursprünglichen Kohorte blieb diese Signifikanz jedoch im multivariaten Modell nicht erhalten. Zudem identifizierten die Autoren in einer Subgruppe des kNZK eine besonders hohe Anzahl an CNVs. Diese Subgruppe zeichnete sich vornehmlich durch rasches Tumorwachstum aus. (Turajlic et al., 2018b)

Die Beobachtung, dass ITH in Form chromosomaler Instabilität mit einem progressiven Tumorwachstum verbunden ist, wurde bei einer Vielzahl verschiedener Tumore gemacht (Fisher et al., 2013; McGranahan et al., 2012; Birkbak et al., 2011; Roylance et al., 2011). Im Falle des präkanzerösen Barrett-Ösophagus war die ITH sogar ein unabhängiger Risikofaktor für einen Krankheitsprogress (Maley et al., 2006). Morris et al. (2016) untersuchten in einer Studie mit über 3000 Tumoren unterschiedlichster Karzinomtypen die ITH in Form des Shannon Index für Biodiversität. Auch hier korrelierte die ITH als unabhängiger Prognosefaktor mit einem erniedrigtem OS. Eine mögliche Erklärung hierfür wird darin gesehen, dass ein bestimmtes Maß an ITH als „Treibstoff“ für die Karzinogenese und Metastasierung zu dienen scheint. Vermutlich kann ein Tumor, der aus vielen Subklonen besteht, aus einem größeren genetischen Pool auf die Selektion einwirken und so sein

Wachstum und die Metastasierung vorantreiben (Marusyk and Polyak, 2010). Morris und Kollegen (2016) postulierten eine vermehrte genetische Heterogenität auch als mögliches Resultat der Anpassung des Tumors an seine Mikroumwelt und an das Immunsystem. In ihrer Studie war unter den verschiedenen Tumorarten die Heterogenität beim kNZK besonders stark ausgeprägt. Wie die neuesten Ergebnisse zur Tumorevolution von Mitchell et al. (2018) zeigen, kann gerade beim kNZK die Entwicklung von der ersten Stammmutation bis zum evidenten Tumor Jahrzehnte in Anspruch nehmen. Dadurch könnte besonders das kNZK durch seine lange Entwicklungsphase anfällig für ein genetisch Vielfältiges und somit heterogenes Wachstum sein.

## 5.6 Validierung des Prognosemodells

Neben der Untersuchung der Heterogenität sollte in diesem Patientenkollektiv auch die prognostische Wertigkeit der TNSA beurteilt werden. Durch die Einteilung in eine Hoch- und eine Niedrigrisikogruppe konnte das Prognosemodell aus TNSA und T-Stadium signifikante Unterschiede im RFS und OS zwischen beiden Risikogruppen feststellen (Log-Rank-Test:  $p = 0,004$  bzw.  $p = 0,01$ ). Die Metastasierung des Tumors wurde mit einer Sensitivität von 77 % und einer Spezifität von 60 % vorhergesagt. Für diese Auswertung wurde zunächst jedes Tumorareal unabhängig voneinander betrachtet.

Jedoch führte die parallele Analyse von drei Tumorarealen in 85 % der Fälle zu heterogenen TNSA-Werten. Dies wiederum bewirkte bei 40 % der Patienten eine gleichzeitige Klassifizierung in die Hoch- und Niedrigrisikogruppe. Um mit den unterschiedlichen TNSA-Werten eines Patienten umzugehen, wurden mehrere mögliche Ansätze verfolgt. Dabei war der Modalwert des Risikoscores aus den Tumorarealen A, B und C allen weiteren Kombinationen in seiner Prognose überlegen. Dadurch ließ sich die Sensitivität des Risikomodells, eine Metastasierung vorherzusagen, auf 90 % steigern. Die Spezifität blieb unverändert bei 60 %. Weiterhin lieferte der Modalwert des Risikoscores die beste Unterscheidung der Patienten bezogen auf das RFS und OS (log-Rank-Test:  $p = 0,018$  bzw.  $p = 0,043$ ). Dies zeigt, dass das Prognosemodell selbst in einer sehr kleinen Kohorte von nur 20 Patienten Risikopatienten mit hoher Sensitivität identifiziert. Zugleich konnte die Sensitivität durch die gleichzeitige Auswertung von drei Tumorarealen um 13 Prozentpunkte gesteigert werden. Dies kann mit der erhöhten Trefferwahrscheinlichkeit für die Identifikation eines aufgrund der ITH zuvor unerkannten Hochrisikoareals erklärt werden. Die gesteigerte Sensitivität spricht für die multiregionale Tumorauswertung in der klinischen Praxis. Auch wenn diese mit einem Verlust der Testspezifität einhergeht, sollte die Identifizierung von Hochrisikopatienten im Vordergrund stehen, um solche gegebenenfalls einer erweiterten Therapie oder Kontrolle unterziehen zu können.

Auch andere Autoren untersuchten bereits die Auswirkungen der ITH beim kNZK auf molekulare Prognosemarker. So berichtete die Arbeitsgruppe von Gulati (2014) über einer sehr großen Heterogenität bei der Untersuchung eines auf 110 Genen basierenden Biomarkers, der das kNZK in einen

ccA bzw. ccB Subtyp einteilt (Brannon et al., 2010). Sie gaben an, dass nur zwei von insgesamt zehn untersuchten kNZK in allen Arealen einen homogenen ccA/ccB Subtyp besitzen. In ihrer Arbeit fand jedoch keine Erwähnung, dass sich die heterogenen Anteile innerhalb eines Tumors stets in der Minderheit befanden. Durchschnittlich waren 80 % der Tumorareale in ihrem ccA/ccB Subtyp identisch, wobei bemerkenswerterweise bis zu sieben Tumorproben pro Patient ausgewertet wurden. Dies bedeutet, dass sich die vorherrschende Subgruppe eines Tumors mit einer einzelnen Tumorprobe bereits zu 80 % bestimmen lässt. Dieselben Autoren konnten zugleich in einer größeren Kohorte von 350 Patienten den ccA/ccB Subtyp durch unilokuläre Tumorproben als unabhängigen Prognosefaktor bestätigen. Diese Beobachtung spricht dafür, dass einzelne, von der Haupttumormasse heterogene Areale für die Prognose eines Tumors nicht entscheidend sind. Multilokuläre Tumorproben sind demzufolge nicht unbedingt nötig, könnten aber die prognostische Wertigkeit eines Biomarkers verbessern. Auch in dieser Arbeit führte nicht das Areal mit der schlechtesten Prognose bzw. der maximalen TNSA, sondern der Modalwert der TNSA zur besten Vorhersage. Dies könnte erklären, weshalb der auf Einzelproben basierende Prognosescore, der dieser Arbeit zugrunde liegt, bereits mit sehr hoher Genauigkeit eine Metastasierung vorhersagen konnte (Grimm et al., 2019). Durch einen Multiprobenansatz würde sich dessen Genauigkeit, wie in dieser Arbeit gezeigt, womöglich noch weiter verbessern. Jedoch scheint die Auswahl eines repräsentativen Tumorareals wichtiger, als die Analyse einer möglichst hohen Anzahl von Tumorproben. Diese Aussage stützt sich auf die Erkenntnis, dass Driver-Mutationen vermehrt in Tumorarealen mit dem höchsten Grading vorzufinden sind (Callea et al., 2015). Daher sollten sich auch genetische Analysen auf diese Tumorbereiche konzentrieren (Eckel-Passow et al., 2017).

