



AUS DEM INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. ANDREAS ERBERSDOBBLER

ARBEIT UNTER ANLEITUNG VON: PD DR. MED. HABIL. ANNETTE ZIMPFER

ALTERATIONEN DES SWITCH-SUCROSE-WEGS ALS MÖGLICHER DEDIFFERENZIERUNGSMECHANISMUS IN KLARZELLIGEN NIERENZELLKARZINOMEN

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

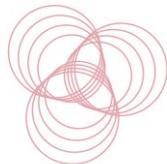
VORGELEGT VON

JOHANNA MARIE ZOLL | GEB. AM 27.09.1996 IN CRIVITZ

AUS ROSTOCK

ROSTOCK | 22.02.2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004098



ERSTGUTACHTER: PD DR. MED. HABIL. ANNETTE ZIMPFER, INSTITUT FÜR PATHOLOGIE,
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: PD DR. MATTHIAS MARUSCHKE, INSTITUT FÜR UROLOGIE, HELIOS
HANSEKLINIKUM, STRALSUND

DRITTGUTACHTER: UNIV.-PROF. DR. MED. DR. NAT. MED. NADINE GAISA, INSTITUT FÜR
PATHOLOGIE, UNIKLINIK RWTH AACHEN

JAHR DER EINREICHUNG: 2022

JAHR DER VERTEIDIGUNG: 2022

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

BILDVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
I. EINLEITUNG	1
1.1 EPIDEMIOLOGIE DES NIERENZELLKARZINOMS.....	1
1.2 KLINIK.....	2
1.3 PATHOLOGISCHE DIAGNOSE UND TNM-KLASSIFIKATION	2
1.4 HERKUNFT UND GENETISCHE ABERRATIONEN IN KLARZELLIGEN NZK	6
1.5 DER SWITCH/SUCROSE-CHROMATIN-REMODELLIERUNGSKOMPLEX	7
1.5.1 SMARCB1	9
1.5.2 SMARCA4 UND SMARCA2.....	10
1.5.3 ARID1A	10
1.5.4 SMARCC1 UND SMARCC2.....	10
1.5.5 BAF180	11
1.6 THERAPIEANSÄTZE BEIM NIERENZELLKARZINOM.....	12
II. AUFGABE UND ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	15
2.1 ZIELE DER ARBEIT	15
2.2 STUDIENAUFBAU	15
III. MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 ERSTELLUNG DER DATENBANK	16
3.2 TISSUE MIKROARRAYS (TMA).....	18
3.2.1 PRINZIP DER TMA.....	18
3.2.2 ERSTELLUNG DER TMA.....	19
3.3 IMMUNHISTOCHEMIE.....	20
3.3.1 PRINZIP DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN TECHNIK.....	20
3.3.2 DURCHFÜHRUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNG	20
3.4 VHL FLUORESZENZ-IN-SITU HYBRIDISIERUNG	22
3.4.1 PRINZIP DER VHL FLUORESZENZ-IN-SITU HYBRIDISIERUNG	22
3.4.2 DURCHFÜHRUNG DER VHL FLUORESZENZ-IN-SITU HYBRIDISIERUNG	22

INHALTSVERZEICHNIS

3.5	SMARCB1-MUTATIONSANALYSE.....	23
3.5.1	PRINZIP DER SANGER-SEQUENZIERUNG.....	23
3.5.2	DURCHFÜHRUNG DER SANGER-SEQUENZIERUNG ZUR SMARCB1-MUTATIONSANALYSE..	23
3.6	DATENVERARBEITUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	27
IV.	RESULTATE.....	29
4.1	PATIENT:INNEN- UND TUMORDATEN – KLINISCHE UND PATHOLOGISCHE DATEN	29
4.2	MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG UND IMMUNHISTOCHEMISCHE UND ZYTOGENETISCHE DIAGNOSEVALIDIERUNG	32
4.3	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DES SWI/SNF-KOMPLEXES	34
4.3.1	SMARCB1	37
4.3.2	SMARCA2 UND SMARCA4	39
4.3.3	BAF180	40
4.4	MUTATIONSANALYSEN – AUSWERTUNG.....	42
4.5	ÜBERLEBENSANALYSEN	45
V.	DISKUSSION.....	57
5.1	ERGEBNISDISKUSSION	57
5.1.1	PATIENT:INNEN- UND TUMORDATEN – KLINISCHE DATEN	57
5.1.2	VHL-FISH UND IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR DIAGNOSEVALIDIERUNG	58
5.1.3	SWI/SNF-KOMPLEX ALTERATIONEN IN KLARZELLIGEN NIERENZELLKARZINOMEN	58
5.1.4	MUTATIONSANALYSEN.....	61
5.1.5	ÜBERLEBENSANALYSEN	62
5.2	METHODENDISKUSSION.....	65
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	68
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	70
VIII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77
IX.	HERSTELLERANGABEN ZU VERWENDETEN REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTEN .	80
X.	THESEN PAPER	82
XI.	LEBENSLAUF	83

INHALTSVERZEICHNIS

XII.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	84
XIII.	DANKSAGUNG.....	85

BILDVERZEICHNIS

ABB. 1: G1-2 KLARZELLIGES NIERENZELLKARZINOM (20X, HÄMATOXILLIN-EOSIN), QUELLE: AUS DEM PROBENEINGANG DES INSTITUTS FÜR PATHOLOGIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK	4
ABB. 2: G2 KLARZELLIGES NIERENZELLKARZINOM (20X, HÄMATOXILLIN-EOSIN), QUELLE: AUS DEM PROBENEINGANG DES INSTITUTS FÜR PATHOLOGIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK	4
ABB. 3: G3 KLARZELLIGES NIERENZELLKARZINOM (20X, HÄMATOXILLIN-EOSIN), QUELLE: AUS DEM PROBENEINGANG DES INSTITUTS FÜR PATHOLOGIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK	5
ABB. 4: G4 KLARZELLIGES NIERENZELLKARZINOM (20X, HÄMATOXILLIN-EOSIN), QUELLE: AUS DEM PROBENEINGANG DES INSTITUTS FÜR PATHOLOGIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK	5
ABB. 5: DIE UNTERSCHIEDLICHEN ZUSAMMENSENZUNGEN DES SWI/SNF-KOMPLEXES ALS BAF-, PBAF- ODER NCBAF-KOMPLEX MIT IHREN UNTEREINHEITEN, MODIFIZIERT NACH (WANG ET AL. 2020, S. 469), IN DER TABELLE AUFSCHLÜSSELUNG NACH ART DER UNTEREINHEITEN	9
ABB. 6: DIFFERENTIELLE TARGET-THERAPIE IN ABHÄNGIGKEITEN DER TUMORBIOLOGIE IN NZK, ABBILDUNG MODIFIZIERT NACH (HAMMERSCHMIED ET AL. 2008, S. 359)	13
ABB. 7: DARSTELLUNG DES METHODISCHEN VORGEHENS DER AUSWAHL DER STUDIENFÄLLE	17
ABB. 8: BEISPIEL FÜR DIE HERSTELLUNG EINES TMA AUS: (NOCITO ET AL. 2001, S. 2)	18
ABB. 9: SÄMTLICHE TMA-BLÖCKE DER NIERENZELLKARZINOM-STUDIE.....	18
ABB. 10: BEISPIELBILD EINES TMA, QUELLE: AUS DEM PROBENEINGANG DES INSTITUTS FÜR PATHOLOGIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK	19
ABB. 11: DARSTELLUNG EINER ANTIGEN-ANTIKÖRPER-REAKTION AUS: (LANG 2006, S. 272)	20
ABB. 12: KLARZELLIGES NIERENZELLKARZIOM MIT VHL-DELETION, (100X, STUDIENFALL)	23
ABB. 13: ELEKTROPHEROGRAMM-DARSTELLUNG IN DER SEQSCAPE SOFTWARE 2.7 EINES KZNZK MIT SMARCB1-MUTATION	27
ABB. 14: AUFTREten EINER NIEDRIGGRADIGEN KOMPONENTE	30
ABB. 15: VERTEILUNG DER T-STADIEN	31
ABB. 17: ÜBERLEBEN ABHÄNGIG VOM PROTEINVERLUST IN HOCHGRADIGEN KOMPONENTEN.....	45
ABB. 18: PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN ABHÄNGIG VOM PROTEINVERLUST	46
ABB. 19: ÜBERLEBEN ABHÄNGIG VOM ALTER.....	47
ABB. 20: GESAMTÜBERLEBEN ABHÄNGIG VON EINER SARKOMATOÏDEN UND/ODER RHABDOÏDEN KOMPONENTE	48
ABB. 21: ÜBERLEBEN ABHÄNGIG VON EINER FERNMETASTASE	49
ABB. 22: PROGRESSIONSFREIE MONATE NACH ART DER TT	50

BILDVERZEICHNIS

ABB. 23: PROGRESSIONSFREIE MONATE IN ABHÄNGIGKEIT DER TT 51

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

TAB. 1: KOMPONENTEN DES SWI/SNF-KOMPLEXES UND DEREN EIGENSCHAFTEN	11
TAB. 2: VERWENDETE ANTIKÖRPER UND DIE JEWELIGEN PROTOKOLLE	21
TAB. 3: AUSWERTEMODALITÄTEN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN MARKER	21
TAB. 4: VERWENDETE PRIMER.....	25
TAB. 5: VERWENDETE DATENBANKEN.....	27
TAB. 6: KLINISCH-PATHOLOGISCHE DATEN.....	29
TAB. 7: KORRELATIONSANALYSEN: TUMORGRAD MIT VERSCHIEDENEN PARAMETERN	32
TAB. 8: KORRELATIONSANALYSEN: UNDIFFERENZIERTE KOMPONENTE MIT VERSCHIEDENEN PARAMETERN	33
TAB. 9: HÄUFIGKEIT DES KOMPLETTEN UND PARTIALEN SWI/SNF-PROTEINVERLUSTS MIT BEISPIELHAFTEN ABBILDUNGEN.....	34
TAB. 10: KOMPLETT- UND PARTIALVERLUSTE DER EINZELNEN SWI/SNF-KOMPLEX-PROTEINE ...	35
TAB. 11: VERGLEICH NIEDRIG- UND HOCHGRADIGE MORPHOLOGIE BEZÜGLICH DER SWI/SNF- KOMPLEX-PROTEINVERLUSTE.....	36
TAB. 12: ZUSAMMENGEFASSTE ERGEBNISSE DER KORRELATIONSANALYSEN: SWI/SNF- KOMPLEX-PROTEINVERLUST IN BEZUG ZU KLINISCH-PATHOLOGISCHEN PARAMETERN....	37
TAB. 13: SMARCB1 IN BEZUG ZUM TUMORGRAD	37
TAB. 14: SMARCB1 IN BEZUG ZU EINER DEDIFFERENZIERUNG	38
TAB. 15: SMARCB1 IN BEZUG ZUM PT-STADIUM	38
TAB. 16: SMARCB1 IN BEZUG ZUR ANGIOINVASION	39
TAB. 17: SMARCA2 IN BEZUG ZU SMARCA4	39
TAB. 18: SMARCA4 IN BEZUG ZU EINER DEDIFFERENZIERUNG	40
TAB. 19: BAF180 IN BEZUG ZUM TUMORGRAD	40
TAB. 20: BAF180 AUFGESCHLÜSSELT NACH PT-STADIEN.....	40
TAB. 21: BAF180 IN BEZUG ZUR SARKOMATOÏDEN UND/ODER RABDOÏDEN KOMPONENTE.....	41
TAB. 22: ÜBERSICHT ÜBER DIE ERGEBNISSE DER KORRELATIONSANALYSEN AUFGESCHLÜSSELT NACH DEN EINZELNEN PROTEINEN.....	41
TAB. 23: MUTATIONEN UND VERWENDETE DATENBANKEN UND DEREN AUSSAGEN.....	43
TAB. 24: MUTATION IN BEZUG ZUM TUMORGRAD	43
TAB. 25: MUTATION IM BEZUG ZUM PT-STADIUM	44
TAB. 26: ERGEBNISSE DER KORRELATIONSANALYSEN FÜR DIE SMARCB1-MUTATION VS. WILDTYP IN BEZUG ZU KLINISCH-PATHOLOGISCHEN PARAMETERN	44
TAB. 27: PROTEINVERLUST IN ZUSAMMENHANG MIT EREIGNIS TOT GESETZT	46
TAB. 28: ÜBERLEBENDATEN AUFGESCHLÜSSELT NACH ART DER TT	50
TAB. 29: OS Cox REGRESSION	51
TAB. 30: PFS Cox REGRESSION.....	54

TABELLENVERZEICHNIS

TAB. 31: VERGLEICH VERSCHIEDENER STUDIEN ZUM SWI/SNF-KOMPLEX IN NIERENZELLKARZINOMEN.....	60
--	----

I. EINLEITUNG

Das klarzellige (kz) Nierenzellkarzinom (NZK) ist der häufigste Subtyp des NZK mit circa 70 % aller NZK. (Störkel et al. 1997, S. 987) In ungefähr 5 % der Fälle wird morphologisch ein schlecht differenzierter Tumor mit rhabdoider und/oder sarkomatoider Morphologie nachgewiesen. (Moch et al. 2016, S. 18–19) Aufgrund der prognostischen Bedeutung sollte nach aktueller WHO-Klassifikation diese Tumorkomponente in der Diagnose erwähnt werden. Mechanismen, die zur Dedifferenzierung in NZK führen, sind bislang noch wenig untersucht und die vorliegende Arbeit soll einen Baustein zur Beantwortung dieser Frage liefern.

1.1 EPIDEMIOLOGIE DES NIERENZELLKARZINOMS

Das NZK ist der neunthäufigste Krebs bei Männern (214 000 Fälle) und der vierzehnthalufigste Tumor bei Frauen (124 000 Fälle) weltweit (Zahlen aus 2012). (Moch et al. 2016, S. 14) Der Großteil der Neuerkrankungen wurde in Ländern mit hohem sozialem Standard, hauptsächlich in Europa und Nordamerika, beobachtet. Außerdem tritt das NZK bei circa doppelt so vielen Männern wie Frauen auf. (Moch et al. 2016, S. 14; Siegel et al. 2019)

Schätzungsweise 143 000 Menschen starben 2012 an einem NZK, womit das NZK die sechzehnthalufigste Krebstodesursache ist. Erwähnenswert hierbei ist, dass die Wahrscheinlichkeit an einem NZK zu sterben in Dritte-Welt-Ländern höher ist, als z. B. in Europa. Es traten 3,1 % der Fälle in Afrika auf, jedoch 5,7 % der krebsassoziierten Todesfälle. (Moch et al. 2016, S. 14)

In Deutschland nehmen sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz seit Ende der 1990er Jahre zu. Hier zu Lande steht das NZK an sechster Stelle der neu diagnostizierten Krebs-erkrankungen bei den Männern, an zehnter bei den Frauen. (Robert-Koch-Institut 2015, S. 18) Da vermutlich immer mehr Tumore im frühen Stadium entdeckt werden, nimmt die alters-standardisierte Sterberate in Deutschland seit 1998 ab. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei den Männern bei 68 Jahren und bei den Frauen bei 71 Jahren, somit ist das Nierenzellkarzinom ein Krankheitsbild des älteren Menschen. (S3-Leitlinie 2017, S. 24)

Risikofaktoren für das Auftreten eines Nierenzellkarzinoms sind Übergewicht, Rauchen, Bluthochdruck (und die dazugehörigen Medikamente) sowie dialysepflichtige Nierenerkrankungen. Auch die Exposition gegenüber Schadstoffen (z. B. Trichlorethylen) begünstigt die Entstehung eines NZK. (Moch et al. 2016, S. 14-15; S3-Leitlinie 2017, S. 25)

Der Großteil der NZK tritt sporadisch auf, allerdings gibt es in 2 - 4 % der Fälle eine genetische Ursache. Das NZK ist beispielsweise mit dem Von-Hippel-Lindau-Syndrom oder mit dem Reed-Syndrom vergesellschaftet. (Moch et al. 2016, S. 15) Allerdings könnte es laut Agaimy und Hartmann eine höhere Dunkelziffer geben, da einige mögliche genetische Veränderungen bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt sind. (Agaimy und Hartmann 2016, S. 134)

1.2 KLINIK

Die meisten Nierentumore (60 - 80 %) sind Zufallsbefunde beim Ultraschall, bei MRT- oder CT-Aufnahmen. Diese Tumore sind häufig klein und symptomlos. Bei großen Tumoren sind die häufigsten Symptome Hämaturie und/oder Flankenschmerz. Bei fortgeschrittenen Erkrankungen kommt es außerdem zu Gewichtsverlust und Fieber. (Moch et al. 2016, S. 18)

Die gängige Metastasierung findet über die Blutbahn über die renalen Venen und die Vena cava in die Lunge statt (75 %). Über eine Infiltration von den renalen Venen zum lumbalen und von dort zum paravertebralen bzw. pelvinen Venenplexus ist eine Metastasierung in das zentrale Nervensystem, die Knochen sowie den Kopf- und Halsbereich möglich. Lymphogene Metastasen finden sich in den hilären, den paraaortalen und den cavalen Lymphknoten. Auf diesem Wege können der Ductus thoracicus oder direkt thorakale Lymphknoten infiltriert werden. (Moch et al. 2016, S. 18; S3-Leitlinie 2017, S. 123)

1.3 PATHOLOGISCHE DIAGNOSE UND TNM-KLASSIFIKATION

Morphologisch sind die Zellen des kzNZK gekennzeichnet durch ein klares oder eosinophiles Zytoplasma. Typischerweise wird der Tumor von zahlreichen kleinen Blutgefäßen mit schmalen Wänden durchzogen. (Moch et al. 2016, S. 18; Störkel et al. 1997, S. 988)

KzNZK sind solitäre, kortikale Tumore, die in beiden Nieren gleich häufig vorkommen. Ein beidseitiges Auftreten geschieht nur in 5 % der Fälle. Kommt es doch zu einem beidseitigen Befall und ist die Person außerdem noch recht jung, lässt dies häufig auf ein Karzinom mit erblicher Genetik schließen (z. B. Von-Hippel-Lindau-Syndrom). (Moch et al. 2016, S. 18; Agaimy und Hartmann 2016, S. 134)

Bei größeren Tumoren wölbt sich das kugelförmige Karzinom meist aus dem Kortex der Niere hervor. Häufig findet sich eine Pseudotumorkapsel, die das NZK vom restlichen Nierengewebe trennt. Die Infiltration des Nierensinus und der renalen Venen geschieht meist erst bei größeren Karzinomen. Makroskopisch fallen kzNZK durch ihre gold-gelbe Farbe auf, die aufgrund des hohen Lipidanteils zustande kommt. Blutungen, Zysten sowie Nekrosen sind üblich und auch Kalzifizierungen und Ossifikationen können auftreten. (ebd.) Beim Aufbau des kzNZK findet man häufig alveolare oder azinöse Strukturen, die mikro- oder makrozystisch imponieren können, wohingegen tubuläre oder pseudopapilläre Muster seltener vorkommen. (Störkel et al. 1997, S. 988; Moch et al. 2016, S. 18–19)

Die Namensgebung des Tumors leitet sich von den mit Lipiden und Glykogenen gefüllten Zytoplasmaraümen ab, die beim Präparieren für die Routinediagnostik ausgeschwemmt werden und dadurch unter dem Mikroskop klar bzw. leer wirken. (ebd.) Besonders in höheren WHO-Graden tritt eosinophiles Zytoplasma in der Nähe von Nekrosen oder Blutungen auf. Die Nukleoli haben je nach WHO-Grad ein unterschiedliches Auftreten von kleinen unauffälligen

bis hin zu großen prominenten Nukleoli. In circa 5 % aller kzNZK findet man eine rhabdoide und/oder sarkomatoide Komponente. (ebd.)

In den meisten Fällen reicht die typische Hämatoxylin-Eosin- (HE) Morphologie für die Diagnose eines kzNZK aus. Aber insbesondere bei gering differenzierten Fällen, bei Fällen ohne eindeutige differenzierte Komponente und bei Metastasen sind immunhistochemische Zusatzuntersuchungen wie Paired-Box-Protein 8 (PAX8) und cluster of differentiation 10 (CD10) für die Diagnosestellung hilfreich. PAX8 ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor in kzNZK, aber auch in anderen epithelialen Neoplasien. (Debien et al. 2019, S. 2) PAX2 kommt ebenso häufig vor, ist jedoch nicht so sensitiv wie PAX8. Die Expression von Zytokeratin 7 (CK7) findet sich meist nur in hochgradigen Karzinomen und tritt dort zudem sehr limitiert auf. Dieser Marker wird für die Differenzierung von klarzelligen zu chromophoben und papillären NZK genutzt. CD10 als Marker des proximalen Tubulus ist an den Membranen verteilt in kzNZK positiv und zeigt die Herkunft des kzNZK aus dem proximalen Tubulusepithel. Auch Vimentin ist in kzNZK positiv. (Moch et al. 2016, S. 19–20; Reuter et al. 2014, S. 37)

In einem kzNZK korrelieren CD10 und CK7 umgekehrt miteinander. Für gewöhnlich ist CD10 positiv und CK7 negativ. In seltenen Fällen kann CK7 positiv sein, dann jedoch fokal. In der Literatur wird CD10 als eindeutiger Parameter für die Bestimmung eines kzNZK beschrieben. (Kim et al. 2020, S. 2)

Zur Tumograduierung des kzNZK gibt es eine Vielzahl von Einteilungssystemen. Das 2016 von der WHO-Klassifikation eingeführte „International Society of Urological Pathology“- (ISUP) Graduierungssystem ist heute der Standard. (Delahunt et al. 2019, S. 4) Auch das deutsche Standardwerk empfiehlt die Einteilung nach der ISUP-Graduierung gemäß der WHO-Klassifikation 2016. (S3-Leitlinie 2017)

Die Grade 1 bis 3 unterscheiden sich anhand der Größe und des Vorhandenseins von Nukleolen (Abb. 1-4). (Moch et al. 2016, S. 17)

- Grad 1: keine oder kleine, unauffällige basophile Nukleoli
- Grad 2: unauffällige eosinophile Nukleoli in der 400x Vergrößerung, aber nicht sehr prominent in der 10x Vergrößerung
- Grad 3: unauffällige eosinophile Nukleolen, die in der 10x Vergrößerung gut erkennbar sind
- Grad 4: Tumorzellen mit extremer nuklearer Pleomorphie, multinukleäre Riesenzellen mit oder ohne sarkomatoider und/oder rhabdoider Differenzierung

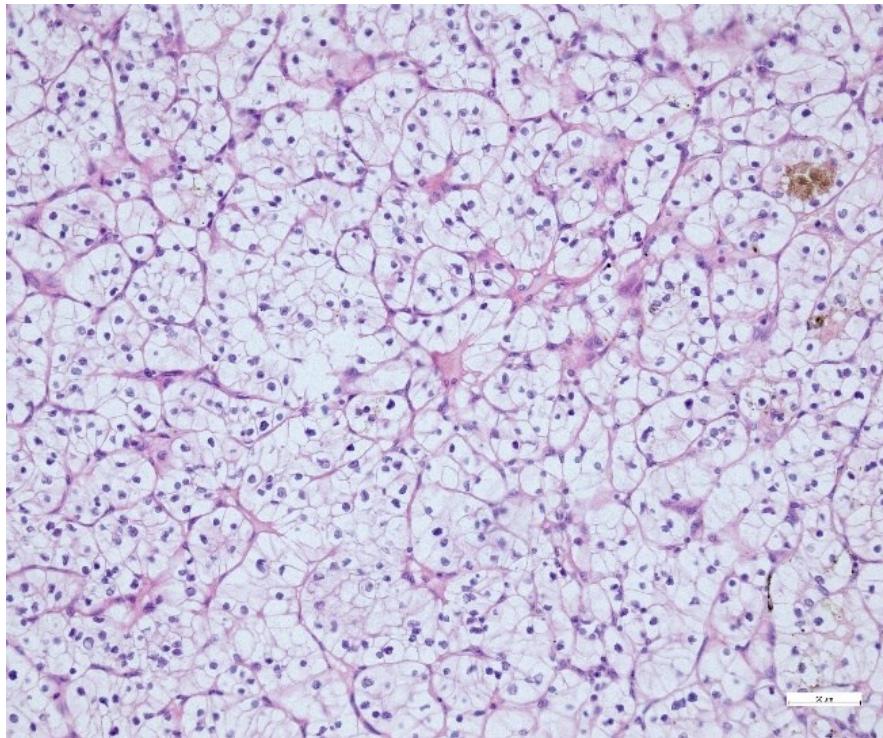


ABB. 1: G1-2 KLARZELLIGES NIERENZELLKARZINOM (20X, HÄMATOXYLIN-EOSIN), QUELLE: AUS DEM PROBENEINGANG DES INSTITUTS FÜR PATHOLOGIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

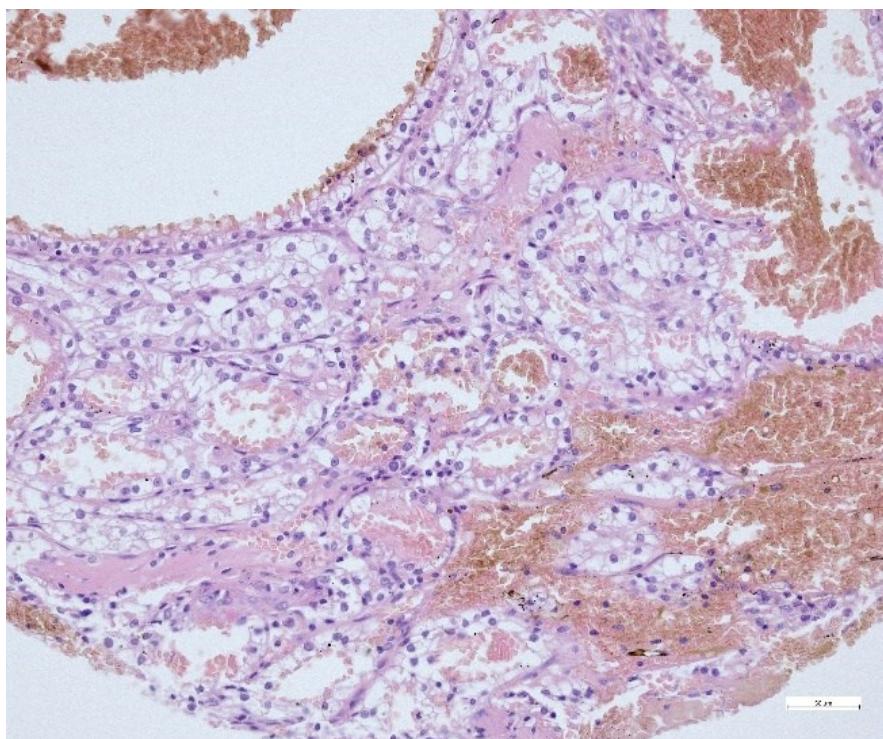


ABB. 2: G2 KLARZELLIGES NIERENZELLKARZINOM (20X, HÄMATOXYLIN-EOSIN), QUELLE: AUS DEM PROBENEINGANG DES INSTITUTS FÜR PATHOLOGIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

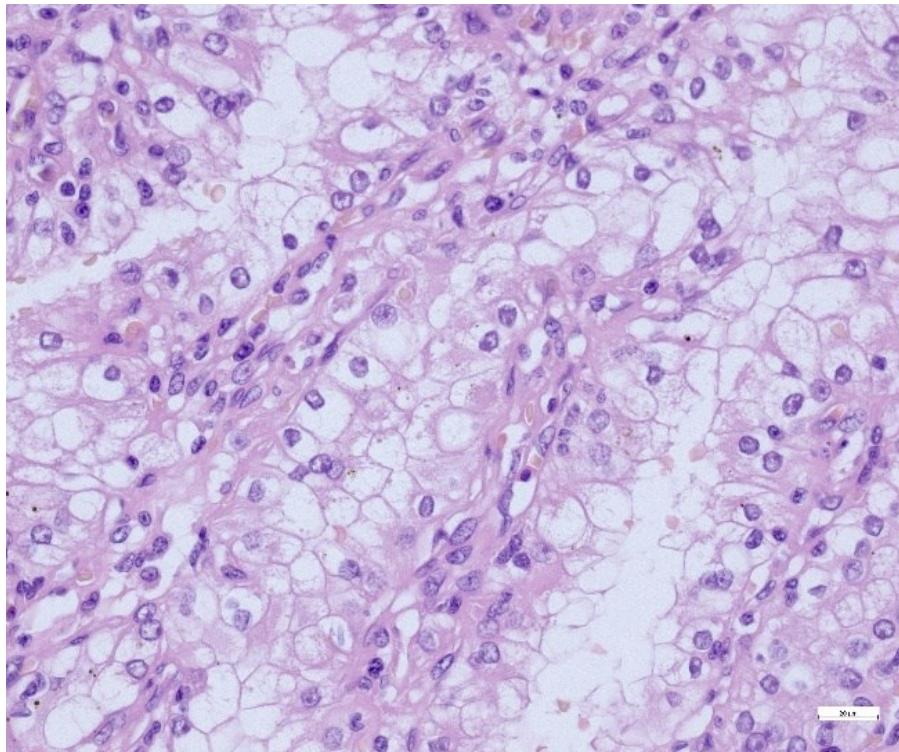


ABB. 3: G3 KLARZELLIGES NIERENZELLKARZINOM (20X, HÄMATOXYLIN-EOSIN), QUELLE: AUS DEM PROBENEINGANG DES INSTITUTS FÜR PATHOLOGIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

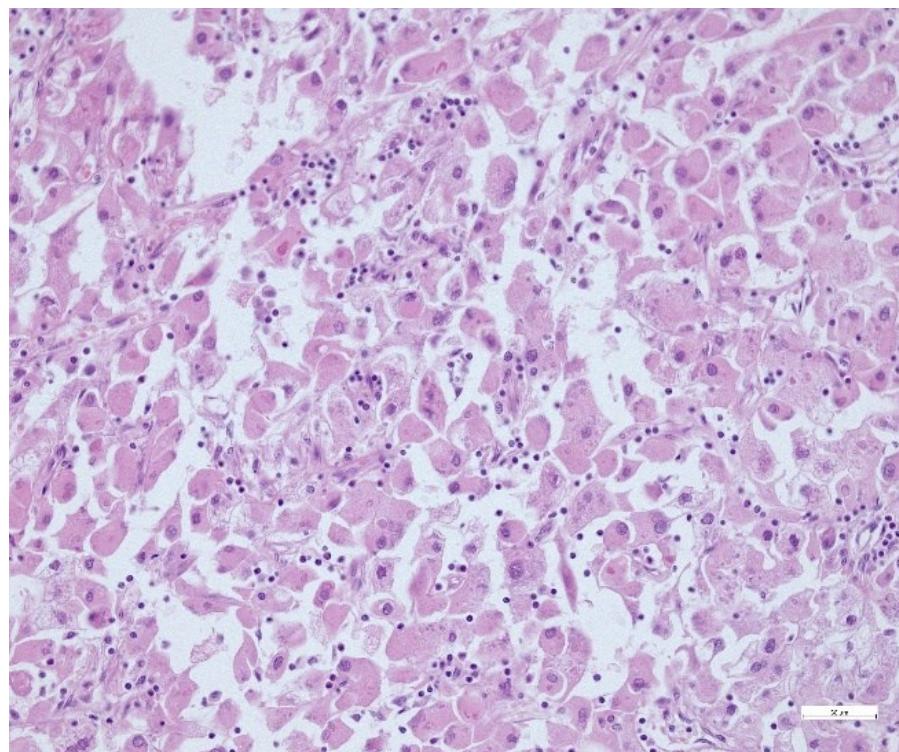


ABB. 4: G4 KLARZELLIGES NIERENZELLKARZINOM (20X, HÄMATOXYLIN-EOSIN), QUELLE: AUS DEM PROBENEINGANG DES INSTITUTS FÜR PATHOLOGIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

Bei der TNM-Klassifikation gibt es beim Tumorstadium (T) die pathologische (p) Abstufungen pT1a/b und pT2a/b für Tumore, die auf die Niere beschränkt sind und sich anhand der Tumorgröße unterscheiden. Außerdem teilt man das Stadium pT3 in die Untergruppen pT3a, pT3b und pT3c ein. Bei pT3a wächst das Karzinom in das perirenale und/oder Zentralsinusfettgewebe ein oder zeigt eine Nierenveneninfiltration. Die Stadien pT3b und pT3c unterscheiden sich dahingehend, wie weit die Infiltration in der Vena cava inferior fortgeschritten ist (pT3b unterhalb, pT3c oberhalb des Zwerchfells). Sobald eine kontinuierliche Ausdehnung in die Nebenniere erfasst oder die Gerotafaszie durchbrochen ist, spricht man von einem pT4-Stadium. (Moch et al. 2016, S. 17; Warren und Harrison 2018, S. 1919)

Wichtige Prognosefaktoren sind der Grad und das Tumorstadium. In die Prognose für das Überleben gehen zusätzlich das Vorhandensein von Nekrosen und eine eventuelle entdifferenzierte sarkomatoide und/oder rhabdoide Komponente mit ein. Sowohl die sarkomatoide als auch die rhabdoide Komponente sind mit einer schlechteren Prognose verbunden. (Moch et al. 2016, S. 21) Genauso spricht das Vorhandensein von Nekrosen in mehr als 10 % des Gewebes für eine schlechtere Prognose. (Warren und Harrison 2018, S. 1918) Auch immunhistochemische und molekulare Marker können einen Hinweis für die Prognose liefern, werden allerdings bisher kaum in der Klinik eingesetzt. (Moch et al. 2016, S. 21)

1.4 HERKUNFT UND GENETISCHE ABERRATIONEN IN KLARZELLIGEN NZK

Als sehr wichtiges Gen der NZK ist das von Hippel-Lindau- (VHL) Gen bekannt. Anfangs entdeckte man dieses Tumorsuppressorgen im VHL-Syndrom, einer erblichen Krankheit. Später zeigte sich, dass das 3p25-26-Gen auch in der Mehrzahl der sporadisch auftretenden kzNZK biallel genetisch verändert ist. (Gnarra et al. 1994, 85) Dieses Gen kodiert das von Hippel-Lindau-Protein, eine E3 Ubiquitinligase, welches als Adaptorprotein für die Rekrutierung von Effektorproteinen zu Zielproteinen zuständig ist. (A Ari Hakimi et al. 2013, S. 849) Zu den Zielproteinen gehört u. a. der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF) alpha, ein Transkriptionsfaktor für den sauerstoffabhängigen Ubiquitin-vermittelten proteolytischen Abbau. Tritt ein Funktionsverlust des HIF-alpha auf, kommt es zum Tumorwachstum und zur Metastasierung. (Kaelin 2002, S. 674) Epigenetisch wird das VHL-Gen durch eine Promotormethylierung in 20 % der Fälle zum Verstummen gebracht. (A Ari Hakimi et al. 2013, S. 849) Neben dem VHL-Gen befinden sich mindestens vier weitere Tumorsuppressorgene auf dem Chromosom 3p, die eine Alteration zeigen können, u. a. das Gen Polybromo-1 (PBRM1) des Switch/Sucrose-Chromatin-Remodellierungskomplexes (SWI/SNF-Komplex). Außerdem fanden sich Mutationen im Chromatin-Remodellierungsgen BRCA-assoziiertes Protein (BAP) 1 in kzNZK. (Moch et al. 2016, S. 20; Peña-Llopis et al. 2012, S. 752; Liao et al. 2015, S. 206)

1.5 DER SWITCH/SUCROSE-CHROMATIN-REMODELLIERUNGSKOMPLEX

Genetische Alterationen des SWI/SNF-Komplexes finden sich in diversen Geweben. Häufig haben unterschiedliche Neoplasien, die auf einer Mutation des SWI/SNF-Komplexes beruhen, nur diese Deregulierung gemeinsam, während das Auftreten der jeweiligen Tumore sehr unterschiedlich imponiert. (Agaimy 2019, S. 149) Dies ist darauf zurückzuführen, dass die SWI/SNF-Untereinheiten regelmäßig in Tumorzellen verändert werden können. Verantwortlich dafür sind verschiedene Ursachen wie z. B. genetische Aberrationen oder posttranskriptionale Mechanismen. (Peinado et al. 2020, S. 1)

Die genetische Aberration mit Verlust der Proteinexpression von Komponenten des SWI/SNF-Komplexes wurde beispielsweise in Urothelkarzinomen (u. a. Agaimy et al. 2016), in Mammakarzinomen (z. B. Kadoch und Crabtree 2015), in kardialen Tumoren (z. B. Bartelheim et al. 2014), in Lungenkarzinomen (z. B. Romero et al. 2012) oder auch in NZK (z. B. Agaimy et al. 2017) nachgewiesen. Der Verlust der Expression war häufig mit einer rhabdoiden und/oder sarkomatoiden Morphologie assoziiert. (Agaimy et al. 2016, S. 321)

Der SWI/SNF-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten (Abb. 5). (Shain und Pollack 2013, S. 1) Zuerst entdeckte man die entsprechenden Komponenten bei Genuntersuchungen an Hefen, zum einen der „mating-type switching“-Teil als Regulator, der SWI-Anteil, zum anderen den SNF-Teil, der Saccharose nicht fermentiert. Die Gene, die an beiden Prozessen beteiligt sind, werden als SWI/SNF-Gene bezeichnet. (Carlson und Laurent 1994, S. 396; Peterson et al. 1994, S. 2905)

Die Hauptaufgabe des SWI/SNF-Komplexes ist die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Chromatinremodellierung für Differenzierung, Proliferation und Desoxyribonukleinsäure-(DNS) Reparatur. Ein Funktionsverlust steht damit in Zusammenhang mit maligner Entartung, zumal mehrere Komponenten des Komplexes als Tumorsuppressor fungieren. (Reisman et al. 2009, S. 1653)

Die Regulation der Genexpression erfolgt durch eine Verschiebung der Position der Histone innerhalb des Chromatins, wodurch ein Zugriff auf die DNS ermöglicht wird. (Glaros et al. 2007, S. 7058)

Durch den Anteil des Komplexes an der Transkriptionsregulation und der Zelldifferenzierung entsteht das zytoarchitektonische Muster der Neoplasien, das von anaplastisch bis hin zu gut differenzierten organtypischen Läsionen reicht. (Agaimy 2019, S. 149)

Eine Mutation des SWI/SNF-Komplexes tritt in einer Vielzahl von Karzinomen mit einer ähnlichen Häufigkeit wie Tumor Protein 53- (TP53) Mutationen auf. Hierbei hat das kzNZK eine der höchsten SWI/SNF-Mutationsraten mit 57 %, nur das klarzellige Ovarialkarzinom besitzt mit 75 % eine höhere Rate. (Shain und Pollack 2013, S. 2)

Es kommen zwar Mutationen in den Strukturuntereinheiten vor, jedoch wesentlich seltener als in den enzymatischen oder funktionellen Untereinheiten. (Shain und Pollack 2013, S. 8)

Im Säugetiergebe gibt es eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, die SWI/SNF-abhängig sind, zum Beispiel Aktivator-Protein- (AP) 1 oder Erythroid Krüppel-like factor (EKLF). (Armstrong et al. 1998, S. 93; Ito et al. 2001, S. 2852) Außerdem sind alle bekannten Steroidrezeptoren funktionell mit dem SWI/SNF-Komplex verbunden. (Yoshinaga et al. 1992, S. 1598) Auch viele Interferon-induzierte Gene stehen damit in Verbindung. (Reisman et al. 2009, S. 1656)

Hieran kann man bereits gut erkennen, dass der SWI/SNF-Komplex nicht an einem einzelnen Prozess beteiligt ist, sondern als Grundkomponente bei vielen verschiedenen und unabhängigen Genpfaden wirkt. (ebd.)

Zum SWI/SNF-Chromatin-Remodellierungskomplex gehören viele Untereinheiten, von denen hier einige vorgestellt werden. Diese sind zusammenfassend in Abbildung 5 und in Tabelle 1 dargestellt.

Der Komplex kann in zwei Kategorien eingeteilt werden. Zum einen in den Komplex mit dem BRG1-/BRM-assoziierten Faktor (BAF) mit der ARID1A/B-Untereinheit, zum anderen in den Polybromo-assoziierten BAF-Komplex (PBAF) mit der ARID2- oder der Polybromo- (PBRM) 1-Untereinheit. (Biegel et al. 2014, S. 351) Bei BAF können entweder SMARCA4 oder SMARCA2 auftreten, bei PBAF ist es nur SMARCA4. (Romero und Sanchez-Cespedes 2014, S. 2681) Neueste Untersuchungen zeigen, dass es noch eine dritte Untereinheit, den non-canonical BAF-Komplex (ncBAF) gibt, der jegliche ARID-Untereinheit fehlt (Abb. 5). (Mashtalir et al. 2018, 1273)

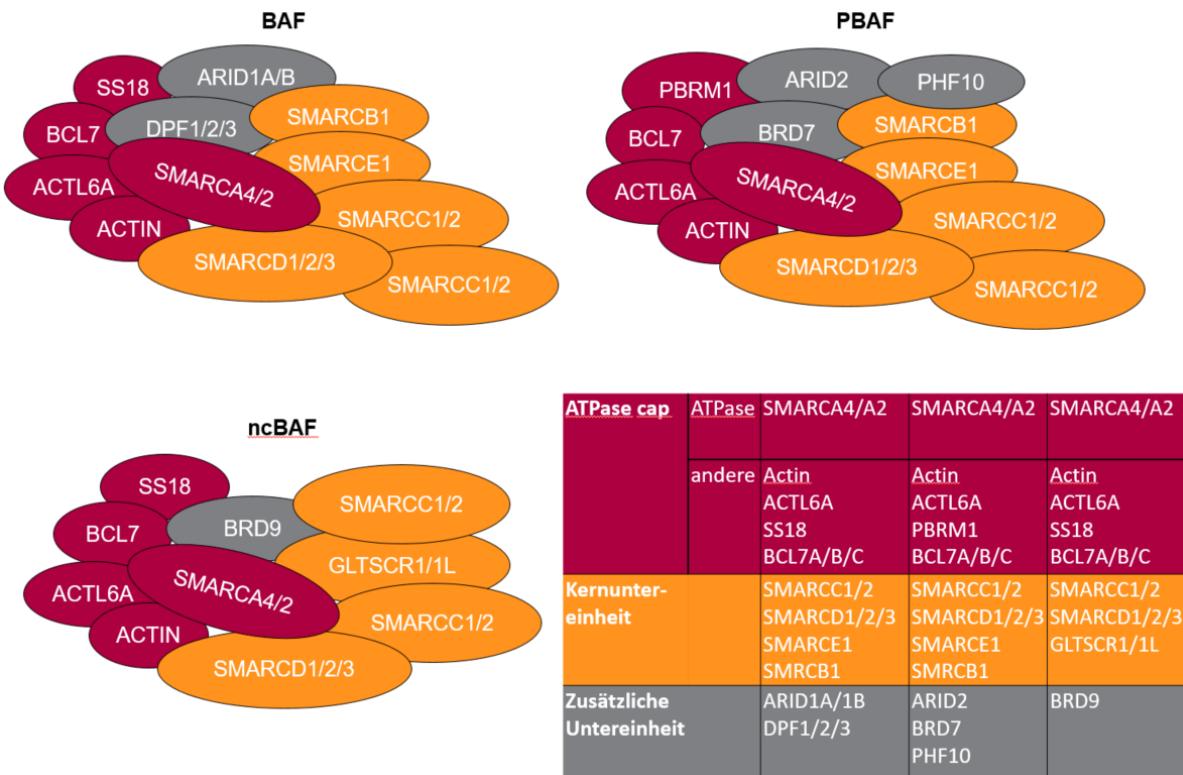


ABB. 5: DIE UNTERSCHIEDLICHEN ZUSAMMENSETZUNGEN DES SWI/SNF-KOMPLEXES ALS BAF-, PBAF- ODER NCBAF-KOMPLEX MIT IHREN UNTEREINHEITEN, MODIFIZIERT NACH (WANG ET AL. 2020, S. 469), IN DER TABELLE AUF SCHLÜSSELUNG NACH ART DER UNTEREINHEITEN

ABKÜRZUNGEN: ATPASE CAP MIT KOMPONENTEN SMARCA4/A2 UND WEITERE KOMPONENTEN, DIE FUNKTION AKTIVIEREN (Z.B. ACTIN); ABKÜRZUNGEN: BCL7A - B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA /LYMPHOMA 7 PROTEIN FAMILY MEMBER A; BRD – BROMODOMAIN-CONTAINING PROTEIN; GLTSCR1 – GLIOMA TUMOR SUPPRESSOR CANDIDATE REGION GENE 1; GLTSCR1L – GLTSCR1-LIKE; SS18 – SYNOVIAL SARCOMA TRANSLOCATION, CHROMOSOME 18, PHF10 – PHD FINGER PROTEIN 10; ACTL6A – ACTIN LIKE 6A; DPF1 – DOUBLE PHD FINGERS 1

1.5.1 SMARCB1

SMARC steht für „SWI/SNF-related, matrix associated, actin-independent regulator of chromatin“, der nächste Buchstabe beschreibt die Subfamilie. (Agaimy 2019, S. 150)

Die Entdeckung der Mutation von SMARCB1 in rhabdoiden pädiatrischen Tumoren gab den Anstoß für eine Untersuchung des SWI/SNF-Komplexes in weiteren rhabdoiden Neoplasien. (Biegel et al. 2014, S. 350) Bis zum heutigen Tag steht die Untereinheit im Mittelpunkt vieler Forschungen. Sie ist bei fast allen rhabdoiden Tumoren homozygot inaktiviert. (Versteeg et al. 1998, S. 203) SMARCB1 liegt auf dem Chromosom 22q11.2 und codiert eine 47 kDa schwere Untereinheit, die für die Transkriptionsregulation und für die Funktionsintegrität entscheidend ist. (Agaimy 2014, S. 394)

1.5.2 SMARCA4 UND SMARCA2

Das Säugetierpendant zu SWI/SNF aus den Hefeuntersuchungen sind die Untereinheiten SMARCA2 (auch Brahma (BRM) genannt) und SMARCA4 (auch Brahma-related gene 1 (BRG1) genannt). (Bögershausen und Wollnik 2018, 2)

Die Untereinheit von SMARCA4 befindet sich auf dem Chromosom 19p13.2. (Chen et al. 2018, S. 1) SMARCA4-Verlust ist assoziiert mit der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT). Hierbei handelt es sich um einen Übergang von der epithelialen in eine mesenchymale Differenzierung, ausgelöst durch verschiedene Faktoren wie z. B. HIF und Hochregulation von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die epitheliale Differenzierungsmarker supprimieren und mesenchymale Marker induzieren. (Peinado et al. 2020) Dies stellt eine wichtige morphologische Umwandlung dar, bei der das Epithel seine epithelialen Eigenschaften (z. B. Zell-polarität und Adhäsion) verliert. Die EMT ist insbesondere wichtig bei Tumorprogression, wie Invasion, Gefäßinvasion und Metastasierung. (Kinoshita et al. 2020, S. 652)

SMARCA2 ist auf dem Chromosom 9p24.3-p22.2 lokalisiert. (Miyake et al. 2016, S. 2662) Es wirkt sich auf das Wachstum aus, da eine exogene SMARCA2-Expression eine Wachstums-hemmung in SMARCA2-defizienten Zellen induziert. Außerdem fördert es die Transformation einer normalen Zelle in eine maligne. Ein Verlust von SMARCA2 beeinflusst die Zellmigration und Metastasierung. (Glaros et al. 2007, S. 7058)

1.5.3 ARID1A

ARID1A ("AT-rich interaction domain 1A", auch BAF250A genannt) befindet sich auf dem Chromosom 1p36.11 und steht in Verbindung zur Funktion von Steroidrezeptoren. (Bi et al. 2016, S. 2170; Reisman et al. 2009, S. 1657; Inoue et al. 2002, S. 5) Es wirkt als Repressor auf Schlüsselregulatoren und hat antiproliferative Eigenschaften. (Nagl et al. 2007, S. 754) Des Weiteren interagiert ARID1A mit Fehlpaarungsfaktoren und reguliert diese positiv. Tritt ein Verlust von ARID1A in Zellen auf, führt dies zu einer höheren Anzahl von Mutationen, da der Reparaturmechanismus fehlt. (Sasaki und Ogiwara 2020, S. 779)

1.5.4 SMARCC1 UND SMARCC2

SMARCC1 befindet sich auf dem Chromosom 3p23-p21, SMARCC2 auf dem Chromosom 12q13-q14. (Ring, H. Z., et al. 1998, S. 140)

SMARCC1 wirkt als Helicase und ATPase, die die Regulation der Transkription von verschiedenen Genen durch Veränderungen der Chromatinstruktur beeinflusst. (Wang et al. 2021, S. 236)

SMARCC2 ist ein intrinsischer Faktor, der die kortikale Neurogenese unterdrückt und die kortikale Größe kontrolliert. SMARCC2 kontrolliert des Weiteren die Euchromatinstruktur. (Tuoc et al. 2013, S. 256)

1.5.5 BAF180

BAF180 (auch PBRM1 genannt) spielt eine Rolle bei Reparaturmechanismen der DNS und ist auf dem Chromosom 3p21 lokalisiert. (Sekine et al. 2005, S. 2735) Es ist wichtig für die Kohäsion zwischen Zentromeren. Fehlt diese Kohäsion kommt es zu Genominstabilität und Aneuploidie. BAF180 ist außerdem relevant bei der Stilllegung (Silencing) der Transkription, die in der Nähe von doppelsträngigen DNS-Brüchen stattfindet. Kommt es nicht zu dieser Stilllegung, ist die Doppelstrangbruch-Reparatur beeinträchtigt. (Hopson und Thompson 2017, S. 2482) Des Weiteren ist ein Verlust von BAF180 mit einem hohen Tumograd, einer geringen Differenzierung und einer schlechten Prognose vergesellschaftet. (Pawlowski et al. 2013, 12) Das VHL-Suppressor-Gen bestimmt zwar noch immer die Karzinomentstehung, inzwischen ist aber bekannt, dass auch andere Gene, wie z. B. BAP1 oder BAF180, daran beteiligt sind. Diese Gene gelten als Histon/Chromatin-Regulatoren. BAF180 ist das am zweithäufigsten mutierte Gen nach dem VHL-Gen in kzNZK. (Pawlowski et al. 2013, 11)

TAB. 1: KOMPONENTEN DES SWI/SNF-KOMPLEXES UND DEREN EIGENSCHAFTEN

Komponente des SWI/SNF	Genort	Funktion	Anderer Name
SMARCB1	22q11.2	Transkriptionsregulation, Funktionsintegrität, Interaktion mit zellzyklusregulierenden Molekülen, Struktureinheit	INI1
SMARCA2	9p24.3-p22.2	Transformationsförderung, Wachstums-hemmung, Zellmigration und Metastasierung	BRM
SMARCA4	19p13.2	Tumorsuppressor, EMT	BRG1
SMARCC1	3p23-p21	Struktureinheit, Transkriptionsregulation	BAF155
SMARCC2	12q13-q14	Struktureinheit, Regulierung der Proliferation und Spezifikation neuronaler Zellen, Kontrolle der Euchromatinstruktur	BAF170
ARID1A	1p36.11	Repressor auf Schlüsselregulatoren, funktionelle Stabilität, Fehlpaarungsreparatur	BAF250A
BAF180	3p21	funktionelle Stabilität, Genomstabilität, Histon/Chromatin-Regulator	PBRM1

1.6 THERAPIEANSÄTZE BEIM NIERENZELLKARZINOM

Die hier vorgestellten Therapieansätze unterscheiden sich je nach Tumorgrad oder auch der TNM-Klassifikation und beziehen sich auf das NZK im Allgemeinen, nicht nur bei einem SWI/SNF-Verlust. Bislang hat sich keine Therapie bei einem SWI/SNF-Verlust in der Leitlinie etabliert.

Therapie der Wahl ist die chirurgische Entfernung des Tumors, besonders bei kleinen, lokal begrenzten Karzinomen. Je nach Größe und Realisierbarkeit wird hierbei entweder die ganze Niere oder nur ein Teilstück entfernt. Weitere Möglichkeiten sind das aktive Überwachen oder ablative Techniken (z. B. Kryoablation oder Hochfrequenzablation), die besonders bei älteren oder bei Patient:innen mit gesundheitlichen Risiken genutzt werden. (Motzer et al. 2017, S. 813–814)

Eine aktive Überwachung sollte nur bei Patient:innen durchgeführt werden, die ein kleines NZK (< 4 cm) haben, eine operativ-ablative Therapie ablehnen oder aus medizinischer Sicht nicht dafür geeignet sind. (S3-Leitlinie 2017, S. 54)

Im fortgeschrittenen metastasierten NZK wird eine Systemtherapie angestrebt.

Nierenzellkarzinome sind in den meisten Fällen chemotherapieresistent. (Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma 2013, S. 43) Die hohe P-Glykoprotein-Expression ist vermutlich dafür verantwortlich. (S3-Leitlinie 2017, S. 80)

Lange Zeit galt die Zytokintherapie mit Interleukin-2 (IL) oder Interferon- (IFN-) alpha als Mittel der Wahl für das metastasierte NZK. Allerdings hatten die Therapeutika eine hohe Toxizität und nur ein geringes Ansprechen von 10 - 20 % der Patient:innen, weshalb nach Alternativen gesucht wurde. (Hammerschmied et al. 2008, S. 360)

Nach der Aufschlüsselung einiger fehlregulierter Signalwege, die bei der Entstehung und Entwicklung eines NZK beteiligt sind, begann die Entwicklung von bestimmten Target-Therapeutika, die in diese Signalkaskade eingreifen. Angriffspunkte sind hierbei die HIF1-Stabilisierung, die „vascular endothelial growth factor-“ (VEGF-) und die „platelet-derived growth factor-“ (PDGF-) Produktion, die durch den VHL-Verlust zustande kommen. Dadurch werden die Gefäßbildung und das Wachstum des Tumors gefördert. Angiogenese-Inhibitoren zählen zu den bedeutendsten Therapeutika beim fortgeschrittenen NZK. Trotz der Vielfalt der Tumore sind die Angiogenesemechanismen in den meisten Fällen ähnlich. Deshalb gilt die HIF/VEGF-Achse als Angriffspunkt vieler Medikamente, wie z. B. VEGF-Antikörper (z. B. Bevacizumab, Cabozantinib oder Sunitinib). (Argentiero et al. 2020, S. 1; Hammerschmied et al. 2008, S. 360)

Außerdem zählen zur Target Therapie (TT) die Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren (z. B. Sunitinib, Sorafenib). (Motzer et al. 2017, S. 816)

Des Weiteren fand man heraus, dass der „mammalian target of rapamycin-“ (mTOR) Signalweg die HIF1-Translation steuert und selbst vom PTEN („phosphatase and tensin homologue

deletes on chromosome ten“ Gen) aktiviert wird. Zu diesen Therapeutika gehört u. a. Temsirolimus. (Hammerschmied et al. 2008, S. 360)

Die genauen Angriffspunkte der einzelnen Therapeutika verdeutlicht Abbildung 6.