Serie et al. (2017) verglichen, um genau dieser Frage nachzugehen, Tumorareale mit identischem Grading und konnten dabei ein sehr geringes Ausmaß der ITH feststellen. Durch den multiregionalen Untersuchungsansatz einiger Studien zur ITH, mit z.T. extensiver Anzahl von mehr als 20 Tumorproben je Patient, muss dies zwangsweise zu einer Auswertung weniger relevanter Tumorareale und so zu einer fehlinterpretierten ITH führen. So kann argumentiert werden, dass ein umfangreiches Tumorgrading Voraussetzung für eine erfolgreiche genetische Untersuchung ist. Da ein korrektes Tumorgrading bereits bei transkutanen Nierenbiopsien Schwierigkeiten bereitet, erscheint besonders hier ein Multiprobenansatz sinnvoll (Patel et al., 2016; Ball et al., 2015; Abel et al., 2010).

## 6 Schlussfolgerungen

Wie bereits vielfach in der Literatur beschrieben, konnte auch in dieser Arbeit eine genetische ITH beim kNZK festgestellt werden. Die Untersuchungen konzentrierten sich dabei auf die prognostisch relevanten CNVs der chromosomalen Regionen (+) 1q21.3, (+) 7q36.3, (-) 9p21.3p24.1 und (+) 20q11.21q13.32. Durch die multiregionale Auswertung von Primärtumoren mittels FISH-Protokollen fanden sich in 39 % des Probenmaterials räumlich heterogen verteilte Aberrationen.

Diese Heterogenität besitzt insofern klinische Relevanz, da sie das Prognosemodell aus TNSA und T-Kategorie in 40 % der Kohorte durch uneinheitliche Risikogruppen beeinflusst. Diese Tatsache muss in der weiteren Entwicklung eines genetischen Prognosemodells, das auf den genannten CNVs beruht, berücksichtigt werden.

Jedoch zeigen die Daten dieser Arbeit auch, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 78 % eine einzelne Tumorprobe ausreicht, um einen potentiellen Risikopatienten zu identifizieren. Die Wahrscheinlichkeit ließ sich durch die Auswertung von drei Tumorarealen weiter auf 99 % steigern. Diese Beobachtung spricht für die FISH als sensitive Methode, um selbst heterogen verteilte CNVs in einem Tumor festzustellen. Ebenso zeigt sich dadurch die TNSA als robuster genetischer Marker, was deren bisherige Wertigkeit in der Krankheitsprognose des kNZK in Einzelprobenstudien unterstreicht.

Des Weiteren konnte die Sensitivität des Prognosemodells durch die multiregionale Tumorauswertung auf 90 % gesteigert werden. Dabei lieferte der Modalwert der TNSA aus drei Arealen die prognostisch besten Resultate. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei einer multiregionalen Tumorauswertung nicht jede vorhandene Aberration relevant ist, sondern vielmehr der im Tumor vorherrschende Subklon. Die Tumorgröße korrelierte weiterhin positiv mit der ITH. Ebenfalls fand sich in metastasierten Tumoren eine überdurchschnittlich hohe Heterogenität. In Assoziation dazu war bei Patienten mit sehr heterogenen Tumoren das Gesamtüberleben signifikant erniedrigt. Diese Beobachtungen decken sich mit einer Vielzahl von Studien bezüglich der ITH in verschiedenen Tumorentitäten. Dadurch könnte die ITH selbst als prognostisch relevante Größe Einfluss auf den Krankheitsprogress eines Patienten besitzen. Da bisher noch keine einheitliche Beschreibung der ITH gefunden wurde, wird es Aufgabe zukünftiger Arbeiten sein, reproduzierbare Maßstäbe für die ITH zu finden, um diese in eine besser vergleichbare Größe zu fassen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine multiregionale Tumorauswertung besonders bei großen Tumoren zu bevorzugen ist, da diese auch eine größere ITH zeigen. Außerdem sollte Tumormaterial, das durch Biopsien gewonnen wurde auf Grund der vorhandenen Heterogenität kritisch betrachtet werden, da scheinbar nicht alle Tumorareale für genetische Analysen repräsentativ sind.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abel, E.J., Culp, S.H., Matin, S., Tamboli, P., Wallace, M.J., Jonasch, E., Tannir, N.M., and Wood, C.G. (2010). Percutaneous biopsy of primary tumor in metastatic renal cell carcinoma to predict high risk pathological features: comparison with nephrectomy assessment. *J. Urol.* *184*, 1877–1881.
- 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.
- Adeniran, A.J., Shuch, B., and Humphrey, P.A. (2015). Hereditary Renal Cell Carcinoma Syndromes: Clinical, Pathologic, and Genetic Features. *Am. J. Surg. Pathol.* *39*, e1–e18.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A.J.R., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* *500*, 415–421.
- Alexandrov, L.B., Jones, P.H., Wedge, D.C., Sale, J.E., Campbell, P.J., Nik-Zainal, S., and Stratton, M.R. (2015). Clock-like mutational processes in human somatic cells. *Nat. Genet.* *47*, 1402–1407.
- Algaba, F., Akaza, H., López-Beltrán, A., Martignoni, G., Moch, H., Montironi, R., and Reuter, V. (2011). Current Pathology Keys of Renal Cell Carcinoma. *Eur. Urol.* *60*, 634–643.
- Alizadeh, A.A., Aranda, V., Bardelli, A., Blanpain, C., Bock, C., Borowski, C., Caldas, C., Califano, A., Doherty, M., Elsnér, M., et al. (2015). Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat. Med.* *21*, 846–853.
- Alt, A.L., Boorjian, S.A., Lohse, C.M., Costello, B.A., Leibovich, B.C., and Blute, M.L. (2011). Survival after complete surgical resection of multiple metastases from renal cell carcinoma. *Cancer* *117*, 2873–2882.
- Anele, U.A., Marchioni, M., Yang, B., Simone, G., Uzzo, R.G., Lau, C., Mir, M.C., Capitanio, U., Porter, J., Jacobsohn, K., et al. (2019). Robotic versus laparoscopic radical nephrectomy: a large multi-institutional analysis (ROSULA Collaborative Group). *World J. Urol.*
- Avery, A.K., Beckstead, J., Renshaw, A.A., and Corless, C.L. (2000). Use of Antibodies to Rcc and Cd10 in the Differential Diagnosis of Renal Neoplasms. *Am. J. Surg. Pathol.* *24*, 203–210.
- Bakshi, N., Kunju, L.P., Giordano, T., and Shah, R.B. (2007). Expression of Renal Cell Carcinoma Antigen (rcc) in Renal Epithelial and Nonrenal Tumors: Diagnostic Implications. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* *15*, 310–315.
- Ball, M.W., Bezerra, S.M., Gorin, M.A., Cowan, M., Pavlovich, C.P., Pierorazio, P.M., Netto, G.J., and Allaf, M.E. (2015). Grade Heterogeneity in Small Renal Masses: Potential Implications for Renal Mass Biopsy. *J. Urol.* *193*, 36–40.
- Bamias, A., Escudier, B., Sternberg, C.N., Zagouri, F., Dellis, A., Djavan, B., Tzannis, K., Kontovinis, L., Stravodimos, K., Papatsoris, A., et al. (2017). Current Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Critical Evaluation. *The Oncologist* *22*, 667–679.
- Barber, L.J., Davies, M.N., and Gerlinger, M. (2015). Dissecting cancer evolution at the macro-heterogeneity and micro-heterogeneity scale. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *30*, 1–6.
- Bekema, H.J., MacLennan, S., Imamura, M., Lam, T.B.L., Stewart, F., Scott, N., MacLennan, G., McClinton, S., Griffiths, T.R.L., Skolarikos, A., et al. (2013). Systematic Review of Adrenalectomy and Lymph Node Dissection in Locally Advanced Renal Cell Carcinoma. *Eur. Urol.* *64*, 799–810.



- 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.
- Beroukhi, R., Brunet, J.-P., Napoli, A.D., 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 von-Hippel Lindau Disease-Associated and Sporadic Clear Cell Carcinoma of the Kidney. *Cancer Res.* *69*, 4674–4681.
- Bhatt, J.R., Jewett, M.A. s, Richard, P.O., Kawaguchi, S., Timilshina, N., Evans, A., Alibhai, S., and Finelli, A. (2016). multilocular Cystic Renal Cell Carcinoma: Pathological T Staging Makes No Difference to Favorable Outcomes and Should be Reclassified. *J. Urol.* *196*, 1350–1354.
- Bhindi, B., Lohse, C.M., Mason, R.J., Westerman, M.E., Cheville, J.C., Tollefson, M.K., Boorjian, S.A., Thompson, R.H., and Leibovich, B.C. (2017). Are We Using the Best Tumor Size Cut-points for Renal Cell Carcinoma Staging? *Urology* *109*, 121–126.
- 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.
- Bihl, S., Ohashi, R., Moore, A.L., Rüschoff, J.H., Beisel, C., Hermanns, T., Mischo, A., Corrà, C., Beyer, J., Beerenwinkel, N., et al. (2019). Expression and Mutation Patterns of PBRM1, BAP1 and SETD2 Mirror Specific Evolutionary Subtypes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Neoplasia* *21*, 247–256.
- Billia, M., Volpe, A., and Terrone, C. (2011). The current TNM staging system of renal cell carcinoma: are further improvements needed? *Arch. Esp. Urol.* *64*, 929–937.
- Birkbak, N.J., Eklund, A.C., Li, Q., McClelland, S.E., Endesfelder, D., Tan, P., Tan, I.B., Richardson, A.L., Szallasi, Z., and Swanton, C. (2011). Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. *Cancer Res.* *71*, 3447–3452.
- Blom, J.H.M., van Poppel, H., Maréchal, J.M., Jacqmin, D., Schröder, F.H., de Prijck, L., and Sylvester, R. (2009). Radical Nephrectomy with and without Lymph-Node Dissection: Final Results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Randomized Phase 3 Trial 30881. *Eur. Urol.* *55*, 28–34.
- Bosetti, C., Bertuccio, P., Chatenoud, L., Negri, E., La Vecchia, C., and Levi, F. (2011). Trends in Mortality From Urologic Cancers in Europe, 1970–2008. *Eur. Urol.* *60*, 1–15.
- 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.
- Brierley, J.D., Gospodarowicz, M.K., and Wittekind, C. (2016). *TNM Classification of Malignant Tumours* (John Wiley & Sons).
- Brooks, S.A., Brannon, A.R., Parker, J.S., Fisher, J.C., Sen, O., Kattan, M.W., Hakimi, A.A., Hsieh, J.J., Choueiri, T.K., Tamboli, P., et al. (2014). ClearCode34: A Prognostic Risk Predictor for Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Eur. Urol.* *66*, 77–84.
- Brüning, T., Pesch, B., Wiesenhütter, B., Rabstein, S., Lammert, M., Baumüller, A., and Bolt, H.M. (2003). Renal cell cancer risk and occupational exposure to trichloroethylene: Results of a consecutive case-control study in Arnsberg, Germany. *Am. J. Ind. Med.* *43*, 274–285.

- Buti, S., Bersanelli, M., Sikokis, A., Maines, F., Facchinetti, F., Bria, E., Ardizzoni, A., Tortora, G., and Massari, F. (2013). Chemotherapy in metastatic renal cell carcinoma today? A systematic review. *Anticancer. Drugs* 24, 535–554.
- Callea, M., Albiges, L., Gupta, M., Cheng, S.-C., Genega, E.M., Fay, A.P., Song, J., Carvo, I., Bhatt, R.S., Atkins, M.B., et al. (2015). Differential expression of PD-L1 between primary and metastatic sites in clear cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol. Res.* 3, 1158–1164.
- 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.
- Cheville, J.C., Lohse, C.M., Zincke, H., Weaver, A.L., and Blute, M.L. (2003). Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 27, 612–624.
- Cho, E., Curhan, G., Hankinson, S.E., Kantoff, P., Atkins, M.B., Stampfer, M., and Choueiri, T.K. (2011). Prospective evaluation of analgesic use and risk of renal cell cancer. *Arch. Intern. Med.* 171, 1487–1493.
- Choueiri, T.K., Je, Y., and Cho, E. (2014). Analgesic use and the risk of kidney cancer: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 134, 384–396.
- Chow, W.-H., Devesa, S.S., Warren, J.L., and Joseph F. Fraumeni, J. (1999). Rising Incidence of Renal Cell Cancer in the United States. *JAMA* 281, 1628–1631.
- Chow, W.H., Gridley, G., Fraumeni, J.F., and Järholm, B. (2000). Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N. Engl. J. Med.* 343, 1305–1311.
- Chow, W.-H., Dong, L.M., and Devesa, S.S. (2010). Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat. Rev. Urol.* 7, 245–257.
- Chyhray, 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.
- Clague, J., Shao, L., Lin, J., Chang, S., Zhu, Y., Wang, W., Wood, C.G., and Wu, X. (2009a). Sensitivity to NNKOA is associated with renal cancer risk. *Carcinogenesis* 30, 706–710.
- Clague, J., Lin, J., Cassidy, A., Matin, S., Tannir, N.M., Tamboli, P., Wood, C.G., and Wu, X. (2009b). 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.
- 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.
- Dabestani, S., Beisland, C., Stewart, G.D., Bensalah, K., Gudmundsson, E., Lam, T.B., Gietzmann, W., Zakikhani, P., Marconi, L., Fernández-Pello, S., et al. (2018). Long-term Outcomes of Follow-up for Initially Localised Clear Cell Renal Cell Carcinoma: RECUR Database Analysis. *Eur. Urol. Focus.*
- 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.