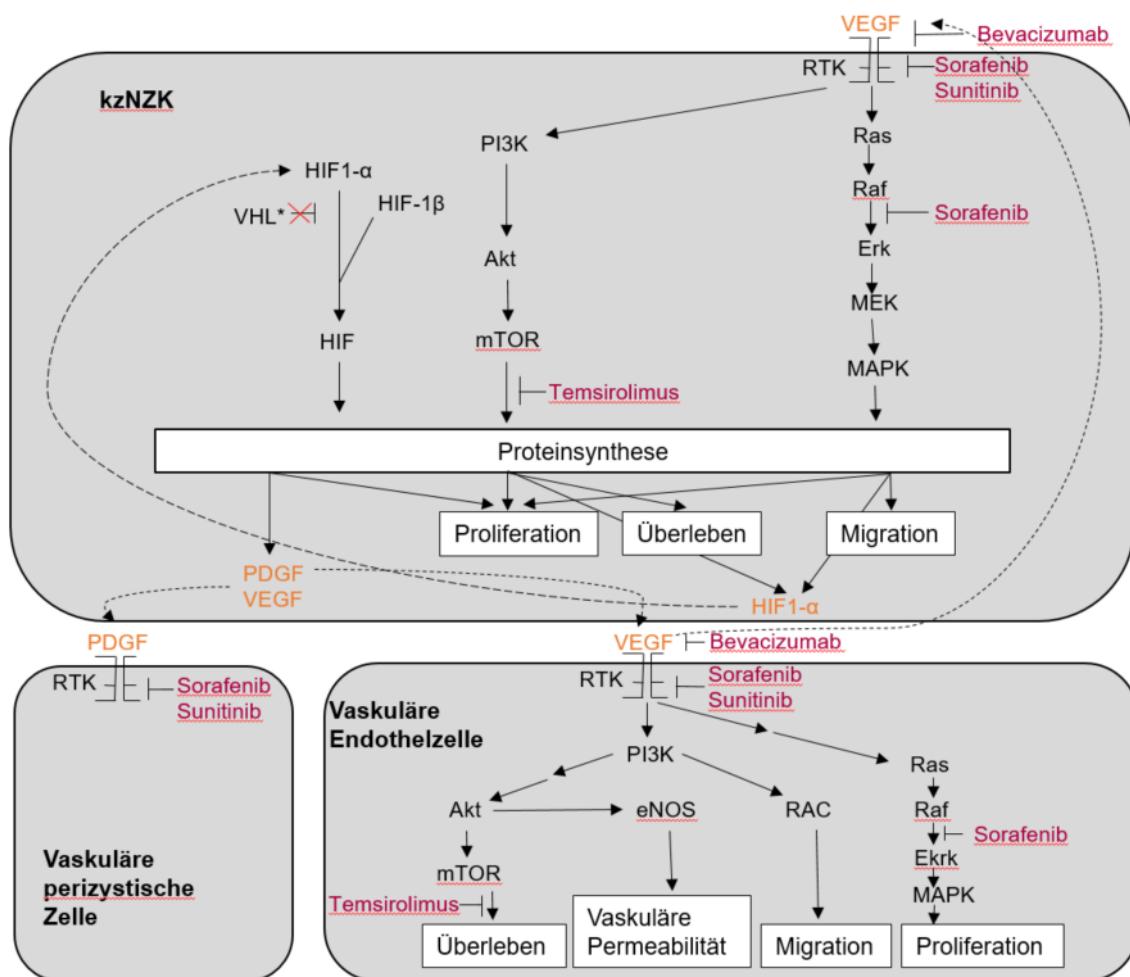


ABB. 6: DIFFERENTIELLE TARGET-THERAPIE IN ABHÄNGIGKEITEN DER TUMORBIOLOGIE IN NZK,
ABBILDUNG MODIFIZIERT NACH (HAMMERSCHMIED ET AL. 2008, S. 359)

ABKÜRZUNGEN: PI3K – PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-KINASE, RTK – REZEPTORTYROSINKINASE,
MEK – MAPK/ERK-KINASE, ERK – EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE 1, MAPK –
MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE, ENOS – ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE, RAC –
RHO FAMILY SMALL GTP-BINDING PROTEIN

Trotz der vielversprechenden neuen Therapeutika zeigte sich eine Resistenzentwicklung nach einigen Monaten und ein schlechtes Ansprechen gerade bei G4-Tumoren. (Hammerschmied et al. 2008, S. 361)

Bei der Auswahl dieser Methoden muss eine genaue Differenzierung nach Profil des Tumors und der davon abhängigen Therapiewirkung erfolgen. Die große Tumorheterogenität stellt hierbei ein großes Problem beim Finden von Therapeutika dar.

Erst bei Nachweis (d. h. dokumentiertem gesichertem Progress) einer fehlenden lokalen Therapiemöglichkeit oder nicht tolerablen Nebenwirkungen ist ein Wechsel der Therapeutika vorzunehmen. (S3-Leitlinie 2017, S. 112)

Als relativ neue Therapieansätze sind epigenetische Therapeutika bei entsprechenden epigenetischen Alterationen anwendbar. Den Tumorzellen reicht bereits ein kleiner Teil des SWI/SNF-Komplexes, wodurch sie sich an den Verlust von spezifischen SWI/SNF-Untereinheiten angepasst haben, der immer wieder auftreten kann. Die verbliebenen Komplexeiteile und einige epigenetische Modifikatoren bilden damit einen guten Angriffspunkt für Therapeutika. (Wang et al. 2020) Leider gibt es bis heute noch keine niedermolekularen Inhibitoren, die auf die SWI/SNF-Veränderungen als zentrales genetisches Ereignis abzielen. (Agaimy 2019, S. 160)

Abschließend lässt sich sagen, dass die wichtigste Therapie nach wie vor die operative ist. Wenn Metastasen vorhanden sind, sollen diese laut S3-Leitlinie lokal therapiert werden. Allerdings liegen hierzu noch keine randomisierten Studien vor und es handelt sich lediglich um B-Empfehlungen. (S3-Leitlinie 2017) Wenn die VEGF-Inhibitortherapie versagt, soll auf Nivolumab (programmed-death (PD) 1-Inhibitor) oder Cabozantinib zurückgegriffen werden. (ebd.)

II. AUFGABE UND ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

2.1 ZIELE DER ARBEIT

Über die Dedifferenzierungsmechanismen in kzNZK ist nach wie vor nur sehr wenig bekannt. Es besteht allerdings die Hypothese, dass Alterationen im Switch-Sucrose-Weg mit dem rhabdoiden und/oder sarkomatoiden Phänotyp in Tumoren, in diesem Fall dem kzNZK, einhergehen können. (Agaimy et al. 2017)

Deshalb ist das primäre Ziel dieser Arbeit die Untersuchung von Alterationen des SWI/SNF-Wegs als möglicher Dedifferenzierungsmechanismus im kzNZK.

Es soll mit Hilfe einer immunhistologischen Untersuchung bestimmt werden, ob eine Differenzierung des kzNZK mit dem Verlust von Proteinen des SWI/SNF-Komplexes einhergeht. Danach sollen Mutationsanalysen eines Gens mit häufigem Expressionsverlust eines SWI/SNF-Proteins exemplarisch die Frage nach der potentiellen Ursache des Expressionsverlustes klären.

Als Nebenziele soll die Frage beantwortet werden, ob der Verlust von Proteinen des SWI/SNF-Komplexes und weitere klinisch-pathologische Parameter prognoserelevant sind. Dazu werden Überlebensanalysen durchgeführt.

2.2 STUDIENAUFBAU

In einem ersten Schritt wurde die Häufigkeit des Proteinverlusts von sieben Mitgliedern des SWI/SNF-Komplexes in wenig differenzierten klarzelligen Nierenzellkarzinomen festgestellt und in Bezug zur intratumoralen Gewebeheterogenität und insbesondere den unterschiedlichen Tumorgraden in den jeweiligen Karzinomen gesetzt. Außerdem wurde die Assoziation des SWI/SNF-Proteinverlusts zum rhabdoiden und/oder sarkomatoiden Phänotyp untersucht. Im nachfolgenden Schritt wurde für das SMARCB1-Protein die Frage untersucht, ob Mutationen für diesen Proteinverlust ursächlich sein könnten.

Das SMARCB1 wurde exemplarisch ausgewählt, da es häufige Verluste aufgewiesen hatte. Zwar traten bei BAF180 die häufigsten Verluste auf, jedoch ist dies bekannter Weise nach der VHL-Mutation die zweithäufigste genetische Veränderung und diese Arbeit hat den Anspruch, eine noch relativ unbekannte Komponente zu untersuchen.

Da die sarkomatoide und/oder rhabdoide Differenzierung auch bei anderen Subtypen des NZK auftreten kann, die eventuell als hellzellige Variante vorliegen, wurde ergänzend die histopathologische Diagnose aller untersuchten Fälle durch eine immunhistochemische und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung des VHL validiert.

III. MATERIAL UND METHODEN

Es standen insgesamt 52 Fälle eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms, diagnostiziert in den Jahren 2014 bis 2018, zur Verfügung. Die klinisch-pathologischen Merkmale dieser Tumore sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Die Fälle wurden morphologisch reevaluiert, insbesondere bezüglich der Gewebeheterogenität und Nekrosen. Auf dieser Basis wurden Tissue-Mikroarrays angefertigt (näheres in Kapitel 3.2). Es erfolgte eine immunhistologische Analyse von sieben Proteinen des SWI/SNF-Komplexes. Danach wurden Korrelationen und das Überleben analysiert.

Ein Ethikvotum lag bereits zu Beginn der Arbeit vor (Ethik-Votum-Nr. A201141).

Im Anhang befindet sich eine Auflistung aller verwendeter Reagenzien und Materialien sowie der Geräte inklusive der Herstellerangaben.

3.1 ERSTELLUNG DER DATENBANK

Sämtliche Ergebnisse der Untersuchung sollten in einer umfassenden Datenbank zusammengetragen werden. Grundlage hierfür war eine Suchanfrage im internen Datenverwaltungsprogramm (SAP) nach Nierenzellkarzinomen. Es wurden zuerst alle kzNZK von 2014 bis 2018 herausgefiltert, die im Institut für Pathologie der Universität Rostock untersucht wurden. Danach wurden die hochgradigen Fälle extrahiert, die einen Tumorgrad nach ISUP 3 oder 4 hatten.

In die Exceltabelle wurden folgende Informationen aus den Befundberichten zusammengetragen:

- E-Nr
- Name
- Vorname
- Geburtsdatum
- Diagnosedatum
- Alter bei Diagnose
- Geschlecht
- Lokalisation, sprich Seite des Tumors
- Diagnosetext
- Diagnosecode
- Vorhandensein einer rhabdoiden und/oder sarkomatoiden Komponente
- WHO- und ISUP-Graduierung
- Nekroseanteil
- TNM-Staging
- Lymphbahninvasion
- Anzahl der untersuchten Lymphknoten
- Metastasenstatus
- Veneninvasion
- Perineuralscheideninfiltration
- Residualstatus
- E-Nr der Metastase

Außerdem wurde eine Liste des klinischen Krebsregisters hinzugezogen, welche Verlaufsdaten lieferte. Es wurde nun abgeglichen, welche Fälle sowohl in den Aufzeichnungen der internen Datenbank als auch in der Tabelle des Tumorregisters auftraten und im Folgenden zu einer großen Tabelle vereint, die folgende weitere Informationen enthielt:

- Status tot oder lebend
- Sterbedatum
- letzte Information
- Anzahl der überlebten Monate nach Diagnose
- klinische Daten (cTNM-T, cTNM-M, cTNM-N, Residualklassifikation)
- Operationsdatum
- durchgeführte Chemotherapie, Targettherapie und/oder Strahlentherapie und wann erfolgt
- Rezidivstatus und –datum
- Metastasendatum

Im darauffolgenden wurden die Daten anonymisiert, indem die Namen der Patient:innen aus der Tabelle entfernt und die Fälle mittels Nummer kodiert wurden. Sie dienten lediglich am Anfang der Übersichtlichkeit bei der Datenerfassung.

Es wurde im Folgenden das Gewebeearchiv der Pathologie nach den Fällen durchsucht und nur die Fälle in die Studie inkludiert, wo sowohl Schnitte als auch Blöcke vorhanden waren. Alles in allem konnte man für die Auswertung auf 52 Fälle der Jahrgänge 2014 bis 2018 zugreifen (Abb. 7).

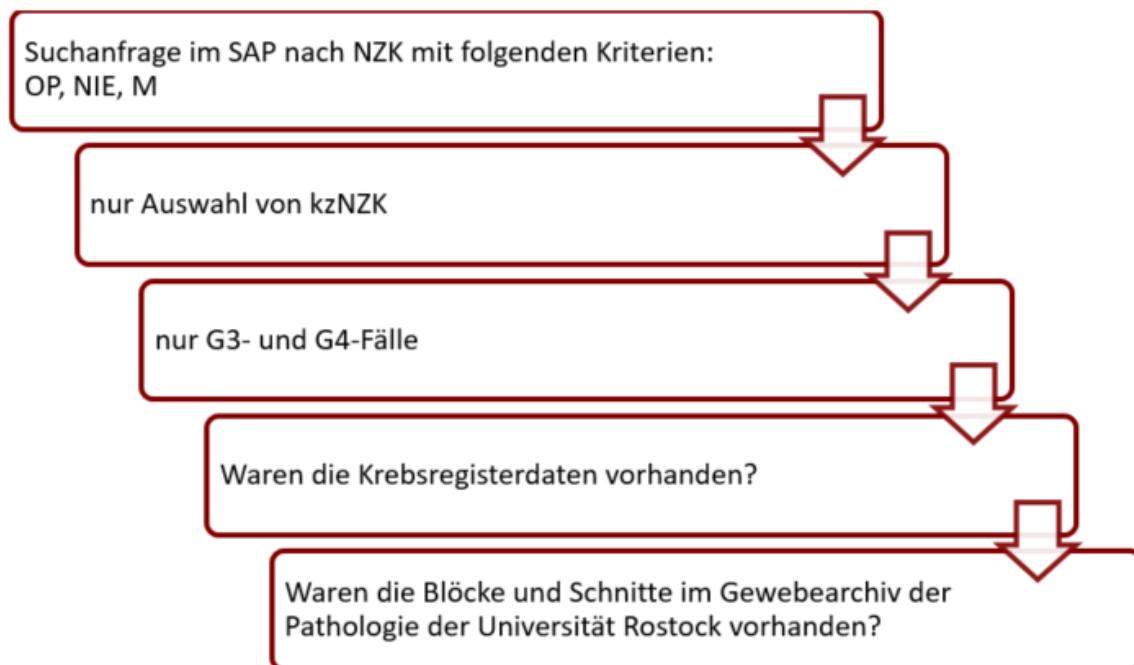


ABB. 7: DARSTELLUNG DES METHODISCHEN VORGEHENS DER AUSWAHL DER STUDIENFÄLLE

3.2 TISSUE MIKROARRAYS (TMA)

3.2.1 PRINZIP DER TMA

Tissue Microarrays (TMA) sind eine effektive Art, um sehr viele verschiedene Fälle mit einem Schritt färben und untersuchen zu können. Dies bringt nicht nur einen zeitlichen, sondern auch finanziellen Vorteil. Aufgrund der kleinen Gewebeentnahmen aus dem Ursprungsgewebe bleiben in der Regel große Anteile des Gewebes erhalten, das ggf. für weitere Analysen zur Verfügung steht.

Es wird Gewebe aus einer zuvor definierten Position aus dem sog. Donorblock ausgestanzt und in den Empfängerblock (TMA) an eine zuvor mit einer Excel-Datei bestimmten Position eingefügt (Abb. 8). (Kononen et al. 1998, 844) Da später durch die vielen Schnitte des TMA-Blocks eine Vervielfältigung dieses kleinen Ausschnitts zur Verfügung steht, wird gewebschonend gearbeitet. Abbildung 9 zeigt alle für diese Studie genutzten TMA-Blöcke.

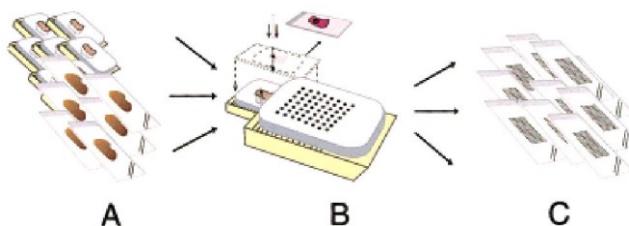


ABB. 8: BEISPIEL FÜR DIE HERSTELLUNG EINES TMA AUS: (NOCITO ET AL. 2001, S. 2)

ANMERKUNG: A – BLÖCKE MIT DEM ZU VERWENDETEN GEWEBE, B – STANZEN DES BLOCKS UND EINFÜGEN IN TMA-BLOCK, C – ENTSTANDENE SCHNITTE DES TMA-BLOCKS

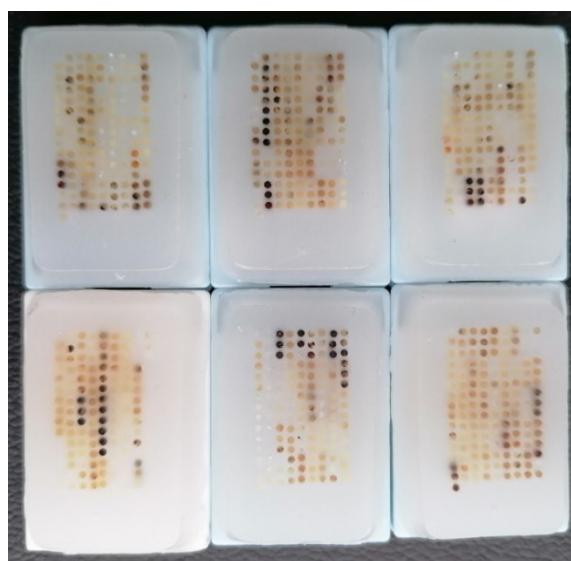


ABB. 9: SÄMTLICHE TMA-BLÖCKE DER NIERENZELLKARZINOM-STUDIE

3.2.2 ERSTELLUNG DER TMA

Zur Erstellung der TMA wurden zuerst sämtliche Schnitte der Fälle mikroskopiert und Markierungen gesetzt, welcher Bereich für eine Stanze in Frage kommt. Daraufhin wurden ein Abgleich der Schnitte mit den Blöcken durchgeführt und mit Hilfe des Präzisions-Stanzgeräts der Firma Beecher Instruments mit einer Hohlnadel von 1,0 mm Außendurchmesser eine Stanze aus einem leeren Paraffinblock (Akzeptorblock) entnommen. Mit der 1,0 mm Stanznadel (Innendurchmesser) wurde der markierte Bereich aus dem Gewebeblock (Donorblock) gestanzt und diese Gewebestanze in den Akzeptorblock integriert (siehe Abb. 8). Nach einem festgelegten Muster von neun Reihen á 15 Stanzen wurden auf diese Weise insgesamt sechs Blöcke hergestellt (Abb. 10). Zur Sicherung der Ergebnisse wurde jedes Areal dreimal, sowie zu jedem Tumor das passende Normalgewebe ebenfalls dreifach gestanzt. Auf diesem Wege vergrößerten sich die Chancen, einen verwertbaren Tumorausschnitt zu erhalten. Nachdem die Blöcke dreißig Minuten lang bei 50 °C für die Verbindung der Gewebestanzen mit dem Paraffin des Empfängerblocks erhitzt wurden, wurden im nächsten Schritt mit einem Mikrotom 2-3 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese kamen in ein Wasserbad und wurden von dort auf einen Objektträger gezogen. Nach dem Trocknen standen sie für weitere Vorgänge, wie beispielsweise die Färbung, bereit. Eine HE-Färbung wurde durchgeführt und die Qualität der TMA-Schnitte beurteilt. Als morphologisch auswertbar galten die Areale, die mehr als zehn Prozent Tumor- oder Normalgewebe enthielten.

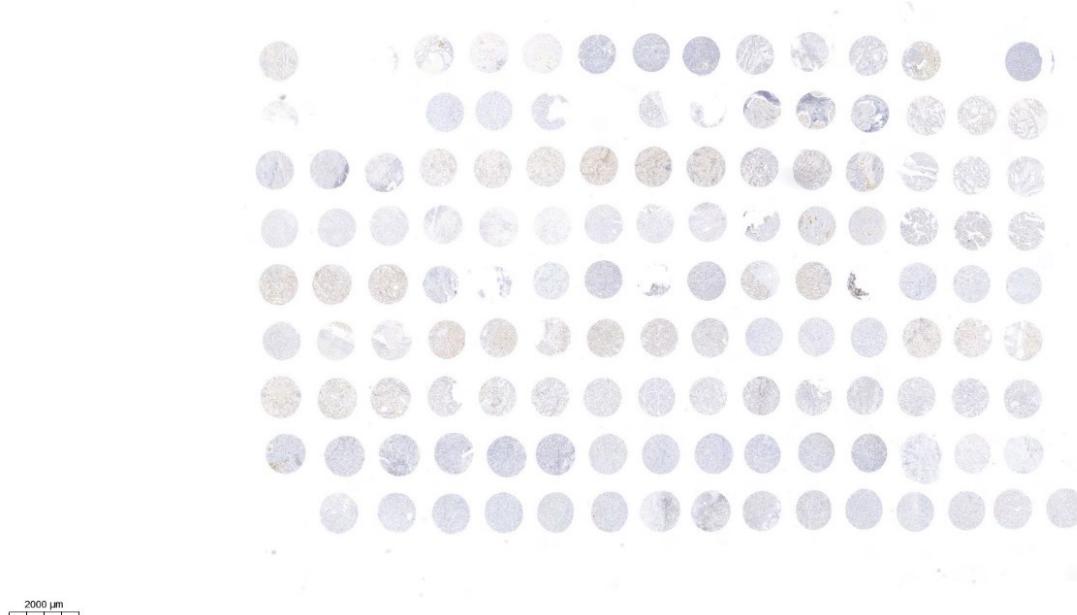


ABB. 10: BEISPIELBILD EINES TMA, QUELLE: AUS DEM PROBENEINGANG DES INSTITUTS FÜR PATHOLOGIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

3.3 IMMUNHISTOCHEMIE

3.3.1 PRINZIP DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN TECHNIK

Immunhistochemie ist eine Methode, die das Detektieren von Antigenen in Gewebeschnitten ermöglicht. Die Gewebeschnitte werden zu diesem Zweck Antikörpern ausgesetzt, die spezifische Epitope im Gewebe erkennen. Mit Hilfe eines Markers (Chromogens), der an einen Antikörper gebunden ist, kann das Epitop sichtbar gemacht werden. Das System beruht auf dem Prinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion (Abb. 11). (Lang 2006, S. 270)



ABB. 11: DARSTELLUNG EINER ANTIGEN-ANTIKÖRPER-REAKTION AUS: (LANG 2006, S. 272)

3.3.2 DURCHFÜHRUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNG

Zur weiteren Diagnostik wurden neben der HE-Färbung folgende immunhistochemische Marker eingesetzt: Surrogatmarker der genetischen Alterationen im SWI/SNF-Weg: BAF180, SMARCB1, ARID1A, SMARCA2, SMARCA4, SMARCC1, SMARCC2. Diagnostische Marker des NZK waren CK7 und CD10 (Tab. 2 und 3). Die folgenden Schritte wurden zum Teil automatisiert mit dem Dako Autostainer Link48 durchgeführt.

Schritte der immunhistochemischen Untersuchung:

- Herunterkühlen der Paraffin-Blöcke auf einer Kühlplatte auf -15 °C
- Schnitt am Mikrotom → 2 µm dicke Gewebsschnitte
- Abstreifen in ein 37 °C warmes Wasserbad → Streckung und Glattziehen
- Ziehen auf einen beschichteten Objekträger
- Trocknung über Nacht bei 37 °C
- Entparaffinierung bei 97 °C für zwanzig Minuten → mit Puffer (EnVision Flex High pH) mit Konzentrat, zeitgleich Rehydrierung
- Antigendemaskierung → Aufbrechen der Eiweiße
- Blockierungslösung der endogenen Peroxidase mit im Kit enthaltener EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801) (zehn Minuten)
- Zugabe des Puffer EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (DM831)
- Zugabe des Antikörpers für zwanzig Minuten (entweder bereits ready-to-use oder Ansetzen mit einem Antikörper-Konzentrat vor Ort)

- Zugabe entweder des Immunfärbekomplex (Chromogen/3,3'-Diaminobenzidine (DAB)) oder erst der Brücke (Verstärkermolekül für die Bindung an das DAB) und nachfolgend der Immunfärbekomplex
- Kennzeichnung des vorhandenen Enzym-Substrat-Komplexes durch braune Färbung
- Gegenfärbung mit EnVision Flex Hämatoxylin → Blaufärbung der nicht DAB-gefärbten Strukturen
- Spülung mit Alkohol; Auftragen von Xylol als Eindeckmedium
- Auflegen der Deckgläser mit dem Dako Coverslipper

Die Auswertemodalitäten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

TAB. 2: VERWENDETE ANTIKÖRPER UND DIE JEWEILIGEN PROTOKOLLE

Antikörper	Klon	Konzentration	Vorbehandlung
SMARCB1	MRQ-27	1:50	10 Minuten bei 97 °C, pH 9
SMARCA2	HPA029981	1:200	10 Minuten bei 97 °C, pH 6
SMARCA4	EPNCIR111A	1:200	10 Minuten bei 97 °C, pH 9
SMARCC1	HPA026853	1:2500	10 Minuten bei 97 °C, pH 9
SMARCC2	HPA024352	1:400	10 Minuten bei 97 °C, pH 9
ARID1A	ERP13501-73	1:1000	10 Minuten bei 97 °C, pH 9
CD10	56c5	Ready to use	20 Minuten bei 97 °C, pH 9
CK7	Ks7.18	1:100	20 Minuten bei 97 °C, pH 9
BAF180	EPR15860	1:2000	Low pH

TAB. 3: AUSWERTEMODALITÄTEN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN MARKER

Antikörper	Auswertemodus
SMARCB1 SMARCA2 SMARCA4 SMARCC1 SMARCC2 ARID1A BAF180	0 = positiv in < 10 % 1 = positiv in < 30 % 2 = positiv in ≥ 30 %
CD10 CK7	0 = negativ 1 = > 10 % positiv

3.4 VHL FLUORESZENZ-IN-SITU HYBRIDISIERUNG

3.4.1 PRINZIP DER VHL FLUORESZENZ-IN-SITU HYBRIDISIERUNG

Die Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) wurde mit Hilfe des ZytolightFISH-Tissue Implementation Kit angefertigt und diente dem Nachweis humaner DNS-Sequenzen dank der Duplexbildung zwischen der DNS-Sonde und der zu untersuchenden Sequenz.