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.

Delahunt, B., Eble, J.N., Egevad, L., and Samaratunga, H. (2019). Grading of renal cell carcinoma. *Histopathology* 74, 4–17.

Dong, C., and Hemminki, K. (2001). Modification of cancer risks in offspring by sibling and parental cancers from 2,112,616 nuclear families. *Int. J. Cancer* 92, 144–150.

EAU Guidelines (2017). EAU Guidelines on Renal Cell Cancer 2017 EAU Guidelines on Renal Cell Cancer 2017 B. Ljungberg (Chair), L. Albiges, K. Bensalah, A. Bex (Vice-chair), R.H. Giles (Patient Advocate), M. Hora, M.A. Kuczyk, T. Lam, L. Marconi, A.S. Merseburger, T. Powles, M. Staehler, A. Volpe Guidelines Associates: S. Dabestani, S. Fernández-Pello Montes, F. Hofmann, R. Tahbaz.

Eble, J.N. (2004). Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs: ... editorial and consensus conference in Lyon, France, December 14 - 18, 2002 (Lyon: IARC Press).

Eckel-Passow, J.E., Serie, D.J., Cheville, J.C., Ho, T.H., Kapur, P., Brugarolas, J., Thompson, R.H., Leibovich, B.C., Kwon, E.D., Joseph, R.W., et al. (2017). BAP1 and PBRM1 in metastatic clear cell renal cell carcinoma: tumor heterogeneity and concordance with paired primary tumor. *BMC Urol.* 17, 19.

Fisher, R., Pusztai, L., and Swanton, C. (2013). Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br. J. Cancer* 108, 479–485.

Fisher, R., Horswell, S., Rowan, A., Salm, M.P., de Bruin, E.C., Gulati, S., McGranahan, N., Stares, M., Gerlinger, M., Varela, I., et al. (2014). Development of synchronous VHL syndrome tumors reveals contingencies and constraints to tumor evolution. *Genome Biol.* 15, 433.

Flanigan Robert C., Mickisch G., Sylvester Richard, Tangen Cathy, Van Poppel H., and Crawford E. David (2004). Cytoreductive Nephrectomy in Patients With Metastatic Renal Cancer: A Combined Analysis. *J. Urol.* 171, 1071–1076.

Forman, D. (2013). Forman D, Bray F, Brewster DH, et al., editors. Cancer incidence in five continents, Vol. X (electronic version). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.

Frew, I.J., and Moch, H. (2015). A Clearer View of the Molecular Complexity of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 10, 263–289.

Gall, J.G., and Pardue, M.L. (1969). Formation and Detection of Rna-Dna Hybrid Molecules in Cytological Preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63, 378–383.

Gaur, S., Turkbey, B., and Choyke, P. (2017). Hereditary Renal Tumor Syndromes: Update on Diagnosis and Management. *Semin. Ultrasound CT MRI* 38, 59–71.

GEKID e.V. (2017). GEKID-Atlas.Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Atlas \_der Krebsinzidenz und –mortalität in Deutschland (GEKID-Atlas). \_Datenlieferung: Juli 2017, Lübeck, 2017. Verfügbar über: <http://www.gekid.de>

Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., et al. (2012). Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med.* 366, 883–892.

- Gerlinger, M., Horswell, S., Larkin, J., Rowan, A.J., Salm, M.P., Varela, I., Fisher, R., McGranahan, N., Matthews, N., Santos, C.R., et al. (2014a). Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat. Genet.* *46*, 225–233.
- Gerlinger, M., McGranahan, N., Dewhurst, S.M., Burrell, R.A., Tomlinson, I., and Swanton, C. (2014b). Cancer: Evolution Within a Lifetime. *Annu. Rev. Genet.* *48*, 215–236.
- Gnarra, J.R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M.H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F.-M., et al. (1994). Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat. Genet.* *7*, 85–90.
- Gossage, L., Eisen, T., and Maher, E.R. (2015). VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 55–64.
- Gould, S.J. (1989). *Wonderful Life: The Burgess Shale and the Nature of History*.
- 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.
- Graham, J., Heng, D.Y.C., Brugarolas, J., and Vaishampayan, U. (2018). Personalized Management of Advanced Kidney Cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 330–341.
- 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.
- Greaves, M. (2015). Evolutionary Determinants of Cancer. *Cancer Discov.* *5*, 806–820.
- Grimm, J., Zeuschner, P., Janssen, M., Wagenpfeil, S., Hartmann, A., Stöhr, C., Keck, B., Kahlmeyer, A., Stöckle, M., and Junker, K. (2019). Metastatic risk stratification of clear cell renal cell carcinoma patients based on genomic aberrations. *Genes. Chromosomes Cancer*.
- 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.
- 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. *Lancet Lond. Engl.* *387*, 2008–2016.
- Hägglström, C., Rapp, K., Stocks, T., Manjer, J., Bjørge, T., Ulmer, H., Engeland, A., Almqvist, M., Concin, H., Selmer, R., et al. (2013). Metabolic Factors Associated with Risk of Renal Cell Carcinoma. *PLoS ONE* *8*.
- Heinzelmann, J., Arndt, M., Pleyers, R., Fehlmann, T., Hoelters, S., Zeuschner, P., Vogt, A., Pryalukhin, A., Schaeffeler, E., Bohle, R.M., et al. (2019). 4-miRNA Score Predicts the Individual Metastatic Risk of Renal Cell Carcinoma Patients. *Ann. Surg. Oncol.* *26*, 3765–3773.
- Hemal, A., Kumar, A., Kumar, R., Wadhwa, P., Seth, A., and Gupta, N. (2007). Laparoscopic Versus Open Radical Nephrectomy for Large Renal Tumors. *J. Urol.* *177*, 862–866.

- Hemminki, K., and Li, X. (2004). Familial renal cell cancer appears to have a recessive component. *J. Med. Genet.* *41*, e58.
- Heng, D.Y., Xie, W., Regan, M.M., Harshman, L.C., Bjarnason, G.A., Vaishampayan, U.N., Mackenzie, M., Wood, L., Donskov, F., Tan, M.-H., et al. (2013). External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *Lancet Oncol.* *14*, 141–148.
- Hu, J., Mao, Y., White, K., and Group, T.C.C.R.E.R. (2002). Renal cell carcinoma and occupational exposure to chemicals in Canada. *Occup. Med.* *52*, 157–164.
- Huang, T., Ding, P., Chen, J., Yan, Y., Zhang, L., Liu, H., Liu, P., Che, J., Zheng, J., and Yao, X. (2014). Dietary fiber intake and risk of renal cell carcinoma: evidence from a meta-analysis. *Med. Oncol.* *31*, 125.
- 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.
- Jehan, Z., and Al-Kuraya, S.U. and K.S. (2012). In-Situ Hybridization as a Molecular Tool in Cancer Diagnosis and Treatment.
- 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.
- 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.
- Kabaria, R., Klaassen, Z., and Terris, M.K. (2016). Renal cell carcinoma: links and risks. *Int. J. Nephrol. Renov. Dis.* *9*, 45–52.
- Kabat, G.C., Silvera, S.A.N., Miller, A.B., and Rohan, T.E. (2007). A cohort study of reproductive and hormonal factors and renal cell cancer risk in women. *Br. J. Cancer* *96*, 845–849.
- Kane, C.J., Mallin, K., Ritchey, J., Cooperberg, M.R., and Carroll, P.R. (2008). Renal cell cancer stage migration: analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer* *113*, 78–83.
- Karakiewicz, P.I., and Hutterer, G.C. (2007). Predicting cancer-control outcomes in patients with renal cell carcinoma. *Curr. Opin. Urol.* *17*, 295.
- Karami, S., Daugherty, S.E., Schwartz, K., Davis, F.G., Ruterbusch, J.J., Wacholder, S., Graubard, B.I., Berndt, S.I., Hofmann, J.N., Purdue, M.P., et al. (2016). Analgesic use and risk of renal cell carcinoma: A case-control, cohort and meta-analytic assessment. *Int. J. Cancer* *139*, 584–592.
- Kavolius, J.P., Mastorakos, D.P., Pavlovich, C., Russo, P., Burt, M.E., and Brady, M.S. (1998). Resection of metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* *16*, 2261–2266.
- Keegan, K.A., Schupp, C.W., Chamie, K., Hellenthal, N.J., Evans, C.P., and Koppie, T.M. (2012). Histopathology in Surgically Treated Renal Cell Carcinoma: Survival Differences by Subtype and Stage. *J. Urol.* *188*, 391–397.
- 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. (2008). Tumor size does not predict risk of metastatic disease or prognosis of small renal cell carcinomas. *J. Urol.* *179*, 1719–1726.

- Klinghoffer, Z., Yang, B., Kapoor, A., and Pinthus, J.H. (2009). Obesity and renal cell carcinoma: epidemiology, underlying mechanisms and management considerations. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 9, 975–987.
- Knudson, A.G. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 820–823.
- Korbel, J.O., and Campbell, P.J. (2013). Criteria for Inference of Chromothripsis in Cancer Genomes. *Cell* 152, 1226–1236.
- Krebsdatenbank Deutschland (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2017.
- Kurban, G., Duplan, E., Ramlal, N., Hudon, V., Sado, Y., Ninomiya, Y., and Pause, A. (2008). Collagen matrix assembly is driven by the interaction of von Hippel–Lindau tumor suppressor protein with hydroxylated collagen IV alpha 2. *Oncogene* 27, 1004–1012.
- Kuznetsova, A.V., Meller, J., Schnell, P.O., Nash, J.A., Ignacak, M.L., Sanchez, Y., Conaway, J.W., Conaway, R.C., and Czyzyk-Krzeska, M.F. (2003). von Hippel–Lindau protein binds hyperphosphorylated large subunit of RNA polymerase II through a proline hydroxylation motif and targets it for ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 2706–2711.
- Lambe, M., Lindblad, P., Wu, J., Remler, R., and Hsieh, C. -c (2002). Pregnancy and risk of renal cell cancer: a population-based study in Sweden. *Br. J. Cancer* 86, 1425–1429.
- Larsson, S.C., and Wolk, A. (2011). Diabetes mellitus and incidence of kidney cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia* 54, 1013–1018.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, 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.
- Lee, S., Nakamura, E., Yang, H., Wei, W., Linggi, M.S., Sajan, M.P., Farese, R.V., Freeman, R.S., Carter, B.D., Kaelin, W.G., et al. (2005). Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: Developmental culling and cancer. *Cancer Cell* 8, 155–167.
- Leibovich, B., Lohse, C., Crispen, P., Boorjian, S., Thompson, H., Blute, M., and Cheville, J. (2010). Histological Subtype is an Independent Predictor of Outcome for Patients With Renal Cell Carcinoma. *J. Urol.* 183, 1309–1315.
- 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.
- 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.
- Levsky, J.M., and Singer, R.H. (2003). Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J. Cell Sci.* 116, 2833–2838.
- Li, P., Znaor, A., Holcatova, I., Fabianova, E., Mates, D., Wozniak, M.B., Ferlay, J., and Scelo, G. (2015). Regional Geographic Variations in Kidney Cancer Incidence Rates in European Countries. *Eur. Urol.* 67, 1134–1141.