3.4.2 DURCHFÜHRUNG DER VHL FLUORESZENZ-IN-SITU HYBRIDISIERUNG

Schritte der VHL Fluoreszenz-In-Situ Hybridisierung:

- Entparaffinierung der Objektträger
- Proteolysierung mit Pepsin Solution für zehn Minuten bei 37 °C
- Waschung des Schnittes für fünf Minuten in Wash Buffer SSC; Dehydrierung in Ethanol (Walter CMP); Lufttrocknung
- Pipettierung der Träger mit je 17 - 20 µl Zytolight-FISH-Sonde (verwendete Sonde: Zytolight SPEC VHL/CEN 3 Sonde)
- Auflegen des Deckglases; Denaturierung für zehn Minuten bei 75 °C
- Inkubation über Nacht bei 37 °C in einer feuchten Kammer zur Hybridisierung im Incu-Line Ofen von VWR
- Entfernung der Deckgläser
- Waschung der Objektträger in Wash Buffer A; Inkubation in Ethanol
- Lufttrocknung; Auftragen von 30 µl DAPI/Antifade-Solution; neue Eindeckung
- Entfernung von überschüssiger Flüssigkeit durch vorsichtiges Drücken des Deckgläschens
- Auswertung unter dem ZyGreen/ZyOrange Filter (AHF-Filter F56-700) mit dem Olympus BX53 Mikroskop mit einer Quecksilber Dampflampe (U-LH100HG)
- Aufnehmen der Fotografien mit der Software Version 15 der cellSens Dimension von Olympus

Bei der Auswertung wurden 500 Tumorzellkerne pro Stanz-Triplett ausgewertet. Eine grüne Färbung stand hierbei für das lokospezifische Gen, in diesem Fall das VHL-Gen, eine rote Färbung für das Zentromer 3. Physiologisch treten jeweils zwei Signale je Farbe in einer Zelle auf. Bei einem VHL-Verlust kommt es zu einer Monosomie, bei der es ein grünes und zwei rote Signale gibt (Abb. 12).

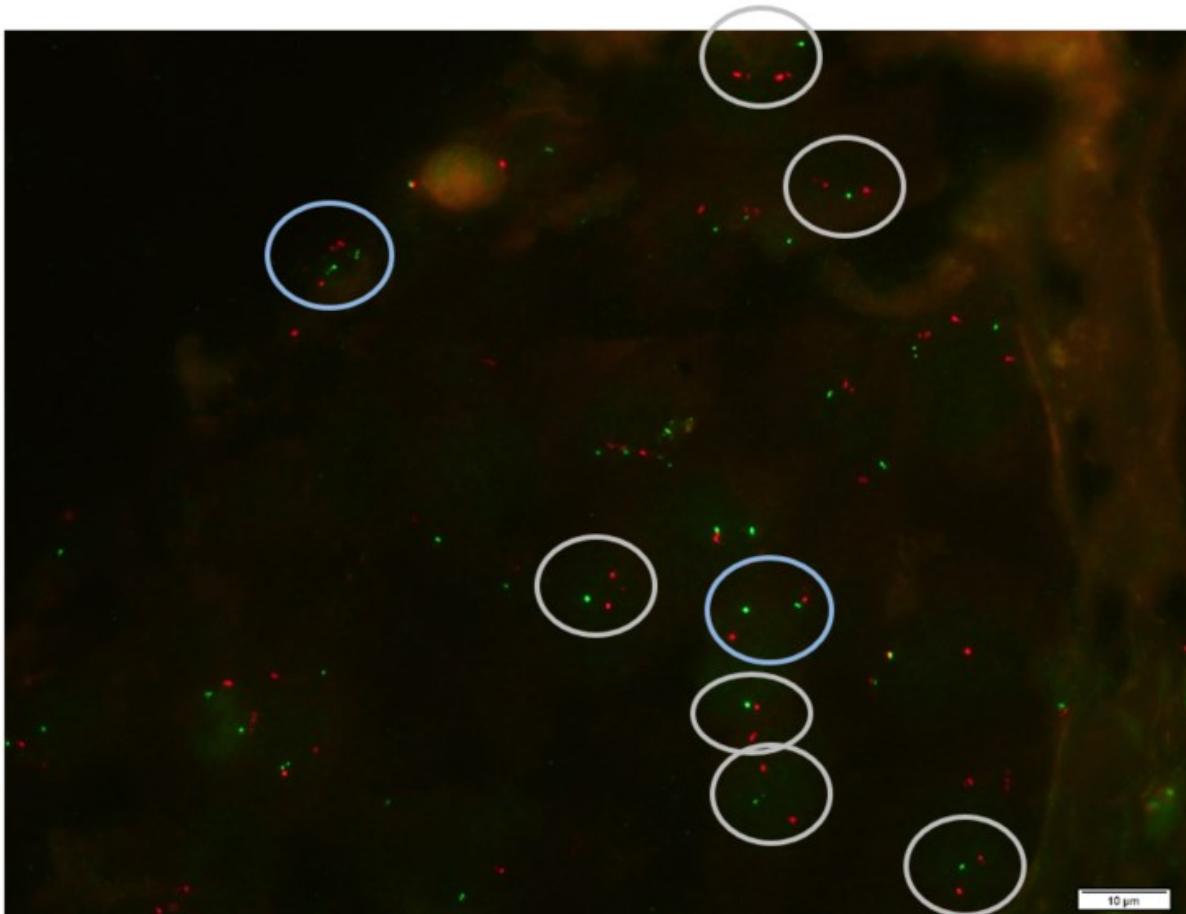


ABB. 12: KLARZELLIGES NIERENZELLKARZIOM MIT *VHL*-DELETION, (100X, STUDIENFALL)
ANMERKUNG: MIT GRAUEM RING MARKIERTE ZELLKERNE ZEIGEN EIN EINZIGES, GRÜNES *VHL*-SIGNAL UND ZWEI ROTE SIGNALE DES ZENTROMER 3 (*VHL*-DELETION). MIT BLAUEM RING MARKIERTER NORMALER ZELLKERN MIT JEWELS ZWEI GRÜNEN UND ROTEN SIGNALEN.

3.5 SMARCB1-MUTATIONSANALYSE

3.5.1 PRINZIP DER SANGER-SEQUENZIERUNG

Mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung kann die Basenabfolge bestimmter DNS-Abschnitte dargestellt werden. Dadurch können Mutationen untersucht und bestimmt werden.

Die Sanger-Sequenzierung ist eine Terminator-Sequenzierung und eignet sich insbesondere für die gezielte Untersuchung sehr kleiner Gene oder einzelner Mutationen. (Schaaf und Zschocke 2018, S. 200)

3.5.2 DURCHFÜHRUNG DER SANGER-SEQUENZIERUNG ZUR SMARCB1-MUTATIONSANALYSE

Für die Mutationsanalyse wurde jeweils Tumorgewebe aller Fälle mit *SMARCB1*-Verlust nach Beurteilung des Tumoranteils am HE-Schnitt untersucht.

DNS-Extraktion bei Fällen mit einem Tumoranteil über 40 - 50 %

- Überführung von 10 μm Schnitte ins Tube (1,5 ml Reaktionsgefäß)
- Erhitzung bei 80 °C für zehn Minuten

- Zugabe von 1 ml Rotihistol; Mischung im Vortexgerät
- Zentrifugation des Tubes für fünf Minuten, Abziehen des Überstandes
- Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol; Vortexen
- Zentrifugation für fünf Minuten, Abziehen des Überstandes
- Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol; Vortexen
- Zentrifugation für fünf Minuten, Abnahme des Überstandes
- Trocknung im 60 °C heißen Heizblock bis der Alkohol sich verflüchtigte
- Aufnahme des Pellets in den entsprechenden Puffer des DNS-Extraktionskits

War der Tumoranteil deutlich unter 40 %, wurden 10 µm Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen und diese wie folgt entparaffiniert:

- Erhitzen des Schnittes für zehn Minuten bei 80 °C
- Inkubation für eine halbe Stunde in Rotihistol und dann für weitere zehn Minuten in Rotihistol in Küvetten
- Rehydrierung für jeweils zwei Minuten mittels einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 90 %, 70 %, 30 %)
- Spülung zweimal je zwei Minuten in destilliertem Wasser
- Lufttrocknung
- Mikrodissezierung des gewünschten Tumorgewebes mit einem Skalpell
- Überführung in ein Tube mit dem entsprechenden Puffer (aus dem DNS-Extraktionskit)

Die DNS-Aufreinigung erfolgte im GeneRead FFPE DNS-Kit von Qiagen. Das getrocknete Pellet wurde nach dem Entparaffinieren im Tube in 55 µl RNase-freies Wasser, 25 µl FTB Puffer und 20 µl Proteinase K aufgenommen, die Proben im Vortexgerät durchgeschüttelt und zentrifugiert. Dies diente als Startpunkt der DNS-Aufreinigung.

DNS-Aufreinigung

- Inkubation bei 56 °C für eine Stunde
- Inkubation bei 90 °C für eine Stunde
- Zugabe von 115 µl RNase-freies Wasser und 35 µl UNG; Vortexen
- Inkubation bei 50 °C für eine Stunde; Zentrifugation
- Zugabe von 2 µl RNase A (100 mg/ml); Mischen
- Inkubation bei Raumtemperatur für zwei Minuten
- Zugabe von 250 µl AL Puffer; Mischen
- Zugabe von 250 µl Ethanol (96-100 %); Mischen; Zentrifugation
- Überführung 700 µl Lysat in die QIAamp MinEluts-Säule; Zentrifugation für eine Minute
- Entfernung des Durchflusses
- erneute Zentrifugation, wenn Lysat noch nicht vollständig durch Membran getreten
- wenn QIAamp MinElute-Säule leer → Zugabe von 500 µl AW1 Puffer in die Spin-Säule
- Zentrifugation
- wenn QIAamp MinElute-Säule leer → Zugabe von 500 µl AW2 Puffer; Zentrifugation
- Zugabe von 250 µl Ethanol (96-100 %); Zentrifugation
- QIAamp MinElute-Säule in ein sauberes 1,5 ml-Tube stellen
- Entfernung des Deckels; Auftragen von Wasser auf Mitte der Membran zum Eluieren
- Inkubation bei Raumtemperatur für eine Minute
- Zentrifugation für eine Minute

- Vermessung der aufgereinigten DNS mit dem Quantus Fluorometer (Promega) unter Verwendung des Quantiflour One dsDNA Systems (Promega)

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden zwei verschiedene Polymerasen mit ihren dazu gehörigen Reagenzien verwendet. Wenn Variante 1 nicht funktionierte, wurde Variante 2 angewandt.

Variante 1:

- je 25 µl Ansatz bis zu 50 ng DNS eingesetzt
- Vermengung mit 0,2 µl MyTaqHS Polymerase, 5 µl 10x-Puffer und 2 µl Primer (5 pmol/µl)
- Temperaturablauf: 95 °C für eine Minute → 95 °C für jeweils 15 Sekunden → 56 °C für 15 Sekunden → 72 °C für zehn Sekunden (letzten drei Schritte insgesamt 40x)
- Abkühlen auf 10 °C

Variante 2:

- Nutzung der Polymerase Phire Hot Start II (Thermo Scientific)
- Mischen von 25 µl Ansatz mit 4 µl dNTPs, 0,2 µl Polymerase und fünfmal der Phire Reaction Puffer
- Temperaturablauf: 98 °C für dreißig Sekunden → 98 °C für zwanzig Sekunden → 56 °C für zwanzig Sekunden → 72 °C für dreißig Sekunden (letzten drei Schritte insgesamt 34x)
- für drei Minuten bei 72 °C; Abkühlen auf 10 °C

TAB. 4: VERWENDETE PRIMER

Exon	Forward Primer	Reverse Primer
1	CCTCCTGATCCCTCGCAG	GATGAATGGAGACGCGCG
2	GGTGCTGCGACCCTTATAATG	CTTCATGACATAAGCGAGTGGT
3	CATGCGAGGACCTTGATGTG	ACCCAACCAGTTCTTGAGTC
4	GGCATCCCTGGAGCATTAGT	GGAACTGAAACGTGCTGGAG
5	TTTGCATACCTAGGGCTCCG	GTTCCCACGTAACACACAGG
6	AAGAAGAAGGGGTGAGGGAG	ATGATGACACCCACCTGAG
7	CTCCCTGGGCTGCAAAAG	GGTATCACCGCTCACACAGA
		TTGCAGGGAGATGAGGGAGG
8	AGTCATT CCTCTCACTGCCTC	CCATGGGAGACTGGAAAGG
9	TACACTGGCTGCCCTGTAG	AAGATGGAGGAGAGGCAG

Zur Kontrolle der PCR erfolgte eine Gelelektrophorese. Hierfür wurden 5 µl Midori Green Farbstoff in 100 µl des zweiprozentigen Agarose Gels (entsprechend 2 g Agarose in 100 ml TAE) zugesetzt. Von den 105 µl Ansatz wurden 10 µl mit 1 µl 6x Loading Dye versetzt und in die Geltasche pipettiert. Das Produkt wurde für dreißig Minuten 90 V ausgesetzt und mit Hilfe des UV Transilluminators wurden die Banden sichtbar gemacht.

Die restlichen 15 µl wurden folgendermaßen aufgereinigt:

- Zugabe von 3 µl Alkalischer Phosphatase und 1,5 µl Exonuklease I
- Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten
- anschließende Hitzeinaktivierung bei 80 °C für 15 Minuten

Mit Hilfe des BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 oder v1.1 wurde ein 10 µl Ansatz hergestellt, bestehend aus:

- 1,5 µl BD Puffer
- 0,125 µl Big Dye
- 0,875 µl BDX64
- 2 µl Primer
- 1-2 µl des aufgereinigten PCR-Produkts

Der Ansatz wurde mit Wasser auf insgesamt 10 µl aufgefüllt. Die Temperaturabfolge sah hierbei wie folgt aus:

- drei Minuten bei 96 °C
- insgesamt dreißigmal abwechselnd zehn Sekunden bei 96 °C, fünf Sekunden bei 50 °C und zwei Minuten bei 60 °C
- Herunterkühlen bei 10 °C

Die Sequenzierung wurde dann nochmal mit dem Big Dye X Terminator Aufreinigungskit wie folgt aufgereinigt:

- Transfer des Sequenzer-PCR-Produkts in eine 96-well-Platte
- Zugabe von je 45 µl SAM-Puffer und 10 µl Beads
- Schütteln der Platte für dreißig Minuten bei 2000 UpM
- Zentrifugation der Platte für zwei Minuten

Die Sequenzanalyse wurde mit dem ABI 3500 Genetic Analyzer, die Auswertung mittels SegScape Software 2,7 durchgeführt. Ein doppelter Peak stand hierbei für eine Mutation (siehe Pfeil in Abbildung 13).

Die Basissequenz für die Auswertung lautete: hg19; Transkript ENST00000263121.7.

Die nachgewiesenen Mutationen wurden mittels Datenbankanalysen auf ihre jeweilige Bedeutung (z.B. Einstufung als pathogene Mutation) überprüft (siehe Tab. 5).

TAB. 5: VERWENDETE DATENBANKEN

Verwendete Datenbank	Link
COSMIC	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org/

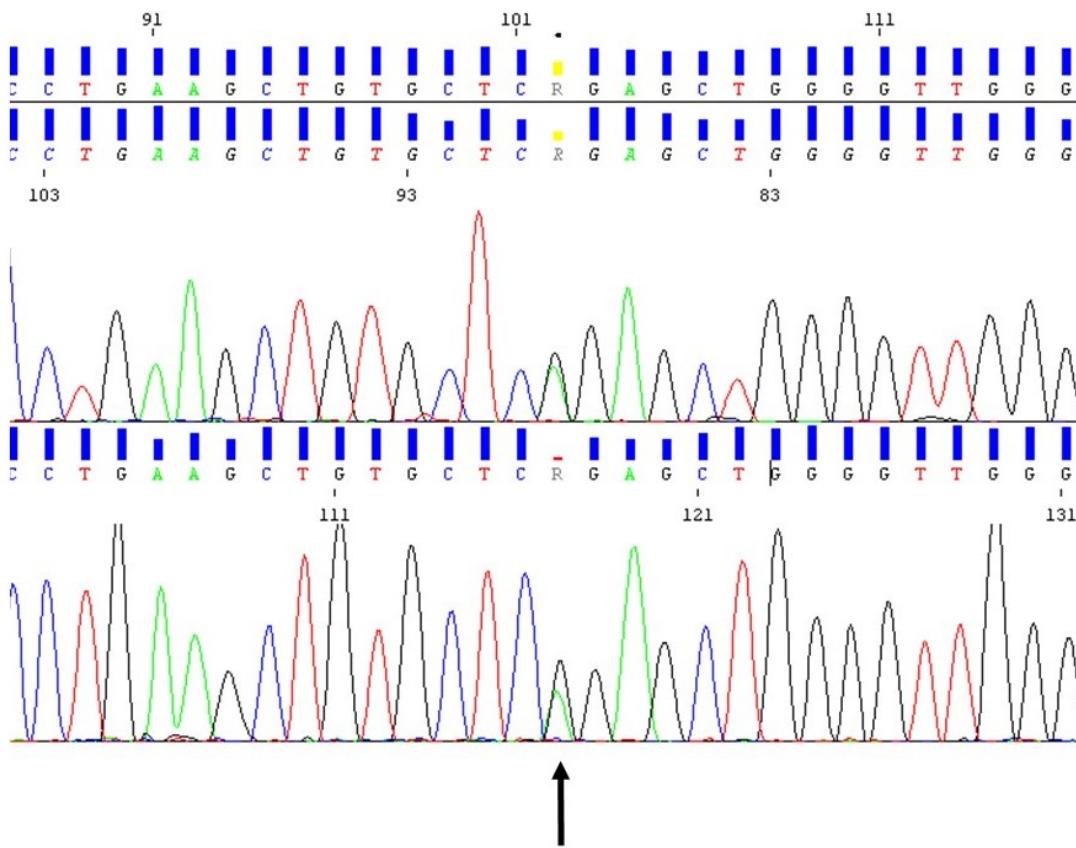


ABB. 13: ELEKTROPHEROGRAMM-DARSTELLUNG IN DER SEQSCAPE SOFTWARE 2.7 EINES KZNZK MIT SMARCB1-MUTATION

3.6 DATENVERARBEITUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Datenerhebung erfolgte mittels Excel, wobei pro Fall für die untersuchten Variablen in jedem vorhanden Differenzierungsgrad und Normalgewebe der Mittelwert ermittelt wurde. Jeder TMA wurde einzeln ausgewertet und die fusionierte Datentabelle aller TMAs für die eigentliche statistische Auswertung in die Statistical Package of Social Science (SPSS) Amos 27 Software überführt.

Die 52 Fälle wurden in Bezug zu den demographischen Daten gesetzt. Die Auswertung und Tabellen finden sich im 4. Kapitel Resultate.

Kontinuierliche und kategoriale Variablen wurden mit deskriptiver Statistik ausgewertet, wobei für die kontinuierlichen Variablen der Mittelwert und die Standardabweichung genutzt, wohingegen für kategoriale Variablen die Häufigkeiten und die relativen Häufigkeiten herangezogen wurden. Für die Korrelationsanalysen wurde die Kreuztabelle mit dem Pearson Chi-Quadrat und dem Fisher-Exact-Test genutzt. Das Gesamtüberleben (OS) sowie das progressionsfreie Überleben (PFS) wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Um verschiedene unterschiedliche Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde mit dem Log-Rank-Test gearbeitet. Die Cox-Regressionsanalysen dienten zur Analyse eines Einflusses der Kovariaten auf das OS und das PFS. Hierfür wurden zuerst ausgewählte Parameter untersucht und anschließend die in der univariaten Analyse signifikanten oder grenzwertig signifikanten Variablen für eine multivariate Analyse herangezogen. Die statistische Signifikanz war durch einen *p*-Wert kleiner als 0,05 definiert.

Fehlende Daten wurden nicht durch Extrapolationsverfahren ergänzt.

IV. RESULTATE

4.1 PATIENT:INNEN- UND TUMORDATEN – KLINISCHE UND PATHOLOGISCHE DATEN

Das Probenkollektiv umfasste 52 kzNZK der Jahrgänge von 2014 bis 2018 mit insgesamt 16 G3- und 36 G4-Fällen. Achtundzwanzig Tumore waren in der rechten, 23 in der linken Niere lokalisiert. Absolut waren 14 weibliche und 38 männliche Patient:innen im Alter von 44 - 84 Jahren (Durchschnittsalter 68,5 Jahre) vertreten. Nach Geschlecht aufgeschlüsselt unterschied sich der Altersdurchschnitt kaum. Er lag bei Männern bei 67,58 und bei Frauen bei 67,43 Jahren (jeweils die Mittelwerte). Der Durchschnitt der überlebten Monate betrug bei den fünfzig übermittelten Daten 24 Monate, die progressionsfreien Monate waren mit 15 Monaten bei 47 Daten kürzer. Bei 55 % der kzNZK kam es zu einem Progress im Verlauf der Erkrankung. Zweiunddreißig Patient:innen waren im Beobachtungszeitraum verstorben, von zwei Patient:innen fehlten die Überlebensdaten. Neun von 28 Fällen hatten Lymphknotenmetastasen und 27 Fälle hatten bereits bei Diagnose oder innerhalb des ersten halben Jahres Fernmetastasen.

Diese demographischen und klinisch-pathologischen Daten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Informationen zum Operationsverfahren waren in fünfzig von 52 Fällen vorhanden. Insgesamt wurde 42-mal eine radikale Nephrektomie und 8-mal eine partielle Resektion vorgenommen. Bei 17 von 52 Patient:innen wurde eine Radiatio durchgeführt. Achtundzwanzig Patient:innen erhielten keine Target Therapie (TT), drei bekamen Nivolumab oder einen anderen PD-L1-Inhibitor, insgesamt zehn erhielten einen VEGF-Inhibitor und elf Patient:innen erhielten eine Kombinations-Target-Therapie.

TAB. 6: KLINISCH-PATHOLOGISCHE DATEN

n Anzahl der Fälle (Frauen/Männer)	52 (14/38)
Durchschnittsalter als Mittelwert (Spannweite)	68,5 (44-84 Jahre)
Alter < 60 vs ≥ 60 Jahre	<60=13, ≥60=39
n Gesamtüberleben (overall survival, OS) Durchschnitt der überlebten Monate (Spannweite)	50 24 (2-61 Monate)
n Progressionsfreies Überleben (progression-free survival, PFS) Durchschnitt der progressionsfreien Monate (Spannweite)	47 15 (3-59 Monate)
Progress n nein/ja (%/%)	21/26 (44,7/55,3)

RESULTATE

Tumorgrad (G) n low grade (G1/G2) n high grade (G3/G4)	0 (0/0) 52 (16/36)
Tumorstadium (T) n low stage (T1/T2) n high stage (T3/T4)	12 (8/4) 40 (37/3)
Nodalstatus (N) n N0/N1 (%/%)	19/9 (67,9/32,1)
Fernmetastasen (cM) n cM0/cM1 (%/%)	22/27 (44,9/55,1)
Lymphgefäßinvasion (L) n L0/L1 (%/%)	42/5 (89,4/10,6)
Venöse Angioinvasion (V) n V0/V1/V2 (%/%%)	16/20/14 (32/40/28)

ERLÄUTERUNGEN: N0 – KEIN REGIONÄRER LYMPHKNOTENBEFALL, N1 – REGIONÄRER LYMPHKNOTENBEFALL, cM0 – KEINE FERNMETASTASEN, cM1 – FERNMETASTASEN, L0 – KEINE LYMPHGEFÄßINVASION, L1 – LYMPHGEFÄßINVASION, V0 – KEINE VENÖSE ANGIOINVASION, V1 – MIKROSKOPISCHE VENENINVASION, V2 – MAKROSKOPISCHE VENENINVASION

In sieben Fällen war keine niedriggradige Komponente, in zwei Fällen war eine G1- und in 26 Fällen eine G2-Komponente vorhanden. Bei 17 Fällen traten beide niedriggradigen Komponenten zusammen auf (Abb. 14).

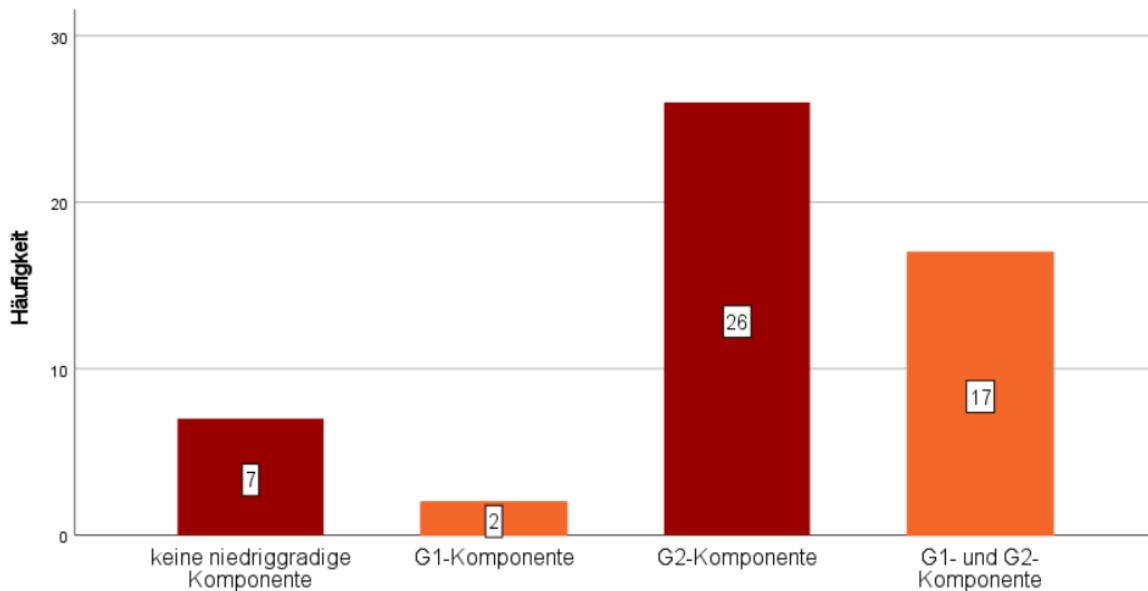


ABB. 14: AUFTREten EINER NIEDRIGGRADIGEN KOMPONENTE

RESULTATE

Am häufigsten waren Tumore des pT3-Stadiums vorhanden (Abb. 15).