- 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.
- Lubbock, A.L.R., Stewart, G.D., O'Mahony, F.C., Laird, A., Mullen, P., O'Donnell, M., Powles, T., Harrison, D.J., and Overton, I.M. (2017). Overcoming intratumoural heterogeneity for reproducible molecular risk stratification: a case study in advanced kidney cancer. *BMC Med.* *15*.
- Lughezzani, G., Jeldres, C., Isbarn, H., Perrotte, P., Shariat, S.F., Sun, M., Widmer, H., Arjane, P., Peloquin, F., Pharand, D., et al. (2009). Tumor size is a determinant of the rate of stage T1 renal cell cancer synchronous metastasis. *J. Urol.* *182*, 1287–1293.
- 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. (2012a). Systematic Review of Oncological Outcomes Following Surgical Management of Localised Renal Cancer. *Eur. Urol.* *61*, 972–993.
- 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. (2012b). Systematic Review of Perioperative and Quality-of-life Outcomes Following Surgical Management of Localised Renal Cancer. *Eur. Urol.* *62*, 1097–1117.
- 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 Vitamin and Lifestyle (VITAL) Study. *J. Urol.* *190*, 1657–1661.
- Maher, E.R., Yates, J.R., and Ferguson-Smith, M.A. (1990). Statistical analysis of the two stage mutation model in von Hippel-Lindau disease, and in sporadic cerebellar haemangioblastoma and renal cell carcinoma. *J. Med. Genet.* *27*, 311–314.
- Maley, C.C., Galipeau, P.C., Finley, J.C., Wongsurawat, V.J., Li, X., Sanchez, C.A., Paulson, T.G., Blount, P.L., Risques, R.-A., Rabinovitch, P.S., et al. (2006). Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nat. Genet.* *38*, 468.
- Mamlouk, S., Childs, L.H., Aust, D., Heim, D., Melching, F., Oliveira, C., Wolf, T., Durek, P., Schumacher, D., Bläker, H., et al. (2017). DNA copy number changes define spatial patterns of heterogeneity in colorectal cancer. *Nat. Commun.* *8*, 14093.
- Mandriota, S.J., Turner, K.J., Davies, D.R., Murray, P.G., Morgan, N.V., Sowter, H.M., Wykoff, C.C., Maher, E.R., Harris, A.L., Ratcliffe, P.J., et al. (2002). HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: Evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell* *1*, 459–468.
- 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.
- Marusyk, A., and Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim. Biophys. Acta* *1805*, 105.
- Matson, M.A., and Cohen, E.P. (1990). Acquired cystic kidney disease: occurrence, prevalence, and renal cancers. *Medicine (Baltimore)* *69*, 217–226.
- 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*, 271–275.

- Mazal, P.R., Stichenwirth, M., Koller, A., Blach, S., Haitel, A., and Susani, M. (2005). Expression of aquaporins and PAX-2 compared to CD10 and cytokeratin 7 in renal neoplasms: a tissue microarray study. *Mod. Pathol.* 18, 535–540.
- McGranahan, N., and Swanton, C. (2017). Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* 168, 613–628.
- McGranahan, N., Burrell, R.A., Endesfelder, D., Novelli, M.R., and Swanton, C. (2012). Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO Rep.* 13, 528–538.
- Méjean, A., Ravaud, A., Thezenas, S., Colas, S., Beauval, J.-B., Bensalah, K., Geoffrois, L., Thiery-Vuillemin, A., Cormier, L., Lang, H., et al. (2018). Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 379, 417–427.
- Mitchell, T.J., Turajlic, S., Rowan, A., Nicol, D., Farmery, J.H.R., O'Brien, T., Martincorena, I., Tarpey, P., Angelopoulos, N., Yates, L.R., et al. (2018). Timing the Landmark Events in the Evolution of Clear Cell Renal Cell Cancer: TRACERx Renal. *Cell* 173, 611–623.e17.
- Moch, H. (2013). An overview of renal cell cancer: Pathology and genetics. *Semin. Cancer Biol.* 23, 3–9.
- Moch, H. (2016). WHO-ISUP-Graduierungssystem für Nierenkarzinome. *Pathol.* 37, 355–360.
- 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.
- Montani, M., Heinimann, K., von Teichman, A., Rudolph, T., Perren, A., and Moch, H. (2010). VHL-gene deletion in single renal tubular epithelial cells and renal tubular cysts: further evidence for a cyst-dependent progression pathway of clear cell renal carcinoma in von Hippel-Lindau disease. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 806–815.
- 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.
- Morris, S.C. (2003). *Life's Solution: Inevitable Humans in a Lonely Universe* (Cambridge University Press).
- Morris, L.G.T., Riaz, N., Desrichard, A., Şenbabaoğlu, Y., Hakimi, A.A., Makarov, V., Reis-Filho, J.S., and Chan, T.A. (2016). Pan-cancer analysis of intratumor heterogeneity as a prognostic determinant of survival. *Oncotarget* 7, 10051–10063.
- Motzer, R.J., and Russo, P. (2018). Cytoreductive Nephrectomy — Patient Selection Is Key. *N. Engl. J. Med.* 379, 481–482.
- Motzer, R.J., Mazumdar, M., Bacik, J., Russo, P., Berg, W.J., and Metz, E.M. (2000). Effect of Cytokine Therapy on Survival for Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 18, 1928–1935.
- Nielsen, S.M., Rhodes, L., Blanco, I., Chung, W.K., Eng, C., Maher, E.R., Richard, S., and Giles, R.H. (2016). Von Hippel-Lindau Disease: Genetics and Role of Genetic Counseling in a Multiple Neoplasia Syndrome. *J. Clin. Oncol.* 34, 2172–2181.
- Öhlschlegel, C., Zahel, K., Kradolfer, D., Hell, M., and Jochum, W. (2010). Intratumorale HER2-Heterogenität des invasiven Mammakarzinoms. *Pathol.* 31, 292–295.



- Orth, S. (2002). Cigarette smoking: an important renal risk factor – far beyond carcinogenesis. *Tob. Induc. Dis.* 1, 137–155.
- Paraf, Chauveau, Chrétien, Richard, Grünfeld, and Droz (2000). Renal lesions in von Hippel–Lindau disease: immunohistochemical expression of nephron differentiation molecules, adhesion molecules and apoptosis proteins. *Histopathology* 36, 457–465.
- Parker, A., Lohse, C., Cheville, J., Leibovich, B., Igel, T., and Blute, M. (2008). Evaluation of the association of current cigarette smoking and outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Int. J. Urol.* 15, 304–308.
- 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 2763–2771.
- 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.
- Peng, B., Zheng, J.H., and Xu (2006). Retroperitoneal laparoscopic nephrectomy and open nephrectomy for radical treatment of renal cell carcinoma: A comparison of clinical outcomes. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2006. 27: p. 1167 - 1169. *Acad. J. Second Mil. Med. Univ.* 1167-1169.
- Prowse, A.H., Webster, A.R., Richards, F.M., Richard, S., Olschwang, S., Resche, F., Affara, N.A., and Maher, E.R. (1997). Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 765–771.
- Ramos, E.M., Hoffman, D., Junkins, H.A., Maglott, D., Phan, L., Sherry, S.T., Feolo, M., and Hindorff, L.A. (2014). Phenotype–Genotype Integrator (PheGenI): synthesizing genome-wide association study (GWAS) data with existing genomic resources. *Eur. J. Hum. Genet.* 22, 144–147.
- 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.
- Reiter, J.G., Bozic, I., Allen, B., Chatterjee, K., and Nowak, M.A. (2013). The effect of one additional driver mutation on tumor progression. *Evol. Appl.* 6, 34–45.
- 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.
- Ridge, C.A., Pua, B.B., and Madoff, D.C. (2014). Epidemiology and Staging of Renal Cell Carcinoma. *Semin. Interv. Radiol.* 31, 3–8.
- 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.
- Roe, J.-S., Kim, H., Lee, S.-M., Kim, S.-T., Cho, E.-J., and Youn, H.-D. (2006). p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol. Cell* 22, 395–405.
- Roylance, R., Endesfelder, D., Gorman, P., Burrell, R.A., Sander, J., Tomlinson, I., Hanby, A.M., Speirs, V., Richardson, A.L., Birkbak, N.J., et al. (2011). Relationship of Extreme Chromosomal Instability with Long-term Survival in a Retrospective Analysis of Primary Breast Cancer. *Cancer*

Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. 20, 2183–2194.

S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom (2020). Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 2.0,2020, AWMF Registernummer: 043/017OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/nierenzellkarzinom/>(Zugriff am: 12.11.2020). 231.

S3 Leitlinien AWMF, DKG, DKH (2017). Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.2, 2017, AWMF Registernummer: 043/017OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Nierenzellkarzinom.85.0.html>.

Sanchez, A., Feldman, A.S., and Hakimi, A.A. (2018). Current Management of Small Renal Masses, Including Patient Selection, Renal Tumor Biopsy, Active Surveillance, and Thermal Ablation. *J. Clin. Oncol.* 36, 3591–3600.

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.

Sanjmyatav, J., Junker, K., Matthes, S., Muehr, M., Sava, D., Sternal, M., Wessendorf, S., Kreuz, M., Gajda, M., Wunderlich, H., et al. (2011). Identification of Genomic Alterations Associated With Metastasis and Cancer Specific Survival in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Urol.* 186, 2078–2083.

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.

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.

Sankin, A., Hakimi, A.A., Mikkilineni, N., Ostrovnya, I., Silk, M.T., Liang, Y., Mano, R., Chevinsky, M., Motzer, R.J., Solomon, S.B., et al. (2014). The impact of genetic heterogeneity on biomarker development in kidney cancer assessed by multiregional sampling. *Cancer Med.* 3, 1485–1492.

Sato, Y., Yoshizato, T., Shiraishi, 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.

Savic, S., and Bubendorf, L. (2007). Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. *Pathol.* 28, 384–392.

Scelo, G., Riazalhosseini, Y., Greger, L., Letourneau, L., González-Porta, M., Wozniak, M.B., Bourgey, M., Harnden, P., Egevad, L., Jackson, S.M., et al. (2014). Variation in genomic landscape of clear cell renal cell carcinoma across Europe. *Nat. Commun.* 5, 5135.

Schaub, T.P., Kartenbeck, J., König, J., Spring, H., Dörsam, J., Staehler, G., Störkel, S., Thon, W.F., and Keppler, D. (1999). Expression of the MRP2 Gene-Encoded Conjugate Export Pump in Human Kidney Proximal Tubules and in Renal Cell Carcinoma. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1159–1169.

Schröck, E., Manoir, S. du, Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M.A., Ning, Y., Ledbetter, D.H., Bar-Am, I., Soenksen, D., et al. (1996). Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. *Science* 273, 494–497.

- SEER Cancer Statistics Review. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2016/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/), based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2019
- Serie, D.J., Joseph, R.W., Cheville, J.C., Ho, T.H., Parasramka, M., Hilton, T., Thompson, R.H., Leibovich, B.C., Parker, A.S., and Eckel-Passow, J.E. (2017). Clear Cell Type A and B Molecular Subtypes in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Tumor Heterogeneity and Aggressiveness. *Eur. Urol.* 71, 979–985.
- Setiawan, V.W., Stram, D.O., Nomura, A.M.Y., Kolonel, L.N., and Henderson, B.E. (2007). Risk Factors for Renal Cell Cancer: The Multiethnic Cohort. *Am. J. Epidemiol.* 166, 932–940.
- Setiawan, V.W., Kolonel, L.N., and Henderson, B.E. (2009). Menstrual and Reproductive Factors and Risk of Renal Cell Cancer in the Multiethnic Cohort. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* 18, 337–340.
- Shi, W., Ng, C.K.Y., Lim, R.S., Jiang, T., Kumar, S., Li, X., Wali, V.B., Piscuoglio, S., Gerstein, M.B., Chagpar, A.B., et al. (2018). Reliability of Whole-Exome Sequencing for Assessing Intratumor Genetic Heterogeneity. *Cell Rep.* 25, 1446–1457.
- 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.
- Soultati, A., Stares, M., Swanton, C., Larkin, J., and Turajlic, S. (2015). How should clinicians address intratumour heterogeneity in clear cell renal cell carcinoma? *Curr. Opin. Urol.* 25, 358.
- Steffens, S., Janssen, M., Roos, F.C., Becker, F., Schumacher, S., Seidel, C., Wegener, G., Thüroff, J.W., Hofmann, R., Stöckle, M., et al. (2012). Incidence and long-term prognosis of papillary compared to clear cell renal cell carcinoma – A multicentre study. *Eur. J. Cancer* 48, 2347–2352.
- Stephens, P.J., Greenman, C.D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G.R., Mudie, L.J., Pleasance, E.D., Lau, K.W., Beare, D., Stebbings, L.A., et al. (2011). Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell* 144, 27–40.
- Störkel, S. (1999). Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation: Pathologische Subtypisierung und zytogenetische Korrelation. *Urol.* 38, 425–432.
- Sugita, S., and Hasegawa, T. (2017). Practical use and utility of fluorescence in situ hybridization in the pathological diagnosis of soft tissue and bone tumors. *J. Orthop. Sci.* 22, 601–612.
- Suzigan, S., López-Beltrán, A., Montironi, R., Drut, R., Romero, A., Hayashi, T., Gentili, A.L.C., Fonseca, P.S.P., deTorres, I., Billis, A., et al. (2006). Multilocular Cystic Renal Cell Carcinoma: A Report of 45 Cases of a Kidney Tumor of Low Malignant Potential. *Am. J. Clin. Pathol.* 125, 217–222.
- Tait, C., Tandon, S., Baker, L., Goodman, C., Townell, N., and Nabi, G. (2011). Long-term oncologic outcomes of laparoscopic radical nephrectomy for kidney cancer resection: Dundee cohort and metaanalysis of observational studies. *Surg. Endosc.* 25, 3154–3161.
- Teloken, P.E., Thompson, R.H., Tickoo, S.K., Cronin, A., Savage, C., Reuter, V.E., and Russo, P. (2009). PROGNOSTIC IMPACT OF HISTOLOGICAL SUBTYPE IN PATIENTS WITH SURGICALLY TREATED LOCALIZED RENAL CELL CARCINOMA. *J. Urol.* 182, 2132–2136.
- The Cancer Genome Atlas Research Network (2013). Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 499, 43–49.