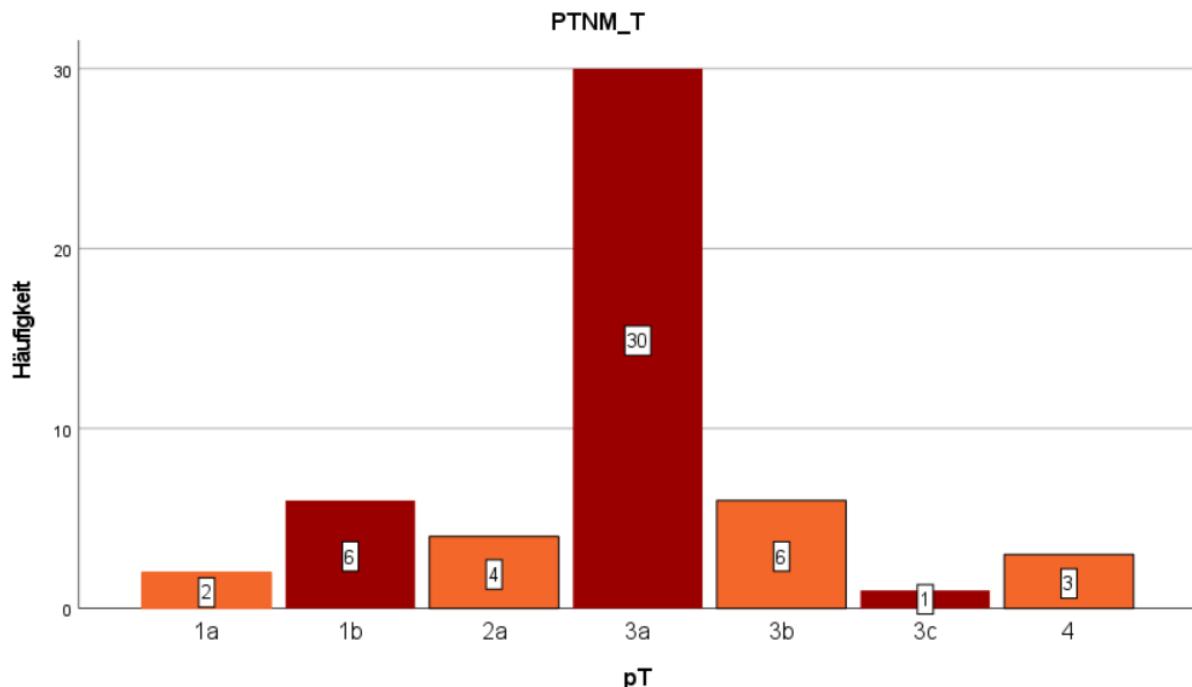


ABB. 15: VERTEILUNG DER T-STADIEN
AM HÄUFIGSTEN WURDE MIT 30 FÄLLEN EIN STADIUM PT3A DIAGNOSTIZIERT

Nur in 28 Fällen wurden Lymphknoten zur Untersuchung entnommen und ein Lymphknotenstatus dokumentiert. In 19 von 28 Fällen gab es keine Lymphknotenmetastase. In vier Fällen bestand ein pN1-Status und in fünf Fällen ein pN2-Status (Tab. 6).

Bei 42 Patient:innen trat keine Lymphbahninvasion auf, in fünf Fällen war sie vorhanden. Eine makroskopische oder mikroskopische venöse Angioinvasion wurde jeweils bei 14 (V2) und zwanzig (V1) kzNZK festgestellt, 16 Fälle zeigten keine Blutgefäßinfiltration (Tab. 6). Bei 33 der 52 Patient:innen konnte der Residualstatus R0 (komplette Resektion) erreicht werden, bei zwei Fällen war es R1 (mikroskopischer Tumornachweis am Absetzungsrand) und bei 17 R2 (makroskopischer Tumornachweis am Absetzungsrand).

Der Tumorgrad stand in keinem Zusammenhang zum Geschlecht (p -Wert = ,376). Auch bezogen auf das Alter gab es keine Korrelation (p -Wert = 1,000).

Signifikant waren Fälle mit rhabdoider und/oder sarkomatoider Tumormorphologie mit einem höheren Tumorgrad assoziiert (p -Wert = <,001) (siehe Kapitel 4.2 und Tab. 7).

Ebenfalls signifikant waren die Unterschiede zwischen dem Tumorgrad und dem Zustand tot oder lebend (p -Wert = ,041) sowie zwischen dem Tumorgrad und dem Auftreten einer Angioinvasion (p -Wert = ,041). Es zeigte sich ein Trend dahin, dass Karzinome mit Fernmetastasierung einen höheren Tumorgrad aufwiesen (p -Wert = ,064) (Tab. 7).

TAB. 7: KORRELATIONSANALYSEN: TUMORGRAD MIT VERSCHIEDENEN PARAMETERN

Tumorgrad vs.	p-Wert
SWI/SNF-Komplex-Proteinverlust	,013 (siehe Ergebnisse Kapitel 4.3)
SMARCB1-Mutation vorhanden vs. nicht vorhanden	,925
Geschlecht männlich vs. weiblich	,376
Alter < 60 vs. ≥ 60 Jahre	1,000
tot vs. lebend	,041
Progress vs. kein Erkrankungsprogress	,263
Sarkomatoide/rhabdoide Komponente	<,001
pT1 vs. pT2 vs. pT3 vs. pT4	,161
Lymphknotenmetastasen N0 vs. N1 vs. N2	,981
Fernmetastase M0 vs. M1	,064
Lymphbahninvasion L0 vs. L1	,105
Angioinvasion V0 vs. V1 vs. V2	,041
Residualstadium R0 vs. R1 vs. R2	,408

4.2 MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG UND IMMUNHISTOCHEMISCHE UND ZYTOGENETISCHE DIAGNOSEVALIDIERUNG

Wie bereits in Kapitel 3.2 – Erstellung der TMA erläutert, wurde jedes Areal dreimal gestanzt. Alles in allem waren es 798 Stanzen, die ausgewertet wurden. Da jede Stanze auf insgesamt zwölf Objekträgern mit verschiedenen Markern genutzt wurde, ergab sich eine Gesamtzahl von 9576. Von diesen konnten 1045 Stanzen nicht ausgewertet werden (10,91 %), da z. B. eine Nekrose getroffen wurde oder es zu einem Stanzausfall kam.

Am konventionellen Gewebeschnitt wurden die untersuchten Karzinome bezüglich des Vorhandenseins einer sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Tumorkomponente mikroskopiert. In 36 Fällen war eine rhabdoide und/oder sarkomatoide Morphologie vorhanden, in 16 Fällen fehlte sie.

Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer undifferenzierten Komponente und dem Auftreten eines Proteinverlustes (p -Wert = ,013). In zehn von 16 Fällen ohne eine sarkomatoide und/oder rhabdoide Komponente trat kein Proteinverlust auf (siehe Kapitel 4.3).

RESULTATE

Signifikant waren Fälle mit rhabdoider und/oder sarkomatoider Tumormorphologie mit einem höheren Tumorgrad assoziiert (p -Wert = <,001) (Tab. 8).

Ebenfalls signifikant waren die Unterschiede zwischen der undifferenzierten Komponente und dem Zustand tot oder lebend (p -Wert = ,041) sowie zwischen dem Vorhandensein einer sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Komponente und dem Auftreten einer Angioinvasion (p -Wert = ,041) (Tab. 8).

TAB. 8: KORRELATIONSANALYSEN: UNDIFFERENZIERTE KOMPONENTE MIT VERSCHIEDENEN PARAMETERN

Sarkomatoide und/oder rhabdoide Komponente vs.	p-Wert
SWI/SNF-Komplex-Proteinverlust	,013
SMARCB1-Mutation vorhanden vs. nicht vorhanden	,925
Geschlecht männlich vs. weiblich	,376
Alter < 60 vs. ≥ 60 Jahre	1,000
tot vs. lebend	,041
Progress vs. kein Erkrankungsprogress	,263
Tumorgrad	<,001
pT1 vs. pT2 vs. pT3 vs. pT4	,161
Lymphknotenmetastasen N0 vs. N1 vs. N2	,981
Fernmetastase M0 vs. M1	,064
Lymphbahninvasion L0 vs. L1	,105
Angioinvasion V0 vs. V1 vs. V2	,041
Residualstadium R0 vs. R1 vs. R2	,408

Die Diagnose eines kzNZK, insbesondere bei rhabdoider oder sarkomatoider Morphologie, wurde durch Zusatzuntersuchungen validiert. Bei insgesamt 48 von 52 Fällen war zum einen der CD10-Marker positiv und zum anderen der CK7-Marker negativ. In jeweils zwei Fällen war entweder CD10 negativ oder CK7 positiv. Es handelte sich nicht um die gleichen Fälle. Außerdem zeigten alle vier Fälle einen VHL-Verlust, sodass letztendlich die Diagnose eines kzNZK gesichert werden konnte.

Fünfzig von 52 Fällen zeigten einen *VHL*-Verlust in der Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (96,2 %).

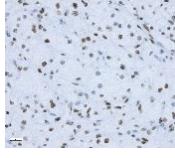
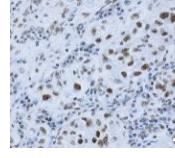
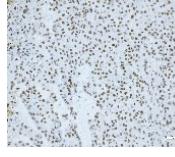
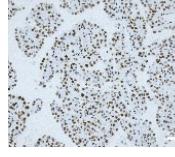
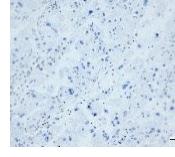
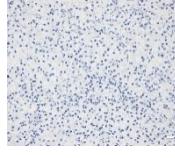
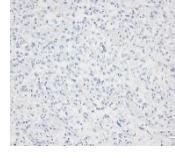
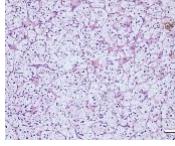
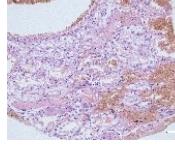
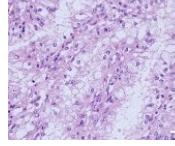
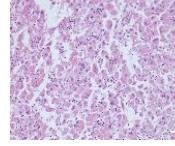
4.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DES SWI/SNF-KOMPLEXES

Ein kompletter SWI/SNF-Komplex Proteinverlust wurde in 21 von 52 Fällen nachgewiesen; ein partieller kam in zwölf von 52 Fällen vor. In Tabelle 9 wird dargestellt, dass bezüglich der einzelnen untersuchten Marker die Verluste von BAF180 und SMARCB1 am häufigsten waren, gefolgt von Verlusten der SMARCC1- und ARID1A-Expression, dann SMARCA2-Verluste. Es gab keine Verluste von SMARCC2. Es wurden bereits in der G1- und G2-Komponente in zwei und zehn Fällen ein kompletter Verlust, in zwei und acht Fällen ein partieller Verlust von einem oder mehreren der Proteine nachgewiesen (Tab. 9). Die unterschiedliche Verteilung von Komplett- und Partialverlusten zeigt Tabelle 10.

TAB. 9: HÄUFIGKEIT DES KOMPLETTEN UND PARTIALEN SWI/SNF-PROTEINVERLUSTS MIT BEISPIELHAFTEN ABBILDUNGEN

Tumor-grad Marker \ Normal- gewebe n (%)	G1 n (%)	G2 n (%)	G3 n (%)	G4 n (%)	
SMARCB1	0	1 (7,1)	11 (28,9)	5 (14,3)	5 (19,2)
SMARCA2	0	0	3 (7,9)	2 (8,6)	6 (23,1)
SMARCA4	0	0	0	2 (5,8)	1 (3,8)
SMARCC1	0	1 (11,1)	6 (15,8)	4 (11,4)	3 (11,5)

RESULTATE

Tumor-grad Marker	Normal- gewebe n (%)	G1 n (%)	G2 n (%)	G3 n (%)	G4 n (%)
SMARCC2	0	0	0	0	0
					
ARID1A	0	1 (7,1)	4 (10,6)	4 (11,5)	6 (23,1)
					
BAF180	1 (2,2)	2 (15,4)	13 (33,3)	8 (22,8)	7 (26,9)
					
HE					

ANMERKUNG: DIE ABBILDUNGEN ZEIGEN BEISPIELE MIT UND OHNE NUKLEÄREN EXPRESSIONSVERLUST DER JEWELLS IMMUNHISTOCHEMISCH UNTERSUCHTEN BIOMARKER. IN DER LETZTEN ZEILE WIRD JEWELLS DIE HE-MORPHOLOGIE VON NORMALGEWEBE UND KLAZELLIGEN NIERENZELLKARZINOME DER VERSCHIEDENEN DIFFERENZIERUNGSGRADE DARGESTELLT.

TAB. 10: KOMPLETT- UND PARTIALVERLUSTE DER EINZELNEN SWI/SNF-KOMPLEX-PROTEINE

	Komplettverluste n (%)	Partialverluste n (%)
SMARCB1	11 (21,15)	12 (23,08)
SMARCA2	6 (11,54)	5 (9,61)
SMARCA4	2 (3,85)	0
SMARCC1	10 (19,23)	2 (3,85)
SMARCC2	0	0
ARID1A	11 (21,15)	1 (1,92)
BAF180	16 (30,77)	6 (11,54)

Es zeigte sich, dass ein Komplettverlust eher in den Fällen auftrat, die als hochgradige Komponente eingestuft wurden (p -Wert = ,013). Das veranschaulicht Tabelle 11.

TAB. 11: VERGLEICH NIEDRIG- UND HOCHGRADIGE MORPHOLOGIE BEZÜGLICH DER SWI/SNF-KOMPLEX-PROTEINVERLUSTE

	Niedriggradig		Hochgradig	
	Häufigkeit	in %	Häufigkeit	in %
Kein Verlust	23	44,2	23	44,2
Komplettverlust	12	23,1	18	34,6
Partialverlust	9	17,3	6	11,5
Gesamt	44	84,6	47	90,4

Sechsunddreißig von 52 Fällen besaßen eine sarkomatoide und/oder rhabdoide Komponente (siehe Kapitel 4.2). Insgesamt waren 31 Fälle mit rhabdoider Komponente vorhanden, von denen 18 Fälle einen Proteinverlust aufwiesen. Von den 25 sarkomatoiden Fällen wiesen 13 einen Verlust auf.

Neunzehn von 36 klarzelligen Nierenzellkarzinomen mit rhabdoider und/oder sarkomatoider Komponente zeigten einen kompletten Proteinverlust. Es zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen dem Mangel und der rhabdoiden und/oder sarkomatoiden Morphologie (p -Wert = ,013) (Tab. 12).

In den Korrelationsanalysen wurden in den 28 Fällen mit positivem Nodalstatus jeweils drei Komplettverluste und drei Partialverluste gefunden (p -Wert = ,210). Von den 47 Fällen mit übermittelte Eigenschaft der Lymphbahninvasion, traten alle fünf nachgewiesenen Lymphgefäßinvasionen entweder bei einem Komplettverlust ($n = 2$) oder bei einem Partialverlust ($n = 3$) auf (p -Wert = ,077). In 16 und sieben Fällen mit venöser Angioinvasion zeigte sich jeweils ein Komplett- bzw. Partialverlust (p -Wert = ,732). In neun und sechs Fällen mit Fernmetastase(n) zeigten sich jeweils ein Komplett- bzw. Partialverlust (p -Wert = ,377). Es wurden in den 19 Fällen mit positivem Resektionsrand (R1 oder R2) jeweils neun Komplett- und vier Partialverluste gefunden (p -Wert = ,527).

Insgesamt kam es bei zehn von 13 Patient:innen (70 %) unter 60 Jahren zu einem Komplett- oder Teilverlust eines Proteins. Bei den Patient:innen über 60 Jahren trat dieser Verlust in 23 von 39 Fällen (59 %) auf (p -Wert = ,265). Weitere untersuchte Parameter zeigten in Bezug zum SWI/SNF-Proteinverlust in den Korrelationsanalysen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (p -Wert > 0,05) (siehe Tab. 12).

RESULTATE

TAB. 12: ZUSAMMENGEFASSTE ERGEBNISSE DER KORRELATIONSANALYSEN: SWI/SNF-KOMPLEX-PROTEINVERLUST IN BEZUG ZU KLINISCH-PATHOLOGISCHEN PARAMETERN

Proteinverlust vs.	p-Wert
SMARCB1-Mutation vorhanden vs. nicht vorhanden	,780
Geschlecht männlich vs. weiblich	,672
Alter >60 vs. bis 60 Jahre	,265
tot vs. lebend	,391
Progress vs. kein Erkrankungsprogress	,624
Tumorgrad G1 vs. G2 vs. G3 vs. G4	,013
Rhabdoide/sarkomatoide Komponente	,013
pT1 vs. pT2 vs. pT3 vs. pT4	,125
Lymphknotenmetastase N0 vs. N1 vs. N2	,210
Lymphbahnnvasion L0 vs. L1	,077
Angioinvasion V0 vs. V1 vs. V2	,732
Fernmetastasen M0 vs. M1	,377
Residualstadium R0 vs. R1 vs. R2	,527

4.3.1 SMARCB1

Von den 16 G3-Tumoren hatten vier einen Partialverlust von SMARCB1. Hingegen trat in 22 der 36 G4-Tumore ein Komplett- oder Partialverlust auf (p -Wert =,019) (Tab. 13).

TAB. 13: SMARCB1 IN BEZUG ZUM TUMORGRAD

	Tumorgrad 3	Tumorgrad 4	Gesamt
Kein Verlust	12	14	26
Komplettverlust	0	11	11
Partialverlust	4	11	15
Gesamt	16	36	52

RESULTATE

Ein Verlust von SMARCB1 trat signifikant häufiger in sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Tumoren auf (p -Wert = ,019) (Tab. 14).

TAB. 14: SMARCB1 IN BEZUG ZU EINER DEDIFFERENZIERUNG

	Keine sarkomatoide oder rhabdoide Komponente	Sarkomatoide oder rhabdoide Komponente vorhanden	Gesamt
Kein Verlust	12	14	26
Komplettverlust	0	11	11
Partialverlust	4	11	15
Gesamt	16	36	52

Nach Geschlecht aufgeschlüsselt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich eines Verlustes von SMARCB1 (p -Wert = ,259).

Auch bezogen auf das Alter der Patient:innen (< 60 Jahre, \geq 60 Jahre) ließ sich keine signifikante Aussage bezüglich eines Proteinverlust treffen (p -Wert = ,640).

Bezogen auf das pT-Stadium traten die meisten Verluste in pT3 auf (p -Wert = ,380) (Tab. 15).

TAB. 15: SMARCB1 IN BEZUG ZUM PT-STADIUM

	pT1	pT2	pT3	pT4	Gesamt
Kein Verlust	5	1	18	2	26
Komplettverlust	2	0	9	0	11
Partialverlust	1	3	10	1	15
Gesamt	8	4	37	3	52

Hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen einer Lymphbahninvasion und einem Verlust von SMARCB1 ließ sich kein signifikanter Zusammenhang feststellen (p -Wert = ,214).

Mehr Proteinverluste fanden sich in Fällen mit Angioinvasion (V1 oder V2) als in Fällen ohne nachgewiesene venöse Angioinvasion (V0) (p -Wert = ,147) (Tab. 16).

TAB. 16: SMARCB1 IN BEZUG ZUR ANGIOINVASION

	V0	V1	V2	Gesamt
Kein Verlust	10	11	4	25
Komplettverlust	2	6	3	11
Partialverlust	4	3	7	14
Gesamt	16	20	14	50

Bezüglich des Residualstadiums ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge darstellen (p -Wert = ,511) genauso wenig wie beim Status tot oder lebend (p -Wert = ,633). Auch auf einen Progress hatte der Verlust von SMARCB1 keine signifikante Auswirkung (p -Wert = ,725). Bei weiteren Untersuchungen bezüglich des Proteinverlusts von SMARCB1 traten keine Signifikanzen auf.

Die einzelnen p -Werte finden sich zusammengefasst in Tabelle 22.

4.3.2 SMARCA2 UND SMARCA4

Die beiden Komplettverluste von SMARCA4 traten zusammen mit einem Komplettverlust von SMARCA2 auf (p -Wert = ,000) (Tab 17).

TAB. 17: SMARCA2 IN BEZUG ZU SMARCA4

		SMARCA4		
		Kein Verlust	Komplettverlust	Gesamt
SMARCA2	Kein Verlust	41	0	41
	Komplettverlust	3	2	5
	Partialverlust	6	0	6
	Gesamt	50	2	52

Außerdem handelte es sich bei diesen Tumoren mit SMARCA4-Ausfall um rhabdoide und/oder sarkomatoide Tumore (p -Wert = ,336) (Tab. 18).

RESULTATE

TAB. 18: SMARCA4 IN BEZUG ZU EINER DEDIFFERENZIERUNG

	Keine sarkomatoide oder rhabdoide Komponente	Sarkomatoide oder rhabdoide Komponente vorhanden	Gesamt
Kein Verlust	16	34	50
Komplettverlust	0	2	2
Gesamt	16	36	52

4.3.3 BAF180

Ein Verlust von BAF180 stand in keinem signifikanten Zusammenhang mit dem Geschlecht (p -Wert = ,925), dem Alter unter oder größer/gleich 60 Jahren (p -Wert = ,741), dem Zustand tot oder lebend (p -Wert = ,958) oder dem Vorhandensein eines Progresses (p -Wert = ,500). Jedoch fand sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Verlust und dem Tumorgrad (p -Wert = ,044) (Tab. 19).

TAB. 19: BAF180 IN BEZUG ZUM TUMORGRAD

	Tumorgrad 3	Tumorgrad 4	Gesamt
Kein Verlust	10	20	30
Komplettverlust	2	14	16
Partialverlust	4	2	6
Gesamt	16	36	52

Die Komplettverluste von BAF180 fanden sich hauptsächlich im pT3-Stadium (p -Wert = ,334) (Tab. 20).

TAB. 20: BAF180 AUFGESCHLÜSSELT NACH PT-STADIEN

	pT1	pT2	pT3	pT4	Gesamt
Kein Verlust	5	1	22	2	30
Komplettverlust	2	1	12	1	16
Partialverlust	1	2	3	0	6
Gesamt	8	4	37	3	52

RESULTATE

Es bestand kein Zusammenhang zwischen dem Proteinverlust von BAF180 und dem Auftreten einer Lymphknotenmetastase (p -Wert = ,798), einer Lymphbahnnvasion (p -Wert = ,454) oder dem Residualstadium (p -Wert = ,234). Allerdings zeigte sich ein Trend zwischen dem Verlust und der Angioinvasion (p -Wert = ,158).

Ein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen *BAF180*-Expressionsverlust und dem Vorhandensein einer sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Komponente (p -Wert = ,044) (Tab. 21).

TAB. 21: BAF180 IN BEZUG ZUR SARKOMATOÏDEN UND/ODER RHABDOÏDEN KOMPONENTE

	Keine sarkomatoide oder rhabdoide Komponente	Sarkomatoide oder rhabdoide Komponente vorhanden	Gesamt
Kein Verlust	10	20	30
Komplettverlust	2	14	16
Partialverlust	4	2	6
Gesamt	16	36	52

Die p -Werte sämtlicher Proteine sind in Tabelle 22 aufgelistet. Für SMARCC2 wurden keine Korrelationsanalysen durchgeführt, da dort keine Verluste auftraten.

TAB. 22: ÜBERSICHT ÜBER DIE ERGEBNISSE DER KORRELATIONSANALYSEN AUFGESCHLÜSSELT NACH DEN INDIVIDUELLEN PROTEINEN

Parameter	p-Wert folgender Proteine:					
	SMARCB1	SMARCA2	SMARCA4	SMARCC1	ARID1A	BAF180
Geschlecht männlich vs. weiblich	,259	,391	,453	,556	,624	,925
Alter < vs. \geq 60 Jahre	,640	,319	,405	,368	,691	,741
tot vs. lebend	,633	,129	,279	,221	,663	,958
Progress vs. kein Erkrankungsprogress	,725	,421	,194	,988	,332	,500
Tumorgrad	,190	,591	,336	,258	,450	,044

	<i>p</i> -Wert folgender Proteine:					
Parameter	SMARCB1	SMARCA2	SMARCA4	SMARCC1	ARID1A	BAF180
Sarkomatoid/ Rhabdoid	,019	,591	,336	,258	,450	,044
pT1 vs. pT2 vs. pT3 vs. pT4	,380	,921	,566	,884	,336	,334
Lymphknoten- metastase N0 vs. N1 vs. N2	,327	,697	,782	,637	,138	,798
Fernmetastase M0 vs. M1	,734	,522	,856	,443	,788	,738
Lymphbahn-in- vasion L0 vs. L1	,214	,425	,618	,383	,919	,454
Angioinvasion V0 vs. V1 vs. V2	,147	,671	,495	,172	,568	,158
Residualstadium R0 vs. R1 vs. R2	,511	,701	,848	,761	,822	,234

4.4 MUTATIONSANALYSEN – AUSWERTUNG

Es wurden 26 Fälle mit *SMARCB1*-Verlust mittels Sanger-Sequenzierung aller neun Exons des *SMARCB1*-Gens auf Präsenz einer Mutation untersucht. Bei sieben Fällen konnten zwei bis vier Exons nicht ausgewertet werden.

In sieben von 26 Fällen (27 %) wurde eine *SMARCB1*-Mutation nachgewiesen, bei einem der sieben Fälle traten zwei Mutationen auf. Es handelte sich ausschließlich um Punktmutationen. Alle diese Mutationen sind laut dem bioinformatischen Vorhersage-Werkzeug (Prediction Tool) MutationTaster als pathogen einzustufen.

Bei vier Mutationen gab es eine Differenz zwischen den Aussagen von PolyPhen und MutationTaster, ob die Mutation benigne oder potentiell pathologisch ist.

Bei der Mutation R316Q deuteten sowohl PolyPhen als auch MutationTaster auf eine pathologische Wirkung der Genaberration hin, laut ClinVar war noch nicht geklärt, ob die Mutation pathologisch oder benigne ist (uncertain significance – uncert. Sig.).

Die entsprechenden Funktionen aller gefundenen Mutationen wurden bisher noch nicht beschrieben. Es könnte sich theoretisch sowohl um aktivierende als auch inaktivierende Mutationen handeln, sie könnten aber auch funktionslos sein.

Die Zahlen in Tabelle 23 zeigen das programminterne Bewertungssystem an.

RESULTATE

TAB. 23: MUTATIONEN UND VERWENDETE DATENBANKEN UND DEREN AUSSAGEN

Mutation	Cosmic	ClinVar	PolyPhen2	MutationTaster
E105G	Nicht bekannt (n. b.)	n.b.	0,024 (benign)	disease causing
S113G	n.b.	n.b.	0,000 (benign)	disease causing
T114A	n.b.	n.b.	0,005 (benign)	disease causing
D227Y	n.b.	n.b.	0,995 (prob. damaging)	disease causing
R261H	pathologisch (0.99)	n.b.	0,969 (prob. damaging)	disease causing
L297P	n.b.	n.b.	0,999 (prob. damaging)	disease causing
E306fs14*	n.b.	n.b.	n.a.	disease causing
R316Q	n.b.	Uncert. Sig.	1.000 (prob. damaging)	disease causing

ANMERKUNG: DAS STERNCHEN BEI DER MUTATION E306FS14* BEDEUTETE, DASS AN DER POSITION 360 EINE INSERTION ODER DELETION AUFTRAT UND DADURCH DAS LESENASTER DER CODON-TRIPPLETS VERSCHOBEN WURDE UND ES NACH 14 CODONS ZU EINEM STOPPCODON KAM. DIESE MUTATION KANN ZUM PROTEINAUSFALL GEFÜHRT HABEN.