- Thoma, C.R., Frew, I.J., Hoerner, C.R., Montani, M., Moch, H., and Krek, W. (2007). pVHL and GSK3 $\beta$  are components of a primary cilium-maintenance signalling network. *Nat. Cell Biol.* *9*, 588–595.
- 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.
- Tibiletti, M.G. (2007). Interphase FISH as a new tool in tumor pathology. *Cytogenet. Genome Res.* *118*, 229–236.
- Trask, B.J. (2002). Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 769–778.
- Truong, L.D., Krishnan, B., Cao, J.T.H., Barrios, R., and Suki, W.N. (1995). Renal neoplasm in acquired cystic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* *26*, 1–12.
- Tsvivan, M., Moreira, D.M., Caso, J.R., Mouraviev, V., and Polascik, T.J. (2011). Cigarette Smoking Is Associated With Advanced Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* *29*, 2027–2031.
- Turajlic, S., Xu, H., Litchfield, K., Rowan, A., Chambers, T., Lopez, J.I., Nicol, D., O'Brien, T., Larkin, J., Horswell, S., et al. (2018a). Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. *Cell* *173*, 581-594.e12.
- Turajlic, S., Xu, H., Litchfield, K., Rowan, A., Horswell, S., Chambers, T., O'Brien, T., Lopez, J.I., Watkins, T.B.K., Nicol, D., et al. (2018b). Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell* *173*, 595-610.e11.
- Ueno, D., Xie, Z., Boeke, M., Syed, J., Nguyen, K.A., McGillivray, P., Adeniran, A., Humphrey, P., Dancik, G.M., Kluger, Y., et al. (2018). Genomic Heterogeneity and the Small Renal Mass. *Clin. Cancer Res.* *24*, 4137–4144.
- Umbreit, E.C., Shimko, M.S., Childs, M.A., Lohse, C.M., Cheville, J.C., Leibovich, B.C., Blute, M.L., and Thompson, R.H. (2012). Metastatic potential of a renal mass according to original tumour size at presentation. *BJU Int.* *109*, 190–194.
- Van Poppel, H., Da Pozzo, L., Albrecht, W., Matveev, V., Bono, A., Borkowski, A., Colombel, M., Klotz, L., Skinner, E., Keane, T., et al. (2011). A Prospective, Randomised EORTC Intergroup Phase 3 Study Comparing the Oncologic Outcome of Elective Nephron-Sparing Surgery and Radical Nephrectomy for Low-Stage Renal Cell Carcinoma. *Eur. Urol.* *59*, 543–552.
- Vance, G.H., Barry, T.S., Bloom, K.J., Fitzgibbons, P.L., Hicks, D.G., Jenkins, R.B., Persons, D.L., Tubbs, R.R., Hammond, M.E.H., and College of American Pathologists (2009). Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *133*, 611–612.
- Warren, A.Y., and Harrison, D. (2018). WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World J. Urol.* *36*, 1913–1926.
- Washio, M., Mori, M., Mikami, K., Miki, T., Watanabe, Y., Nakao, M., Kubo, T., Suzuki, K., Ozasa, K., Wakai, K., et al. (2014). Risk factors for renal cell carcinoma in a Japanese population. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* *15*, 9065–9070.
- 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.

- Welford, S.M., Dorie, M.J., Li, X., Haase, V.H., and Giaccia, A.J. (2010). Renal Oxygenation Suppresses VHL Loss-Induced Senescence That Is Caused by Increased Sensitivity to Oxidative Stress. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 4595–4603.
- Williamson, S.R., Taneja, K., and Cheng, L. (2019). Renal cell carcinoma staging: pitfalls, challenges, and updates. *Histopathology* *74*, 18–30.
- Wolman, S.R. (1997). Applications of fluorescence in situ hybridization techniques in cytopathology. *Cancer Cytopathol.* *81*, 193–197.
- Wunderlich, H., Hindermann, W., Al Mustafa, A.M., Reichelt, O., Junker, K., and Schubert, J. (2005). The accuracy of 250 fine needle biopsies of renal tumors. *J. Urol.* *174*, 44–46.
- Xu, X., Hou, Y., Yin, X., Bao, L., Tang, A., Song, L., Li, F., Tsang, S., Wu, K., Wu, H., et al. (2012). Single-Cell Exome Sequencing Reveals Single-Nucleotide Mutation Characteristics of a Kidney Tumor. *Cell* *148*, 886–895.
- Xu, X., Zhu, Y., Zheng, X., and Xie, L. (2015). Does beer, wine or liquor consumption correlate with the risk of renal cell carcinoma? A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget* *6*, 13347–13358.
- Young, A.P., Schlisio, S., Minamishima, Y.A., Zhang, Q., Li, L., Grisanzio, C., Signoretti, S., and Kaelin Jr, W.G. (2008). VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat. Cell Biol.* *10*, 361–369.
- Zhang, L., Wu, B., Zha, Z., Zhao, H., and Feng, Y. (2018). The prognostic value and clinicopathological features of sarcomatoid differentiation in patients with renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Manag. Res.* *10*, 1687–1703.
- Zhao, J., and Zhao, L. (2013). Cruciferous Vegetables Intake Is Associated with Lower Risk of Renal Cell Carcinoma: Evidence from a Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE* *8*.
- Zhu, Y., Horikawa, Y., Yang, H., Wood, C.G., Habuchi, T., and Wu, X. (2008). BPDE-Induced Lymphocytic Chromosome 3p Deletions May Predict Renal Cell Carcinoma Risk. *J. Urol.* *179*, 2416–2421.
- Zucchetto, A., Dal Maso, L., Tavani, A., Montella, M., Ramazzotti, V., Talamini, R., Canzonieri, V., Garbeglio, A., Negri, E., Franceschi, S., et al. (2007). History of treated hypertension and diabetes mellitus and risk of renal cell cancer. *Ann. Oncol.* *18*, 596–600.

## 8 Lebenslauf

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

## 9 Danksagung

Ein herzliches Dankeschön gilt allen, die mich bei der Erarbeitung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. Kerstin Junker für die Überlassung des Themas und die umfassende, kompetente Betreuung bei der experimentellen Arbeit, der Auswertung und Interpretation der Daten sowie der Erstellung des Manuskripts.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. Julia Grimm für die engagierte Betreuung, die zahlreichen Anregungen sowie die sehr geduldige Einarbeitung.

Die vorliegende Arbeit wurde im Forschungslabor der Urologie des Universitätsklinikums Homburg angefertigt. Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Mitarbeitern für die Unterstützung und freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken.

Zudem gilt mein Dank Frau Dipl.-Stat. G. Wagenpfeil vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik bei der Hilfestellung und Beratung zur statistischen Auswertung meiner Doktorarbeit.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Freundin Larissa, die mich durch zahlreiche Korrekturen und mit ihren aufbauenden Worten zu jeder Zeit in der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt hat.

Zum Abschluss möchte ich außerdem meiner Familie danken, die durch ihren Rückhalt und stetige Motivation zum Gelingen dieser Arbeit und dem erfolgreichen Abschluss meines Studiums beigetragen haben.