Bei der Gegenüberstellung vom Auftreten einer Mutation mit dem Tumorgrad zeigte sich, dass sechs der sieben Mutationen bei einem Grad 4 Tumor auftraten (p -Wert = ,925) (Tab. 24).

TAB. 24: MUTATION IN BEZUG ZUM TUMORGRAD

	Keine Mutation	Mutation vorhanden	Gesamt
Tumorgrad 3	3	1	4
Tumorgrad 4	16	6	22
Gesamt	19	7	26

Auch im Bezug zum pT-Stadium ließ sich diese Tendenz erkennen. So traten die sieben Mutationen entweder im pT3- oder pT4-Stadium auf (p -Wert = ,162) (Tab. 25).

RESULTATE

TAB. 25: MUTATION IM BEZUG ZUM PT-STADIUM

	Keine Mutation	Mutation vorhanden	Gesamt
pT1	3	0	3
pT2	3	0	3
pT3	13	6	19
pT4	0	1	1
Gesamt	19	7	26

Ein Zusammenhang bestand zwischen dem Auftreten einer Mutation und dem Auftreten einer Metastase innerhalb der ersten sechs Monate (*p*-Wert = ,076), wobei hierbei wichtig zu erwähnen ist, dass in den Fällen mit einer Mutation in sechs von sieben Fällen keine Metastase auftrat. In ähnlicher Weise bestanden bei allen sieben Fällen mit *SMARCB1*-Mutation ein Residualstadium R0 (*p*-Wert = ,060).

TAB. 26: ERGEBNISSE DER KORRELATIONSANALYSEN FÜR DIE *SMARCB1*-MUTATION VS. WILDTYP IN BEZUG ZU KLINISCH-PATHOLOGISCHEMEN PARAMETERN

SMARCB1-Mutation/Wildtyp vs.	<i>p</i>-Wert
Geschlecht männlich vs. weiblich	,694
Alter >60 vs. bis 60 Jahre	,378
tot vs. lebend	,450
Progress vs. kein Erkrankungsprogress	,859
G1 vs. G2 vs. G3 vs. G4	,925
Sarkomatoide/rhabdoide Komponente	,925
pT1 vs. pT2 vs. pT3 vs. pT4	,162
Lymphknotenmetastase N0 vs. N1	,160
Metastasen innerhalb von 6 Monaten	,076
Fernmetastasen M0 vs. M1	,123
Lymphbahninvasion L0 vs. L1	,299
Angioinvasion V0 vs. V1	,629
Residualstadium R0 vs. R1 vs. R2	,060

4.5 ÜBERLEBENSANALYSEN

Bis zur Erfassung der Daten der letzten Information (Februar 2020) waren 18 von 52 Patient:innen noch am Leben, 32 waren inzwischen gestorben. Von zwei Patient:innen fehlten die Angaben. Die Anzahl der überlebten Monate reichte von zwei bis 61 Monate mit einem Mittelwert von 27,7 Monaten (Median 24 Monate).

Bei 47 von 52 Patient:innen gab es Informationen, ob ein Progress stattfand oder nicht. In 26 Fällen kam es zu einem Progress. Die progressionsfreien Monate reichten von drei bis zu 59 Monaten mit einem Mittelwert von 20,36 Monate (Median = 15 Monate).

Bei der genauen Betrachtung der Fälle mit komplettem Verlust zeigte sich, dass 14 der 19 Patient:innen gestorben waren (von zwei Fällen mit komplettem Proteinverlust fehlten die Überlebensdaten), wohingegen von den weiteren 31 Fällen 18 Personen verstarben (p -Wert = ,501) (Tab. 27). Ein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen dem SWI/SNF-Verlust in einer hochgradigen Tumorkomponente (vs. kein Verlust) und einer verkürzten Überlebenszeit (p -Wert = ,007) (Abb. 16).

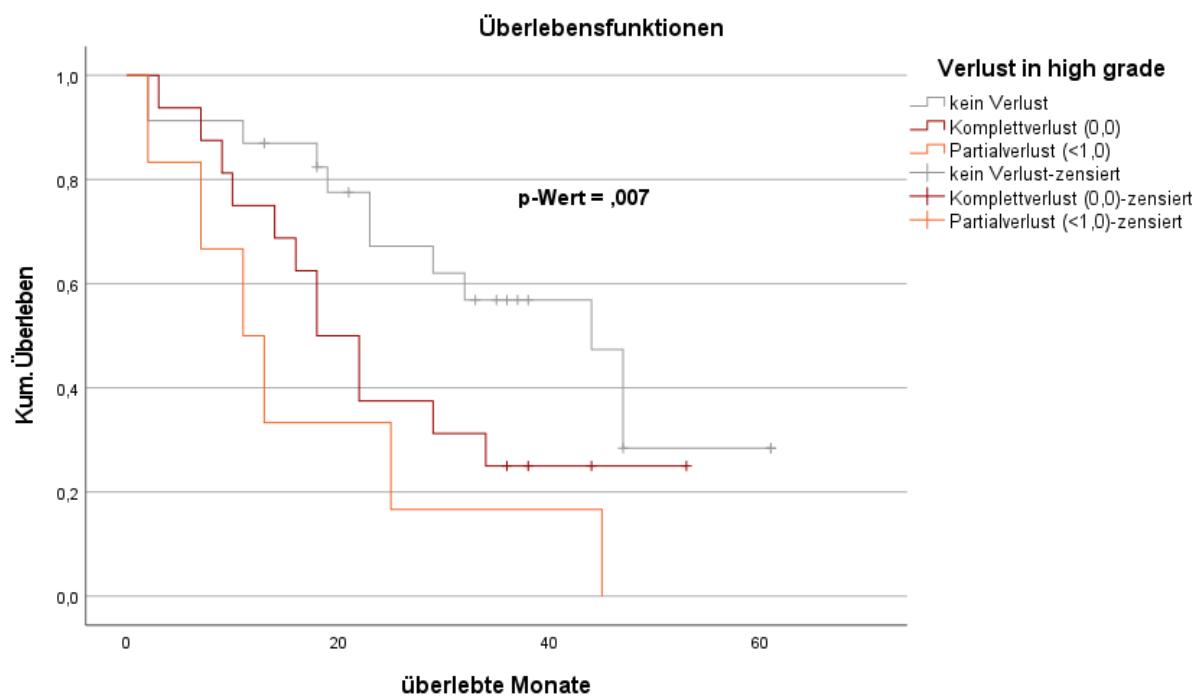


ABB. 16: ÜBERLEBEN ABHÄNGIG VOM PROTEINVERLUST IN HOCHGRADIGEN KOMPONENTEN

RESULTATE

TAB. 27: PROTEINVERLUST IN ZUSAMMENHANG MIT EREIGNIS TOT GESETZT

	Gesamtzahl	Anzahl von Ereignissen	Zensiert N	Zensiert %
Kein Verlust	19	10	9	47,4 %
Komplettverlust	19	14	5	26,3 %
Partialverlust	12	8	4	33,3 %
Gesamt	50	32	18	36,0 %

Das progressionsfreie Überleben war nicht abhängig vom Proteinverlust (p -Wert = ,925).

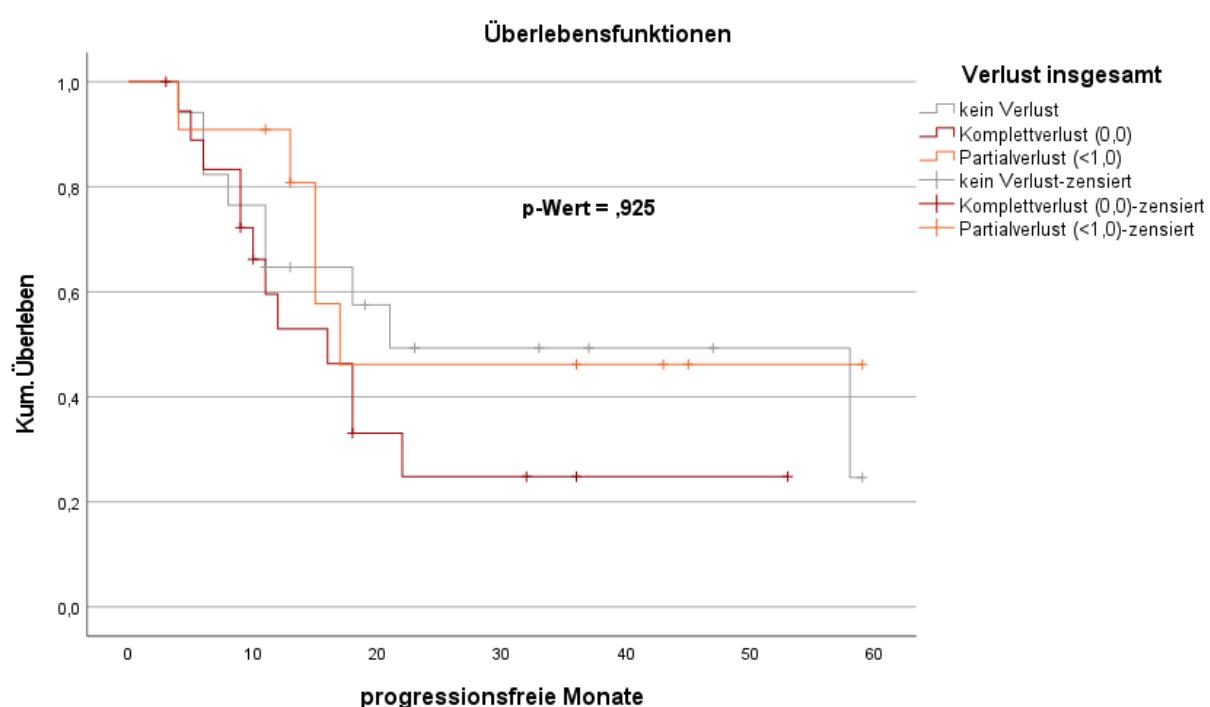


ABB. 17: PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN ABHÄNGIG VOM PROTEINVERLUST

Bezogen auf SMARCC1 zeigte sich keine Tendenz, dass ein Verlust zu einem kürzeren Überleben führt (p -Wert = ,510).

Auch bei SMARCA4 zeigte sich weder ein Zusammenhang zwischen dem Verlust und dem Gesamtüberleben (p -Wert = ,339) noch zwischen dem Verlust und dem progressionsfreien Überleben (p -Wert = ,523).

Bei BAF180 zeigte sich in dieser Studie ebenfalls keine Tendenz, ob ein Verlust das Überleben beeinflusst (p -Wert = ,727).

Das Auftreten einer SMARCB1-Mutation hatte keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (p -Wert = ,450).

RESULTATE

Die Überlebensfunktionskurven der Patient:innen bis zum 60. Lebensjahr und die der Patient:innen über oder gleich 60 Jahren lagen nahe beieinander, wobei tendenziell eher die der jüngeren schlechter verlief (p -Wert = ,404) (Abb. 18).

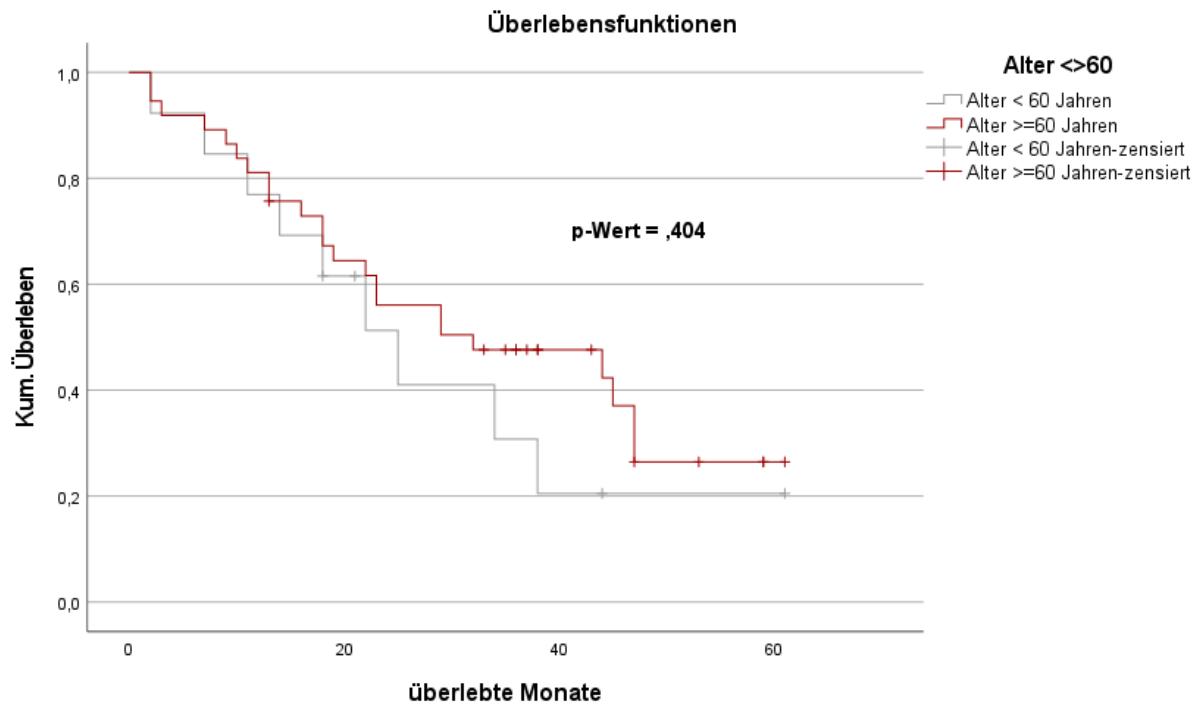


ABB. 18: ÜBERLEBEN ABHÄNGIG VOM ALTER

Beim progressionsfreien Überleben zeigte sich, dass die Patient:innen unter 60 Jahren eine signifikant kürzere progressionsfreie Zeit hatten als Patient:innen über 60 Jahren (p -Wert = ,032).

Im paarweisen Vergleich der Kategorie hochgradiger Fälle zeigte sich, dass Patient:innen mit einem Grad 3 Tumor eine höhere Wahrscheinlichkeit zu überleben hatten als mit einem Grad 4 Tumor (p -Wert = ,055). Bei den progressionsfreien Monaten zeigte sich diesbezüglich ein ähnliches Bild (p -Wert = ,073).

Das Vorhandensein einer sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Komponente beeinflusste das Überleben. Die Patient:innen mit einem kzNZK mit sarkomatoider/rhabdoider Komponente sind früher verstorben als Patient:innen ohne die undifferenzierte Tumorkomponente (p -Wert = ,055) (Abb. 19).

Auch bei der Betrachtung des progressionsfreien Überlebens zeigte sich, dass eine sarkomatoide und/oder rhabdoide Komponente diesen Zeitraum verkürzte (p -Wert = ,073).

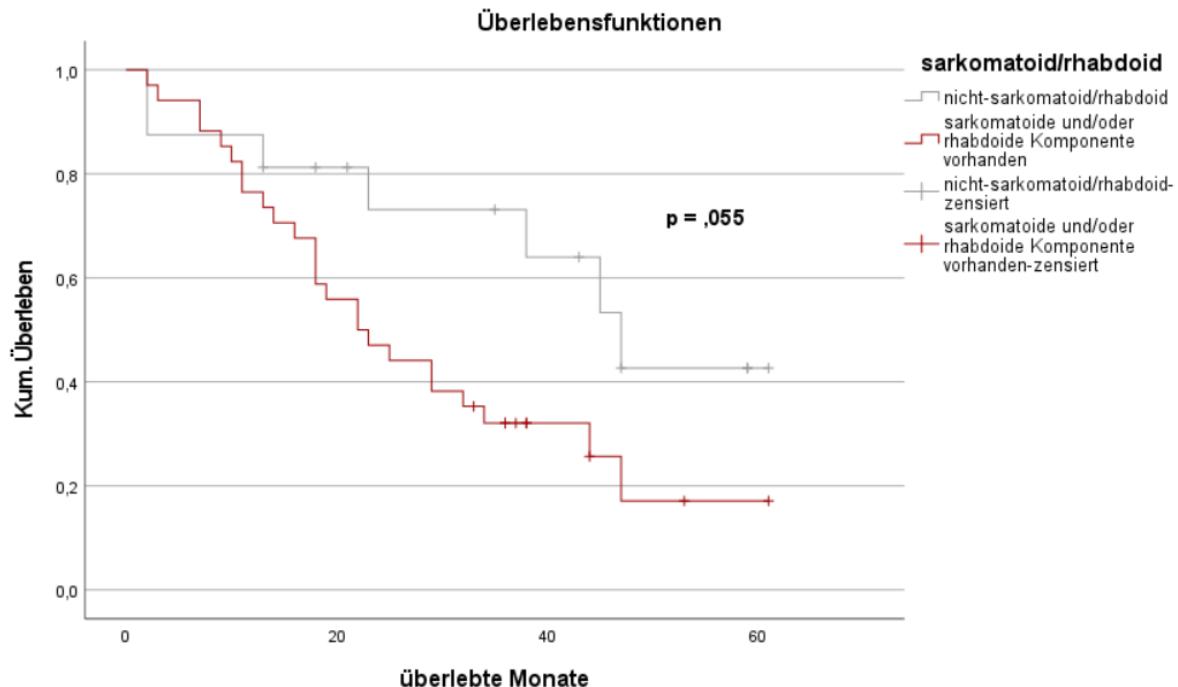


ABB. 19: GESAMTÜBERLEBEN ABHÄNGIG VON EINER SARKOMATOÏDEN UND/ODER RHABDOÏDEN KOMPONENTE

Außerdem verzeichnete sich ein Trend, dass bei einer Lymphbahninvasion das Überleben im Vergleich zu einem L0 Stadium verkürzt war (p -Wert = ,391).

Siebenundzwanzig von 49 Patient:innen entwickelten im Verlauf von sechs Monaten eine Metastase. Diese hatten eine schlechtere Prognose beim Überleben (p -Wert = ,112).

Hatten die Patient:innen eine Fernmetastase bei Diagnose, sank das Überleben signifikant (p -Wert = ,024) (Abb. 20).

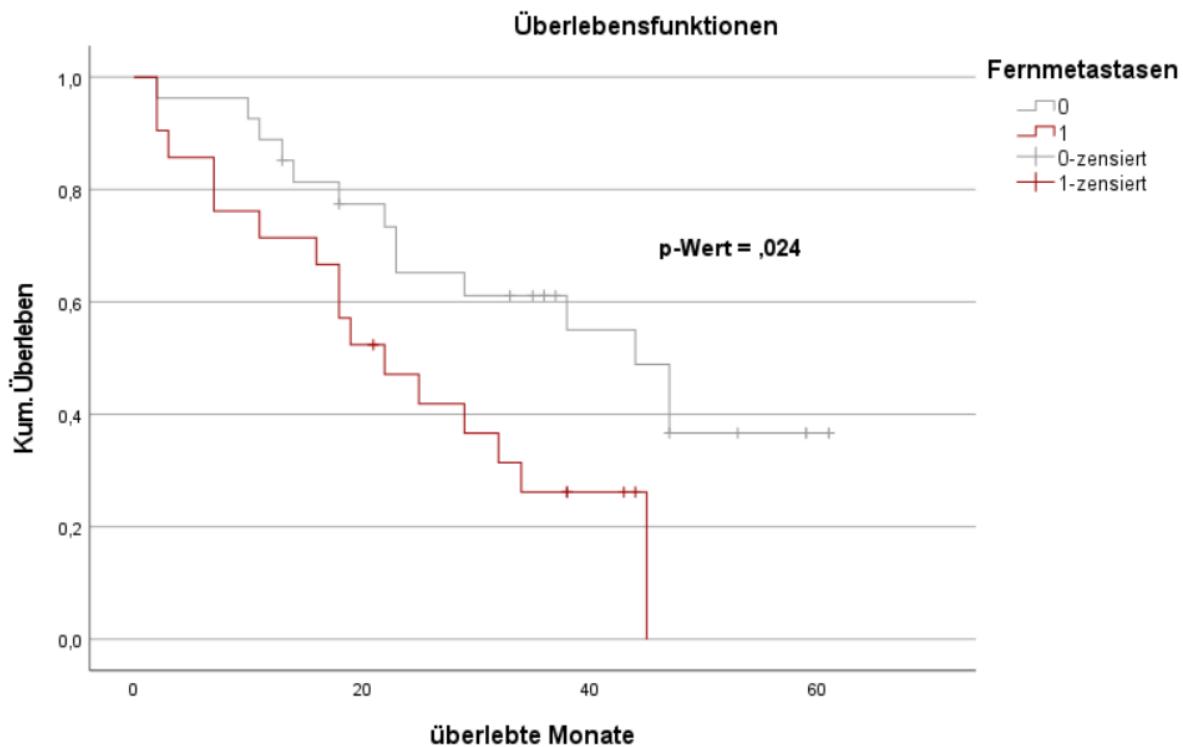


ABB. 20: ÜBERLEBEN ABHÄNGIG VON EINER FERNMETASTASE

Bei den progressionsfreien Monaten trat ein ähnliches Bild auf. Der p -Wert betrug im Bezug zum Auftreten einer Metastase in den ersten sechs Monaten ,054 und im Bezug zu einer Fernmetastase ,153.

Das Residualstadium stand im Bezug zu einem kürzeren Überleben (p -Wert = ,033). Patient:innen mit einer erreichten R0-Resektion überlebten länger als Patient:innen mit einem R2-Status.

Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass das Überleben nicht abhängig war von der Art der Operation. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der partiellen oder totalen Nephrektomie (p -Wert = ,433).

Vierundzwanzig von 52 Patient:innen erhielten eine TT. Interessant hierbei war, dass die drei Patient:innen mit der PD-L1-Inhibitor-Therapie noch alle lebten, wohingegen bei den anderen Therapieoptionen mehr Patient:innen gestorben waren. Bei den drei anderen Optionen ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen (p -Wert = ,182) (Tab. 28).

RESULTATE

TAB. 28: ÜBERLEBENDATEN AUFGESCHLÜSSELT NACH ART DER TT

Art der Target Therapie	lebend	tot
Keine TT	10	16
Nivolumab oder ein anderer PD-L1-Inhibitor	3	0
VEGF-Inhibitor	4	6
Kombinations-TT	1	10

Es gab einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Art der TT und dem progressionsfreien Überleben (p -Wert = ,004) sowie der Durchführung einer TT und dem PFS (p -Wert = ,002), wobei das Überleben bei gleichzeitig nicht durchgeföhrter TT am besten war (Abb. 21 und 22).

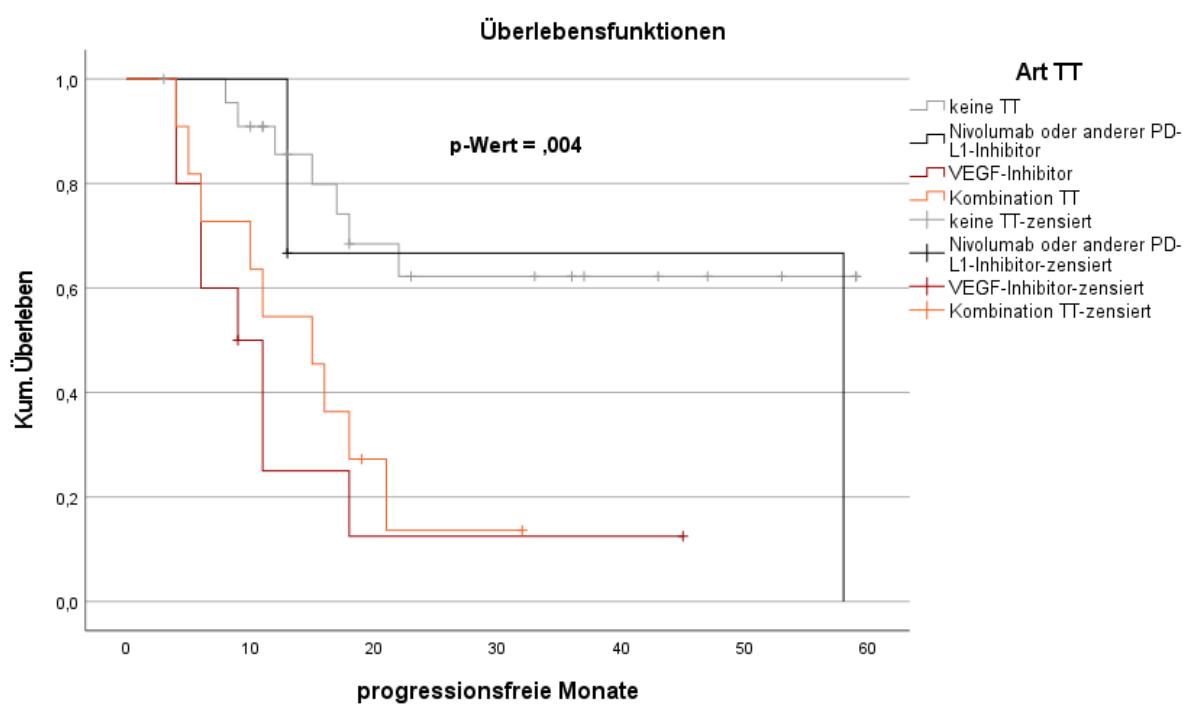


ABB. 21: PROGRESSIONSFREIE MONATE NACH ART DER TT

RESULTATE

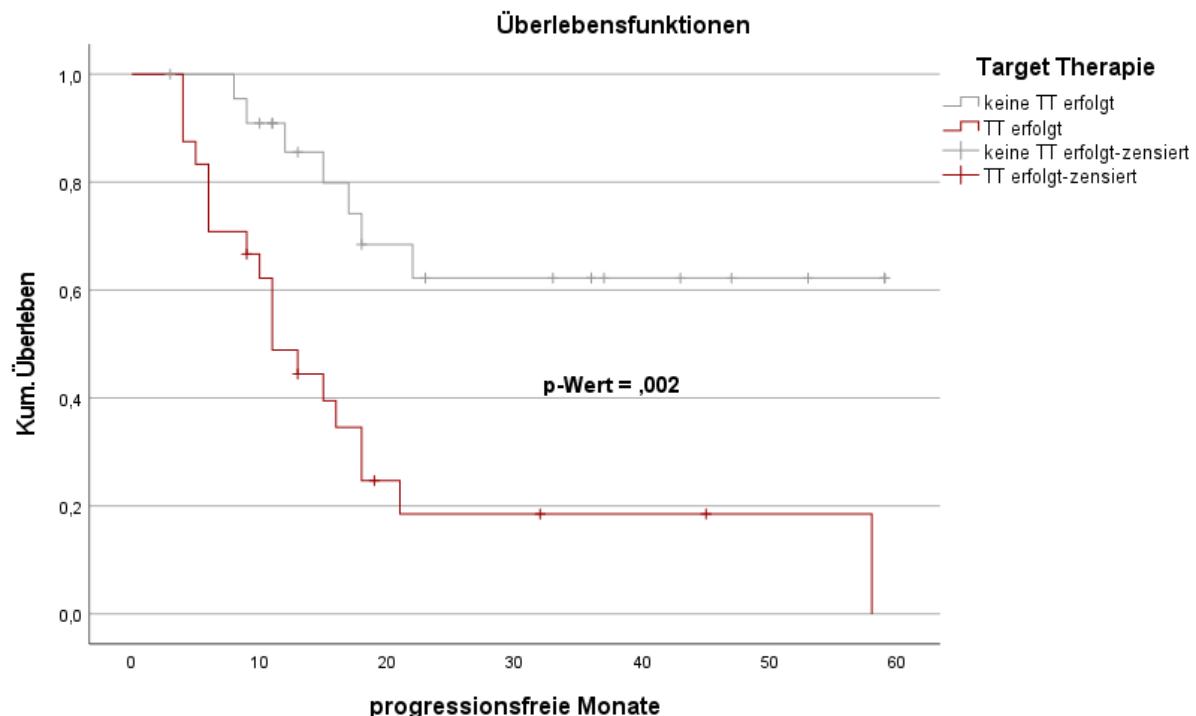


ABB. 22: PROGRESSIONSFREIE MONATE IN ABHÄNGIGKEIT DER TT

Bei der Betrachtung des Überlebens unter Berücksichtigung des Proteinverlusts und der Durchführung einer Target Therapie zeigte sich kein signifikanter Unterschied (p -Wert = ,824).

Für die COX Regression wurde der p -Wert sowohl für das OS als auch für das PFS auf $p \leq 0,08$ adaptiert, um Variablen mit deutlichem Trend zu einem kürzeren oder längeren OS oder PFS mit in die multivariate Analyse einzuschließen. Jedes Merkmal wurde mit der Referenzkategorie verglichen.

TAB. 29: OS COX REGRESSION

Gesamtüberleben (OS)	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
Parameter	p -Wert	95%-CI	HR	p -Wert	95%-CI	Adj. HR
SWI/SNF-Protein-Verlust insgesamt vs. kein Verlust	,501	,758-1,760	1,155			
SWI/SNF-Protein-Verlust in LG vs. kein Verlust	,819	,601-1,496	,948			

RESULTATE

Gesamtüberleben (OS)	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
Parameter	p-Wert	95%-CI	HR	p-Wert	95%-CI	Adj. HR
SWI/SNF-Protein-Verlust in HG vs. kein Verlust	,007	1,200-3,167	1,949	,266	,766-2,624	1,418
SMARCB1-Protein-Verlust vs. kein Verlust	,650	,742-1,614	1,094			
SMARCA2-Protein-Verlust vs. kein Verlust	,649	,657-1,964	1,135			
SMARCA4-Protein-Verlust vs. kein Verlust	,339	,477-8,605	2,025			
SMARCC1-Protein-Verlust vs. kein Verlust	,510	,680-2,174	1,216			
ARID1A-Protein-Verlust vs. kein Verlust	,122	,858-3,664	1,773			
BAF180-Protein-Verlust vs. kein Verlust	,727	,564-1,491	,917			
SMARCB1-Mutation vs. keine SMARCB1-Mutation	,450	,515-4,473	1,517			
Geschlecht: männlich vs. weiblich	,713	,382-1,931	,859			
Alter < vs. ≥ 60	,404	,331-1,562	,718			
Progress vs. kein Erkrankungsprogress	,316	,687-3,194	1,482			
Tumorgrad G3 vs. G4	,055	,983-5,434	2,312	,413	,544-4,400	1,548
Sarkomatoid/rhabdoid vs. nicht vorhanden	,055	,983-5,434	2,312	,413	,544-4,400	1,548
pT-Stadium	,839	,657-1,677	1,050			
pT2 vs. pT1	,896	,215-5,805	1,116			
pT3 vs. pT1	,244	,022-2,657	,239			
pT4 vs. pT1	,936	,221-4,020	,943			

RESULTATE

Gesamtüberleben (OS)	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
Parameter	p-Wert	95%-CI	HR	p-Wert	95%-CI	Adj. HR
Lymphknotenmetastasen N0 vs. N1 vs. N2	,826	,541-1,632	,940			
Lymphknotenmetastasen N0 vs. N1&2	,625	,485-3,329	1,271			
M1 (in 0-6 Monaten nach Diagnose) vs. M0	,122	,857-3,706	1,782			
M1 vs. M0	,024	1,125-5,152	2,407	,938	,174-6,642	1,075
Lymphbahnnvasion: L1 vs. L0	,391	,552-4,570	1,588			
Angioinvasion: V1 vs. V2 vs. V0	,237	,838-2,045	1,309			
Angioinvasion: V1&2 vs. V0	,182	,771-3,934	1,741			
Residualstadium: R1 vs. R2 vs. R0	,033	1,032-2,168	1,496	,608	,514-3,120	1,266
Residualstadium: R1&2 vs. R0	,043	1,025-4,367	2,116	,615	,121-3,491	,649
Partielle vs. totale Nephrektomie	,433	,600-3,292	1,406			
Art TT: PD-L1-Inhibitor, VEGF-Inhibitor, Kombination vs. keine TT	,182	,932-1,446	1,161			
Targettherapie ja vs. nein	,979	,504-2,022	1,009			
Radiatio ja vs. nein	,001	1,563-6,494	3,186	,175	,763-4,408	1,834

ABKÜRZUNGEN: CI – CONFIDENCE INTERVAL, HR – HAZARD RATIO, ADJ HR – ADJUSTED HAZARD RATIO

RESULTATE

TAB. 30: PFS COX REGRESSION

Progressionsfreies Überleben (PFS)	Univariate Analyse			Multivariate Analyse			
	Parameter	p-Wert	95%-CI	HR	p-Wert	95%-CI	Adj. HR
SWI/SNF-Protein-Verlust insgesamt vs. kein Verlust		,925	,604-1,582	,977			
SWI/SNF-Protein-Verlust in LG vs. kein Verlust		,942	,597-1,614	,982			
SWI/SNF-Protein-Verlust in HG vs. kein Verlust		,382	,731-2,266	1,287			
SMARCB1-Protein-Verlust vs. kein Verlust		,801	,680-1,648	1,059			
SMARCA2-Protein-Verlust vs. kein Verlust		,991	,553-1,821	1,003			
SMARCA4-Protein-Verlust vs. kein Verlust		,523	,377-6,807	1,602			
SMARCC1-Protein-Verlust vs. kein Verlust		,755	,436-1,827	,892			
ARID1A-Protein-Verlust vs. kein Verlust		,553	.579-2,774	1,268			
BAF180-Protein-Verlust vs. kein Verlust		,625	,511-1,498	,875			
SMARCB1-Mutation vs. keine SMARCB1-Mutation		,544	,182-2,457	,668			
Geschlecht: männlich vs. weiblich		,685	,502-2,852	1,197			
Alter < vs. ≥ 60	,032	,179-,925	,407	,045	,128-,978	,354	

RESULTATE

Progressionsfreies Überleben (PFS)	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
Parameter	p-Wert	95%-CI	HR	p-Wert	95%-CI	Adj. HR
tot vs. lebend	,007	1,424-9,224	3,624	,007	1,669-23,626	6,279
Tumorgrad G3 vs. G4	,073	,919-6,622	2,467	,117	,779-9,525	2,723
Sarkomatoid/rhabdoid vs. nicht vorhanden	,073	,919-6,622	2,467	,117	,779-9,525	2,723
pT-Stadium	,551	,694-1,985	1,173			
pT2 vs. pT1	,760	,146-13,866	1,425			
pT3 vs. pT1	,678	,035-8,895	,556			
pT4 vs. pT1	,510	,263-14,698	1,966			
Lymphknotenmetastasen N0 vs. N1 vs. N2	,685	,620-2,069	1,133			
Lymphknotenmetastasen N0 vs. N1&2	,452	,507-,4599	1,527			
M1 (in 0-6 Monaten nach Diagnose) vs. M0	,054	,987-5,113	2,246	,015	,038-703	,163
M1 vs. M0	,153	,807-3,920	1,779			
Lymphbahninvasion: L1 vs. L0	,167	,689-8,652	2,442			
Angioinvasion: V1 vs. V2 vs. V0	,162	,863-2,418	1,444			
Angioinvasion: V1&2 vs. V0	,169	,743-5,399	2,004			
Residualstadium: R1 vs. R2 vs. R0	,163	,891-1,993	1,332			
Residualstadium: R1&2 vs. R0	,178	,782-3,775	1,718			
Partielle vs. totale Nephrektomie	,716	,278-2,408	,819			

RESULTATE

Progressionsfreies Überleben (PFS)	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
Parameter	p-Wert	95%-CI	HR	p-Wert	95%-CI	Adj. HR
Art TT: PD-L1-Inhibitor, VEGF-Inhibitor, Kombination vs. keine TT	,004	1,113-1,729	1,387	,088	,339-1,078	,605
Targettherapie ja vs. nein	,002	1,692-9,768	4,066	,004	2,387-103,956	15,754
Radiatio ja vs. nein	,000	2,041-10,440	4,615	,237	,680-4,737	1,795

ABKÜRZUNGEN: CI – CONFIDENCE INTERVAL, HR – HAZARD RATIO, ADJ HR – ADJUSTED HAZARD RATIO

V. DISKUSSION

5.1 ERGEBNISDISKUSSION

Diese Studie untersuchte einen möglichen Zusammenhang zwischen dem SWI/SNF-Komplex und der Entdifferenzierung in kzNZK. Hierfür wurden verschiedene Aspekte, wie z. B. die Überlebensdauer und die Progressionsfreiheit in Zusammenhang mit einem Proteinverlust oder auch dem Vorhandensein einer rhabdoiden und/oder sarkomatoiden Komponente des Tumors in Korrelation gesetzt. Es wurden mehrere Proteine des SWI/SNF-Komplexes untersucht. Eine Besonderheit dieser Arbeit waren die für aggressive Tumore relativ langen Zeiträume der Nachverfolgung (follow ups) von bis zu 61 Monaten sowie die hierbei nahezu vollständigen Daten.

Insgesamt wurden sieben Proteine des SWI/SNF-Komplexes untersucht und in Vergleich gesetzt. Viele andere Studien beschäftigten sich nur mit einem Protein.

In 40,39 % der Fälle trat ein Komplettverlust von einem oder mehreren SWI/SNF-Komplex-Proteinen auf. Des Weiteren wurden für diese Studie nur G3- oder G4-Karzinome ausgewählt, wobei hier das Verhältnis 1:3 betrug. Allerdings waren in vielen Fällen auch eine G1- und/oder G2-Komponente vorhanden, die ebenfalls bezüglich eines SWI/SNF-Proteinverlustes untersucht wurde. Die zuvor charakterisierten NZK wurden morphologisch und immunhistochemisch und teilweise molekular untersucht.

5.1.1 PATIENT:INNEN- UND TUMORDATEN – KLINISCHE DATEN

Männer erkranken durchschnittlich im Alter von 68 Jahren, Frauen mit 72 Jahren an einem NZK. (Robert-Koch-Institut 2015, S. 104) In dieser Studie wichen lediglich der Mittelwert der Frauen um circa fünf Jahre ab (Mittelwert der Männer = 67,58 Jahre, Mittelwert der Frauen = 67,43 Jahre).

Das NZK besitzt eine relativ günstige Prognose, weil die 5-Jahres-Überlebensrate bei circa 77 % liegt. (Robert-Koch-Institut 2015, S. 104) Da für diese Studie nur Fälle mit einem Tumorgrad von 3 oder höher ausgewählt wurden, war die Überlebensdauer geringer. Des Weiteren wurden hauptsächlich Fälle mit einer sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Komponente untersucht und in einigen Fällen trat ein Proteinverlust auf. Somit waren mehrere Faktoren vorhanden, die die Prognose verschlechterten. Nur zwei Patient:innen hatten die fünf Jahre nach Diagnose erreicht. Ein weiterer Grund hierfür war, dass nur Fälle ab dem Jahr 2014 herangezogen wurden und damit nur diese und die aus dem Jahr 2015 die fünf Jahre follow-up bis 2020 überschreiten konnten. Dennoch lag der Durchschnitt der überlebten Monate bei 24 Monaten und war somit deutlich unter der Lebenserwartung. Die Graduierung ist allerdings als Prognosefaktor entscheidend, da hochgradige Tumore nur noch eine 5-Jahres-Überlebensrate von 15 - 22 % haben. (Warren und Harrison 2018, S. 1919)

5.1.2 VHL-FISH UND IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR DIAGNOSEVALIDIERUNG

Da nur Fälle mit der Diagnose eines kzNZK in diese Studie eingeschlossen wurden, erfolgten immunhistochemische und zytogenetische Untersuchungen zur Diagnoseabsicherung.

Grundlage der zytogenetischen Analyse war, dass eine somatische oder keimbahnaktivierende Mutation des VHL-Gens in den meisten kzNZK auftritt. (Dalglish et al. 2010, S. 361)

In der vorliegenden Studie kam es in 96,2 % der Fälle zu einem *VHL*-Verlust. In einer Untersuchung von Moch et al. aus dem Jahre 1998 zu NZK trat ein *VHL*-Verlust in circa 70 % der Fälle mit kzNZK auf. (Moch et al. 1998, S. 2305) Die Differenz zu den Ergebnissen in dieser Arbeit lässt sich eventuell mit dem Alter der Studie von Moch et al. erklären. Heutzutage ist die Technik weiter fortgeschritten und mehr Fälle konnten dementsprechend detektiert werden.

Morphologisch handelte es sich um klarzellige NZK. Dies wurde durch eine optische Beurteilung gesichert. CD10 und CK7 waren jeweils zweimal negativ bzw. positiv. Da die Verfahren allerdings nie zu 100 % diskriminieren und eine Abweichung durchaus auftreten kann, wurde in dieser Arbeit die morphologische Einschätzung als wegweisend gewählt. Zudem sind in der Literatur auch in wenigen kzNZK fokale CK7-Expressionen beschrieben. (Reuter et al. 2014, S. 37; Moch et al. 2016, S. 19)

5.1.3 SWI/SNF-KOMPLEX ALTERATIONEN IN KLARZELLIGEN NIERENZELLKARZINOMEN

In 40,39 % der Fälle trat in dieser Studie ein Komplettverlust von einem oder mehreren Proteinen des SWI/SNF-Komplexes auf. Hierbei waren die Expressionsverluste von BAF180 und SMARCB1 führend. Bereits in einer niedriggradigen Komponente waren in 26,67 % der Fälle Komplettverluste vorhanden. Ein Partialverlust trat in 23,07 % der Fälle auf.

Insbesondere der Zusammenhang zwischen einer entdifferenzierten Komponente und dem Auftreten eines Komplettverlustes konnte in 52,78 % der Fälle gezeigt werden.

Ein SMARCB1-Komplett- oder Partialverlust trat hauptsächlich in G4-Tumoren und bei sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Komponenten auf (jeweils 61,11 %).

In der Studie von Agaimy et al. aus dem Jahr 2017 wurde die molekulare Pathogenese von undifferenzierten und rhabdoiden NZK betrachtet. Hierfür wurden sechs SWI/SNF-Komplex-Proteine untersucht, in der vorliegenden Studie kam noch BAF180 dazu. Bei Agaimy et al. trat der Verlust eines oder mehrerer Proteine in 21 von 32 Fällen (65 %) eines NZK (kzNZK und andere NZK) auf, wohingegen hier nur in 40,39 % der Fälle ein Komplettverlust vorhanden war. (Agaimy et al. 2017) Diese verschiedenen Ergebnisse lassen sich beispielsweise durch Unterschiede im untersuchten Tumorkollektiv, der Diagnosen, der verwendeten Auswerteverfahren oder unterschiedlicher Antikörper erklären.

Wie in der Untersuchung aus dem Jahr 2017 konnte hier gezeigt werden, dass die rhabdoide und/oder sarkomatoide Komponente in signifikanter Verbindung mit einem Proteinverlust aus dem SWI/SNF-Komplex stand, was die Aussage von Agaimy et al. untermauert, dass es sich um einen gemeinsamen, aber unterschiedlichen Dedifferenzierungsweg handelt. (ebd.) Des Weiteren nahm Agaimy et al. an, dass es sich um einen frühen Verlust in der Tumorentwicklung handelte und der bösartige Klon dann sukzessiv die anderen Tumorzellen überwuchs. Dies wurde auf einen de-novo-Ursprung oder eine sehr frühe Transformation zurückgeführt, da entweder der Übergang von einem differenzierten zu einem undifferenzierten Klon zu sehen war oder sich durchgehend unauffällige anaplastische Zelltypen zeigten. (ebd.) Ebenso in der vorliegenden Studie traten bereits Verluste in der niedriggradigen Komponente der Tumore auf, wenn auch seltener als in der hochgradigen. Dies hatte ebenfalls Dal Molin et al. bei intraduktal papilläre muzinöse Pankreasneoplasien beobachtet. (Dal Molin et al. 2012)

In der vorliegenden Arbeit waren die kompletten Proteinverluste von BAF180, SMARCB1 und SMARCC1 mit jeweils 30,77 %, 21,15 % und 19,23 % dominierend. Es gab einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Proteinverlusts des SWI/SNF-Komplexes und dem Vorhandensein einer sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Komponente.

Im Vergleich mit ähnlichen Studienergebnissen kam es bei Agaimy et al. am häufigsten zu einem Verlust von SMARCA2. Außerdem traten die vier Verluste (12,5 %) von SMARCB1 isoliert zum Verlust aller anderen untersuchten SWI/SNF-Proteine auf. (Agaimy et al. 2017) Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gemacht werden. Zehn von elf Fälle mit komplettem SMARCB1-Verlust zeigten ebenfalls einen Verlust von einem oder mehreren anderen SWI/SNF-Proteinen (90,9 %). Auch kam es häufiger zu einem Komplettverlust von SMARCB1 als bei Agaimy et al. (in 12,5 % versus 21,15 %). (ebd.)

Im Vergleich zu einer weiteren ähnlichen Studie an NZK von Kinoshita et al. hingegen kam es zu einer unterschiedlichen Verteilung der Proteinverluste. (Kinoshita et al. 2020) Bei Kinoshita et al. trat am häufigsten ein Verlust von SMARCA4 und kein Verlust von SMARCB1 sowie SMARCA2 auf. Gleiche Ergebnisse lieferten beide Studien hinsichtlich SMARCC2 und dem Zusammenhang eines Verlustes von SMARCA4 mit einer sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Komponente. (ebd., S. 653)

In einer Studie von Wang et al. wurde nur SMARCC1 untersucht, wobei der Verlust in 85,33 % aller Fälle allerdings deutlich häufiger auftrat als in der vorliegenden Arbeit (19,23 %). (Wang et al. 2021)

Eine vergleichende Übersicht unterschiedlicher Studien zeigt Tabelle 31.

TAB. 31: VERGLEICH VERSCHIEDENER STUDIEN ZUM SWI/SNF-KOMPLEX IN
NIERENZELLKARZINOMEN

	Agaimy et al. 2017	Kinoshita et al. 2020	Wang et al. 2021	diese Studie
Karzinom	NZK	NZK	NZK	kzNZK
SMARCB1	4	0	-	11
SMARCA2	10	3	-	6
SMARCA4	3	33	-	2
SMARCC1	8	-	128	10
SMARCC2	1	4	-	0
ARID1A	6	3	-	11
BAF180	-	-	-	16
Fallzahl	32	51	150	52

ANMERKUNG: IN DEN ANDEREN STUDIEN WAR NICHT ERSICHTLICH, OB ES SICH UM PARTIAL- UND KOMPLETTVERLUSTE ODER NUR UM KOMPLETTVERLUSTE HANDELTE. DESHALB WURDEN NUR DIE DATEN DER VORLIEGENDEN KOMPLETTVERLUSTE VERGLICHEN. AUßerdem WURDEN IN ANDEREN STUDIEN z. T. NICHT ALLE MARKER UNTERSUCHT.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Studie von Schaefer und Hornick über Weichgewebsneoplasien mit rhabdoider Dedifferenzierung. In gleicher Weise kam es hier am häufigsten zu einem Verlust von SMARCB1. Des Weiteren wurde ebenfalls eine Verbindung zwischen einem Proteinverlust und dem Vorhandensein einer sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Komponente gefunden. (Schaefer und Hornick 2021) Dass ein Verlust von SMARCB1 signifikant häufiger in sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Tumoren auftrat, wurde auch in der Arbeit von Roberts und Biegel beschrieben. (Roberts und Biegel 2009, S. 412)

In einer weiteren Studie an Urothelkarzinomen von Agaimy et al. kam es zu anderen Ergebnissen. (Agaimy et al. 2016) Hier trat am häufigsten ein SMARCA2-Verlust, gefolgt von einem ARID1A-Verlust auf. Ebenso trat ein Komplettverlust in der Arbeit von Agaimy et al. mit 71 % häufiger auf. (Agaimy et al. 2016) Das unterstreicht, dass in verschiedenen Tumorentitäten jeweils andere Komponenten des SWI/SWF-Komplexes eine Rolle bei einer möglichen Dedifferenzierung spielen können.

Die zwei Fälle eines SMARCA4-Verlusts in der vorliegenden Studie traten zusammen mit einem SMARCA2-Verlust auf. Zu der Schlussfolgerung, dass ein Verlust von SMARCA4

immer zusammen mit einem Verlust von SMARCA2 einhergeht, kamen ebenso die Studien von Howitt und Folpe (gynäkologische mesenchymale Neoplasien, wie z.B. das kleinzellige Ovarialkarzinom vom hyperkalzämischen Typ) sowie von Peinado et al. (Adenokarzinom der Lunge). (Howitt und Folpe 2021), (Peinado et al. 2020, S. 8) Hingegen kam es in der Arbeit von Agaimy et al. zu einem anderen Ergebnis, da hier bei einem SMARCA2-Verlust SMARCA4 noch intakt war. (Agaimy et al. 2016)

In der Studie von Kinoshita et al. trat ein Verlust von SMARCA4 häufiger bei sarkomatoiden NZK auf. Die zwei Verluste von SMARCA4, die in der vorliegenden Arbeit auftraten, waren in sarkomatoiden Bereichen lokalisiert. (Kinoshita et al. 2020, S. 654)

Laut der Arbeit von Bi et al. zu kzNZK traten die Verluste von ARID1A nur in sarkomatoiden Bereichen auf. (Bi et al. 2016) Auch in dieser Studie lässt sich eine Tendenz erahnen, jedoch traten zwei der elf Komplettverluste in einem Bereich ohne eine sarkomatoide Komponente auf.

Des Weiteren dominierte der Verlust von ARID1A in der Studie von Peinado et al., wohingegen in dieser, wie bereits erwähnt, ein Verlust von SMARCB1 führend war. (Peinado et al. 2020)

In dieser Arbeit wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Proteinverlust von BAF180 und dem Tumorgrad oder einer sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Komponente festgestellt. Zu ähnlichen Ergebnissen war bereits die Studien von Liao et al. (NZK) und Wang et al. gekommen. (Liao et al. 2019), (Wang et al. 2017)

Ebenso sah die Studie von Pawłowski (NZK) einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von BAF180 und dem höheren Tumorgrad, einer geringen Differenzierung und einer schlechteren Prognose. (Pawłowski et al. 2013) Allerdings besaßen 70 % der Tumore der Studie von Pawłowski keine *BAF180*-Expression mehr, in der vorliegenden waren es lediglich 30 % (Komplettverlust, 42 % bei Komplett- und Partialverlust).

5.1.4 MUTATIONSANALYSEN

Am SMARCB1-Protein wurden Mutationsanalysen durchgeführt, da es nach BAF180 die meisten Verluste hatte (nur Komplettverluste, bei Partial- und Komplettverlusten führend). Hierfür wurde das gesamte Gen untersucht und aufgeschlüsselt, welche Art der Mutation vorlag sowie die Häufigkeit bestimmt.

In einem relevanten Anteil von 27 % der Fälle mit einem SMARCB1-Verlust zeigte sich eine Mutation. In sieben Fällen konnten Exons nicht ausgewertet werden. Grund hierfür ist vermutlich, dass die Qualität der DNS aus den Donorblöcken mit den Jahren häufig abnimmt und für eine Analyse nicht ausreichend war.

Auch nach Datenbankanalysen war allerdings nicht eindeutig klar, ob eine Mutation pathogen war oder nicht, d. h. zum SMARCB1-Proteinverlust führte oder nicht verantwortlich für den Verlust war. Die meisten Mutationen wurden nicht in den gängigen Datenbanken beschrieben

(z. B. COSMIC oder ClinVar), wodurch man sich auf die beiden Prädiktions-Algorithmen beschränken musste. Bei drei Mutationen stimmten die Angaben überein, bei vier trat jedoch ein Unterschied zwischen PolyPhen und MutationTaster auf. Dies entsprach der aktuellen Datenlage und soll in diesem Zusammenhang nicht weiter vertieft werden.

Die Frequenz von 27 % *SMARCB1*-Mutationen ist allerdings ein Hinweis, dass es zwar ein häufiger und möglicherweise pathogener Mechanismus ist, es aber auch andere Mechanismen geben muss, die zum Proteinverlust führen.

In dieser Studie traten die Mutationen vermehrt bei G4-Tumoren auf, genauer gesagt in 86 % der Fälle. Die Mutationen traten ebenso in 86 % der Fälle bei Karzinomen ohne Metastasen und ausschließlich in Tumoren mit dem Residualstadium R0 auf.

SMARCB1 wurde als verantwortliches Gen für die Entstehung von malignen rhabdoiden Karzinomen entdeckt. Es wurden hierbei Keimbahn- und somatische Mutationen entdeckt, die das Tumorsuppressorgen *SMARCB1* beeinflussen. (Roberts und Biegel 2009, S. 412) Für das NZK finden sich bislang keine Daten in der Literatur.

5.1.5 ÜBERLEBENSANALYSEN

In der hier vorliegenden Studie konnte auf ein follow up in fünfzig von 52 Fällen zugegriffen werden. Von den fünfzig Patient:innen mit einem kzNZK G3 oder G4 starben 64 %, davon trat bei 25 der Karzinome eine rhabdoide und/oder sarkomatoide Komponente auf (78 %). In einer Studie von Humphrey mit 23 Patient:innen über NZK mit einer rhabdoiden Komponente verstarben sechs Menschen (26 %). (Humphrey 2011) Bei einer Untersuchung zu sarkomatoiden NZK von Peralta-Venturina et al. starben 61 der 88 Patient:innen mit follow up (69 %). (Peralta-Venturina et al.)

Im Vergleich zu den vorliegenden Daten starben bei Agaimy et al. 88 % der Patient:innen bei denen Daten über die Krankheitsentwicklung vorlagen. (Agaimy et al. 2017)

Wie auch in anderen Studien zum kzNZK (z.B. (Dagher et al. 2019, S. 350)) zeigte sich hier ein sehr starker Zusammenhang zwischen dem Tumograd und der Prognose. Das heißt, dass Patient:innen mit einem G4-Karzinom eine geringere Überlebenszeit hatten als Patient:innen mit einem G3-Tumor. Diese Schlussfolgerung zogen ebenfalls Warren und Harrison in ihrer Untersuchung. (Warren und Harrison 2018) Ebenfalls sehr deutlich war der Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben oder dem progressionsfreien Überleben und einer sarkomatoiden und/oder rhabdoiden Komponente. Zu diesem Ergebnis kam ebenso die Studie von Peralta-Venturina et al.. (Peralta-Venturina et al.)

Bei der Betrachtung der Fälle mit einem kompletten Proteinverlust im Verhältnis zum Status lebend oder tot zeigte sich ein Trend zum früheren Versterben der Patient:innen mit Komplettverlust. Daraus könnte man schließen, dass bei der aufgrund des Tumorgrads schon

prognostisch ungünstigen Gruppe ein weiteres Merkmal dazukam, welches die Prognose der Patient:innen weiter verschlechterte. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass ein SWI/SNF-Verlust in einer hochgradigen Komponente einen signifikanten Einfluss auf ein kürzeres Überleben hatte als kein Verlust. Somit charakterisiert ein hoher Tumorgrad und wahrscheinlich auch der SWI/SNF-Verlust in einer hochgradigen Komponente NZK mit besonders schlechter Prognose.

Eine Studie von Agaimy und Cheng kam zu dem Ergebnis, dass ein Proteinverlust keine Auswirkung auf das Überleben hatte. (Agaimy et al. 2017, S. 255) Wenn auch nicht signifikant, so zeigte sich trotzdem in der vorliegenden Arbeit, dass tendenziell mehr Patient:innen mit einem Komplettverlust (73 %) gestorben sind als ohne (58 %). Signifikant war der Zusammenhang zwischen einem früheren Versterben der Patient:innen und dem Proteinverlust in der hochgradigen Tumorkomponente im Vergleich zu keinem Verlust. Dieses Bild zeigte sich jedoch nur beim Gesamtüberleben, beim progressionsfreien Überleben konnte keine Tendenz festgestellt werden.

Im untersuchten Kollektiv wurde kein signifikant besseres oder schlechteres Gesamtüberleben oder progressionsfreies Überleben für die einzelnen untersuchten SWI/SNF-Komplex-Proteine festgestellt. Im Vergleich dazu stand laut Kinoshita et al. der Verlust von SMARCA4 in einem signifikanten Zusammenhang mit dem verkürzten progressionsfreien Überleben. (Kinoshita et al. 2020) In der Studie von Wang et al. gab es einen Zusammenhang zwischen einer hohen SMARCC1-Expression und einer besseren Prognose in NZK. (Wang et al. 2021, S. 239) In der Studie von Pawłowski (NZK) wurde ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von BAF180 und einer schlechteren Prognose gezeigt. (Pawłowski et al. 2013)

Weitere klinisch-pathologische Parameter des untersuchten Tumorkollektivs waren für das Überleben relevant:

Vorhandene Fernmetastasen waren mit einem schlechteren Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben in Verbindung zu bringen. Metastasen innerhalb der ersten sechs Monate verschlechterten die Prognose, wenn auch nicht ganz so deutlich. In der Arbeit von Bi et al. wurde ebenfalls berichtet, dass Patient:innen mit Metastasen das schlechteste Überleben hatten. (Bi et al. 2016, S. 2170)

Außerdem stand eine Lymphbahninvasion sowie das TNM-Stadium in einem Zusammenhang zum Überleben. (Peralta-Venturina et al.) Diese Ergebnisse konnten zumindest als Tendenz in der vorliegenden Arbeit erzielt werden.

Erstaunlicherweise lagen die Überlebensfunktionskurven der Patient:innen bis zum 60. Lebensjahr und die der Patient:innen über oder gleich 60 Jahren nah beieinander, wobei eher

die der jüngeren schlechter verlief. Dies könnte daran liegen, dass jüngere Patient:innen vielleicht eher aggressivere Tumore bekamen und damit eine Heilung und Therapie erschwert wurde. Das gleiche Bild zeigte sich beim progressionsfreien Überleben signifikant, da die jüngeren Patient:innen eher einen Progress entwickelten.

Da nach wie vor die Operation und das Entfernen des Tumors die Therapie der Wahl eines NZK sind, stellt ein Verbleib von Tumoranteilen (sprich R1/R2-Stadium) ein Risiko dar. (S3-Leitlinie 2017) Auch in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das Residualstadium das Gesamtüberleben signifikant beeinflusst. Jedoch zeigte sich in der multivariaten Analyse, dass dieser Faktor von anderen Dingen abhängig war.

Es gab keine Unterschiede im Gesamtüberleben, die abhängig von der Art der Operation waren (ob partielle oder totale Nephrektomie). Zu diesen Ergebnissen kam auch eine Untersuchung von Dash et al. zum kzNZK. (Dash et al. 2006, S. 943)

Bei der Betrachtung des Proteinverlusts in Verbindung mit einer Target Therapie hinsichtlich des Gesamtüberlebens konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Da in dieser Studie allerdings nur eine geringe Anzahl an Fällen behandelt wurde, die sowohl einen Verlust als auch eine TT erhalten hatten, lässt sich aus diesen Daten nicht sicher ableiten, ob die beiden Parameter nicht doch in Verbindung miteinander stehen.

Alle drei Patient:innen, die eine Nivolumab-Therapie oder eine Therapie mit einem anderen PD-L1-Inhibitor erhalten hatten, waren zum untersuchten Zeitpunkt noch am Leben. Zwei der drei Patient:innen besaßen keine sarkomatoide Komponente. Diese Aussage steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Studie von Debien et al.. Hier wurde herausgefunden, dass sarkomatoide kzNZK eine höhere PD-L1-Expression besitzen als nicht-sarkomatoide. (Debien et al. 2019, S. 5) Laut dieser Aussage müsste eine PD-L1-Inhibitor-Therapie bei sarkomatoiden Karzinomen wirksamer sein. Allerdings wurde hier in der vorliegenden Studie ausschließlich gezeigt, dass die Therapie auch bei nicht-sarkomatoiden Tumoren erfolgreich war. In einer anderen Arbeit von Hammerschmied et al. wurde aufgeführt, dass NZK mit sarkomatoider/rhabdoider Differenzierung therapieresistenter sind. (Hammerschmied et al. 2008) Möglicherweise könnte die PD-L1-Inhibitor-Therapie eine Therapieoption in diesen Fällen darstellen. Es müssten allerdings noch entsprechende Therapiestudien zur Klärung dieser Frage folgen.

Da die rhabdoide und/oder sarkomatoide Komponente assoziiert ist mit einer Therapieresistenz, könnte es sein, dass die SWI/SNF-Komplex-Verluste mitverantwortlich für diese Therapieresistenz sind. In kasuistischen Fällen in der Praxis scheint dies der Fall zu sein (mündliche Mitteilung PD Dr. Zimpfer). Auch diese Hypothese müsste in größeren Fallkollektiven geprüft werden.

Patient:innen, die keine Target Therapie erhielten, hatten ein signifikant besseres progressionsfreies Überleben als Patient:innen, die einen VEGF-Inhibitor oder eine Kombinationstherapie erhielten. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass bei Patient:innen mit einem weniger aggressiven Tumor (keine Metastasen) auf eine TT verzichtet werden konnte und dementsprechend nicht die TT für das PFS verantwortlich ist, sondern das ursprüngliche Karzinom, welches schlussendlich die TT bedingte.

5.2 METHODENDISKUSSION

Da insgesamt nur 40 % der Fälle einen kompletten Proteinverlust hatten, muss man kritisch betrachtet sagen, dass die Aussagen zur Wertigkeit des Verlustes aufgrund der eher geringen Anzahl der untersuchten Fälle eingeschränkt sind. Jedoch lässt sich selbst in dieser kleinen Einheit bereits erkennen, dass nach dem Tumorgrad eine SWI/SNF-Komplex-Defizienz die Prognose weiter verschlechtert.

Die Studie beinhaltet ein insgesamt eher kleines Probenkollektiv. Im Vergleich mit anderen Studien zum gleichen Thema handelt es sich trotzdem um eine verhältnismäßig große Fallzahl (Vergleich 51 Fälle bei Kinoshita et al. 2020, 14 Fälle bei Agaimy et al. 2016, 32 Fälle bei Agaimy et al. 2017). Da die Informationen aus dem Krebsregister gezogen wurden, waren sie mit geringen Ausnahmen vollständig. Besonders der Zeitraum der Informationen über einen Progress oder ein Überleben waren mit fünf Jahren sehr lang und es waren viele Informationen über die Art der Therapie vorhanden.

Allerdings ist es wichtig zu erwähnen, dass es keine Daten zum krankheitsspezifischen Überleben gab. Das Tumoregister zieht die Information über das Sterbedatum meist aus den Todesanzeigen aus Zeitungen und somit konnte nicht unterschieden werden, ob die jeweilige Person aufgrund des Tumorleidens oder einer anderen Ursache gestorben war.

Zum anderen handelte es sich um eine retrospektive Studie, wodurch der Nachteil entstand, dass man auf die Informationen in den alten Datensätzen angewiesen war. Zum Teil fehlten Angaben zum Lymphknotenstatus oder zur Perineuralscheideninfiltration, um nur zwei Beispiele zu nennen. Das Fehlen war allerdings auch darauf zurückzuführen, dass die Lymphknoten eventuell nicht entfernt wurden oder dass die Angabe der Perineuralscheideninfiltration als fakultatives Kriterium nicht in jedem Fall von der Pathologie in der Tumorklassifikation angegeben wurde.

Um die zahlreichen Schnitte und Stanzen darzustellen, wurde sich für den Einsatz von TMA entschieden. Auf diesem Weg war es nicht nur möglich, Zeit, Kosten und Material zu sparen, sondern es wurden auch eventuelle Fehler hinsichtlich einer Färbung oder der Schnittweise minimiert. Da in einem TMA insgesamt 135 Stanzen enthalten waren, konnte dafür ein einheitliches Vorgehen sichergestellt werden. Sollte eine Besonderheit zum Beispiel bei der Färbung

aufgetreten sein, so beträfe sie alle 135 Stanzen und eine Differenz zwischen unterschiedlichen Tumoren wäre nicht fälschlicherweise angenommen worden. Des Weiteren war durch die gleiche runde Form der Stanzen ein einfacheres Auswerten möglich, da bei normalen Schnittpräparaten häufiger die Form zu subjektiven Fehlern führt.

Jedoch spiegelten die TMA dadurch nur geringe Gewebebezirke wider, was bei der bekannten Gewebeheterogenität der kzNZK ein Problem darstellte. Um die Fehlerquote möglichst gering zu halten, wurden alle Bereiche mit unterschiedlicher Graduierung dreifach gestanzt, wodurch der Gewebeheterogenität Rechnung getragen werden konnte. Hierbei wurde sich an einer Studie von Torhost et al. orientiert. Diese fand heraus, dass bei der Analyse zum Progesteron-Rezeptor drei Proben eines Tumorgewebes notwendig waren, um den gleichen Grad an Positivität zu erreichen wie bei der Untersuchung eines großen Schnittes. (Torhorst et al. 2001, S. 2253) Ebenso zeigte eine Untersuchung von Simon und Sauter, dass es gerade bei kleineren Probenkollektiven sinnvoll ist, mehrere Proben eines Gebietes zu nehmen, da der Verlust von einzelnen Fällen ansonsten einen zu großen Einfluss auf die Ergebnisse hätte. (Simon und Sauter 2010, S. 32)

Es fielen circa 10 % der Stanzen wegen einer Nekrose, eines Narbengewebes oder eines anderen Grundes weg und waren nicht auswertbar.

Des Weiteren gab es einige Schwächen bei der Auswertung der Marker. Es wurde zwar versucht, ein einheitliches System zu finden, jedoch ist die Einschätzung gerade in schwierigen Fällen eher subjektiv. Auch der Halo- und Kontrastfehler stellten als subjektive Fehlerquellen ein Problem dar. Diese Fehler wären mit steigender Anzahl an Fällen kleiner geworden. Außerdem wurden alle Marker bis auf SMARCB1 neu für diese Studie in der Pathologie der Universitätsmedizin Rostock etabliert, wodurch Erfahrungen bei der Färbung und der Auswertung fehlten.

Auch ein Vergleich mit anderen Studien ist hierbei kritisch zu reflektieren. Es wurden eventuell andere immunhistochemische Verfahren oder Färbeprotokolle (z. B. verschiedene Reagenzien, Vorbehandlungen, Detektionskits, Antikörper verschiedener Hersteller oder Verdünnungssätze) angewandt und unterschiedliche Auswertemodalitäten genutzt, die zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Immunfärbung geführt haben können. Ebenso bestand die Möglichkeit, dass sich der Umgang mit Nekrosen unterscheiden konnte. Im Randbereich einer Nekrose kommt es zu artefiziellen Expressionsverlusten, weshalb in der vorliegenden Arbeit versucht wurde, nekrosefreie Areale zu stanzen und nekrotische Areale auf den TMA nicht zu werten. Es war jedoch bis auf Angaben von Agaimy et al. nicht bekannt, wie andere Untersucher dieses Problem handhabten. (Agaimy et al. 2017, persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. A. Agaimy)

Ein weiteres Problem war die Art des verwendeten Gewebes: Es handelte sich um Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe mit dem bekannten Problem, dass Proteine und DNS sich graduell zersetzen und dann ggf. nicht mehr durch die angewandte Analysemethode nachweisbar sind und u. a. zu einem falsch negativen Befund in der Expressionsanalyse führen. In der vorliegenden Studie wurde diesem Problem insofern begegnet, als dass keine Proben, die älter als sechs Jahre waren, in die Studie inkludiert wurden. Des Weiteren wurde bei jedem Fall eine interne Positivkontrolle durch das gestanzte Normalgewebe mitgeführt. Ein weiteres Problem stellte sich bei der Mutationsanalyse dar. Größere Deletionen oder auch Mutationen außerhalb der untersuchten Bereiche (z.B. in großen Introns) werden nicht dargestellt. (Schaaf und Zschocke 2018, S. 202) Zwar gab es mit 27 % vorhandener Mutationen eine hohe Rate, jedoch wäre diese eventuell durch den Einsatz von sensitiveren Methoden noch weiter gestiegen.

Bei der Studie von Peinado et al. handelte es sich um eine Untersuchung am in vitro Modell. Da die vorliegende Arbeit lediglich an Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Archivmaterial durchgeführt wurde, waren hier bisher keine Testungen an etablierten Tumorzellen derartiger NZK möglich, die gerade für die Therapie sehr wichtig wären.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit handelt vom klarzelligen (kz) Nierenzellkarzinom (NZK), dem häufigsten Subtyp des NZK mit circa 70 % aller NZK. In ungefähr 5 % der Fälle wird morphologisch ein schlecht differenzierter Tumor mit rhabdoider und/oder sarkomatoider Morphologie nachgewiesen. Nach aktueller WHO-Klassifikation sollte diese Tumorkomponente in der Diagnose aufgrund der prognostischen Bedeutung erwähnt werden. Mechanismen, die zur Dedifferenzierung in NZK führen, sind bislang noch wenig untersucht. Es besteht allerdings die Hypothese, dass Alterationen im Switch-Sucrose- (SWI/SNF) Weg mit dem rhabdoiden und/oder sarkomatoiden Phänotyp in Tumoren, in diesem Fall dem kzNZK, einhergehen können.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Beantwortung der Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen einem SWI/SNF-Komplex-Proteinverlust und einer Dedifferenzierung in kzNZK gibt.

Hierfür wurden 52 Fälle eines kzNZK in einem Beobachtungszeitraum von 2014 bis 2018 mit einem Tumorgrad G3 oder G4 untersucht. Es wurden Tissue Microarrays (TMA) angefertigt und insgesamt sieben verschiedene Proteine des SWI/SNF-Komplexes untersucht und der Verlust oder das Vorhandensein mit diversen Merkmalen korreliert, z.B. dem Überleben oder einer undifferenzierten Komponente.

Die statistische Auswertung zeigte, dass die häufigsten Verluste bei BAF180, SMARCB1 und SMARCC1 auftraten. Außerdem traten in dieser Studie die SMARCA4-Verluste zusammen mit den SMARCA2-Verlusten auf.

Bereits in der niedriggradigen Komponente waren Proteinverluste vorhanden, was ein Hinweis darauf sein kann, dass der Proteinverlust ein frühes Ereignis ist und ggf. der betroffene Tumorklon die anderen graduell überwächst. Funktionell ist der SWI/SNF-Komplex entscheidend bei der ATP-abhängigen Chromatinremodellierung und einzelne Untereinheiten wirken als Tumorsuppressor. Ein Verlust von einem oder mehreren der SWI/SNF-Komplex-Proteine in einer hochgradigen Komponente hatte signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben. Die jeweils untersuchten SWI/SNF-Komplex-Proteine für sich alleine zeigten in den Überlebensanalysen jedoch keine signifikanten Unterschiede im Verlauf zwischen Tumoren mit und Tumoren ohne Proteinverlust.

Zu einem wesentlich häufigeren Proteinverlust kam es in rhabdoiden und/oder sarkomatoiden Komponenten, was eventuell auf einen zusammenhängenden Ursprung hinweist. Außerdem konnte damit gezeigt werden, dass dieses Ereignis wahrscheinlich für die Dedifferenzierung von Bedeutung ist. Daraus können sich in Zukunft Therapieansätze bei der Behandlung des NZK ergeben. Wenn bereits in einer niedriggradigen Tumorkomponente ein SWI/SNF-Proteinverlust entdeckt wird und dieser im Speziellen behandelt wird, könnte eventuell die Entstehung oder Entwicklung einer undifferenzierten Komponente verhindert werden, was mit einer besseren Prognose einhergeht. Diese Ansätze können in Zukunft weiterverfolgt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Des Weiteren wurde bei SMARCB1, einem Protein mit häufigem Expressionsverlust, eine Mutationsanalyse durchgeführt. Es fanden sich in 27 % der Fälle mit *SMARCB1*-Verlust Mutationen, so dass abgesehen von Mutationen andere Mechanismen der Stilllegung des Gens und konsekutivem Ausfall des Proteins eine Rolle spielen dürften. In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer *SMARCB1*-Mutation und dem Überleben festgestellt.

Zusammenfassend hat die vorliegende Arbeit einen weiteren Baustein für die Hypothese geliefert, dass ein Zusammenhang zwischen einem Proteinverlust und einer Dedifferenzierung in klarzelligen Nierenzellkarzinomen besteht.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- A Ari Hakimi; Can G Pham; James J Hsieh (2013): A clear picture of renal cell carcinoma. In: *Nature genetics* 499 (7456), S. 849–850. DOI: 10.1038/nature12222.
- Agaimy, A.; Hartmann, A. (2016): Hereditäre Nierentumoren: Häufiger als erwartet? In: *Der Pathologe* 37 (2), S. 134–143. DOI: 10.1007/s00292-016-0153-0.
- Agaimy, Abbas (2014): The Expanding Family of SMARCB1(INI1)-deficient Neoplasia: Implications of Phenotypic, Biological, and Molecular Heterogeneity.
- Agaimy, Abbas (2019): SWI/SNF Complex-Deficient Soft Tissue Neoplasms: A Pattern-Based Approach to Diagnosis and Differential Diagnosis. In: *Surgical pathology clinics* 12 (1), S. 149–163. DOI: 10.1016/j.path.2018.10.006.
- Agaimy, Abbas; Bertz, Simone; Cheng, Liang; Hes, Ondrej; Junker, Kerstin; Keck, Bastian et al. (2016): Loss of expression of the SWI/SNF complex is a frequent event in undifferentiated/dedifferentiated urothelial carcinoma of the urinary tract. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 469 (3), S. 321–330. DOI: 10.1007/s00428-016-1977-y.
- Agaimy, Abbas; Cheng, Liang; Egevad, Lars; Feyerabend, Bernd (2017): Rhabdoid and Undifferentiated Phenotype in Renal cell carcinoma.
- Argentiero, Antonella; Solimando, Antonio Giovanni; Krebs, Markus; Leone, Patrizia; Susca, Nicola; Brunetti, Oronzo et al. (2020): Anti-angiogenesis and Immunotherapy: Novel Paradigms to Envision Tailored Approaches in Renal Cell-Carcinoma. In: *Journal of clinical medicine* 9 (5). DOI: 10.3390/jcm9051594.
- Armstrong, Jennifer; Bieker, James; Emerson, Beverly (1998): A SWI/SNF-Related Chromatin Remodeling Complex, E-RC1, Is Required for Tissue-Specific Transcription Regulation by EKLF In Vitro. In: *Cell* (95), S. 93–104.
- Bartelheim, Kerstin; Sumerauer, David; Behrends, Uta; Kodetova, Daniela; Kucera, Filip; Leuschner, Ivo et al. (2014): Clinical and genetic features of rhabdoid tumors of the heart registered with the European Rhabdoid Registry (EU-RHAB). In: *Cancer genetics* 207 (9), S. 379–383. DOI: 10.1016/j.cancergen.2014.04.005.
- Bi, Mark; Zhao, Siming; Said, Jonathan W.; Merino, Maria J.; Adeniran, Adebawale J.; Xie, Zuoquan et al. (2016): Genomic characterization of sarcomatoid transformation in clear cell renal cell carcinoma. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (8), S. 2170–2175. DOI: 10.1073/pnas.1525735113.

- Biegel, Jaclyn A.; Busse, Tracy M.; Weissman, Bernard E. (2014): SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer. In: *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* 166C (3), S. 350–366. DOI: 10.1002/ajmg.c.31410.
- Bögershausen, Nina; Wollnik, Bernd (2018): Mutational Landscapes and Phenotypic Spectrum of SWI/SNF-Related Intellectual Disability Disorders. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 11, 1-18. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00252.
- Carlson, Marian; Laurent, Brehon (1994): The SWI/SNF family of global transcriptional activators. In: *Current Opinion in Cell Biology*, S. 396–402.
- Chen, Zhiao; Lu, Xinyuan; Jia, Deshui; Jing, Ying; Di Chen; Wang, Qifeng et al. (2018): Hepatic SMARCA4 predicts HCC recurrence and promotes tumour cell proliferation by regulating SMAD6 expression. In: *Cell death & disease* 9 (2), S. 1–12. DOI: 10.1038/s41419-017-0090-8.
- Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma (2013). In: *Nature* 499 (7456), S. 43–49.
- Dagher, Julien; Delahunt, Brett; Rioux-Leclercq, Nathalie; Egevad, Lars; Varma, Murali; Samaratunga, Hemamali (2019): Percentage grade 4 tumour predicts outcome for clear cell renal cell carcinoma. In: *Pathology* 51 (4), S. 349–352. DOI: 10.1016/j.pathol.2019.01.004.
- Dal Molin, Marco; Hong, Seung-Mo; Hebbar, Sachidanand; Sharma, Rajni; Scrimieri, Francesca; Wilde, Roeland F. de et al. (2012): Loss of expression of the SWI/SNF chromatin remodeling subunit BRG1/SMARCA4 is frequently observed in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. In: *Human pathology* 43 (4), S. 585–591. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.06.009.
- Dalgliesh, Gillian L.; Furge, Kyle; Greenman, Chris; Chen, Lina; Bignell, Graham; Butler, Adam et al. (2010): Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. In: *Nature* 463 (7279), S. 360–363. DOI: 10.1038/nature08672.
- Dash, Atreya; Vickers, Andrew J.; Schachter, Lee R.; Bach, Ariadne M.; Snyder, Mark E.; Russo, Paul (2006): Comparison of outcomes in elective partial vs radical nephrectomy for clear cell renal cell carcinoma of 4-7 cm. In: *BJU international* 97 (5), S. 939–945. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2006.06060.x.
- Debien, Véronique; Thouvenin, Jonathan; Lindner, Véronique; Barthélémy, Philippe; Lang, Hervé; Flippot, Ronan; Malouf, Gabriel G. (2019): Sarcomatoid Dedifferentiation in Renal Cell Carcinoma: From Novel Molecular Insights to New Clinical Opportunities. In: *Cancers* 12 (1). DOI: 10.3390/cancers12010099.

- Delahunt, Brett; Eble, John N.; Egevad, Lars; Samaratunga, Hemamali (2019): Grading of renal cell carcinoma. In: *Histopathology* 74 (1), S. 4–17. DOI: 10.1111/his.13735.
- Glaros, S.; Cirrincione, G. M.; Muchardt, C.; Kleer, C. G.; Michael, C. W.; Reisman, D. (2007): The reversible epigenetic silencing of BRM: implications for clinical targeted therapy. In: *Oncogene* 26 (49), S. 7058–7066. DOI: 10.1038/sj.onc.1210514.
- Gnarra, J. R.; Tory, K.; Weng, Y.; Schmidt, L.; Wei, M. H.; Li, H. et al. (1994): Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. In: *Nature genetics*, 85-90.
- Hammerschmied, C. G.; Walter, B.; Hartmann, A. (2008): Nierenzellkarzinom 2008. Histopathologie, Molekulargenetik und neue Therapien. In: *Der Pathologe* 29 (5), S. 354–363. DOI: 10.1007/s00292-008-1011-5.
- Hopson, Sarah; Thompson, Martin J. (2017): BAF180: Its Roles in DNA Repair and Consequences in Cancer. In: *ACS chemical biology* 12 (10), S. 2482–2490. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00541.
- Howitt, Brooke E.; Folpe, Andrew L. (2021): Update on SWI/SNF-related gynecologic mesenchymal neoplasms: SMARCA4-deficient uterine sarcoma and SMARCB1-deficient vulvar neoplasms. In: *Genes, chromosomes & cancer* 60 (3), S. 190–209. DOI: 10.1002/gcc.22922.
- Humphrey, Peter A. (2011): Renal cell carcinoma with rhabdoid features. In: *The Journal of urology* 186 (2), S. 675–676. DOI: 10.1016/j.juro.2011.05.016.
- Inoue, Hiroko; Furukawa, Takako; Giannakopoulos, Stavros; Zhou, Sharleen; King, David; Tanese, Naoko (2002): Largest subunits of the human SWI/SNF chromatin remodeling complex promote transcriptional activation by steroid hormone receptors. In: *JBC Papers*.
- Ito, T.; Yamauchi, M.; Nishina, M.; Yamamichi, N.; Mizutani, T.; Ui, M. et al. (2001): Identification of SWI.SNF complex subunit BAF60a as a determinant of the transactivation potential of Fos/Jun dimers. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (4), S. 2852–2857. DOI: 10.1074/jbc.M009633200.
- Kadoch, Cigall; Crabtree, Gerald R. (2015): Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: Mechanistic insights gained from human genomics. In: *Science advances* 1 (5), e1500447. DOI: 10.1126/sciadv.1500447.
- Kaelin, William G. (2002): Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (9), S. 673–682. DOI: 10.1038/nrc885.

- Kim, Moonsik; Joo, Jin Woo; Lee, Seok Joo; Cho, Yoon Ah; Park, Cheol Keun; Cho, Nam Hoon (2020): Comprehensive Immunoprofiles of Renal Cell Carcinoma Subtypes. In: *Cancers* 12 (3), S. 1–16. DOI: 10.3390/cancers12030602.
- Kinoshita, Fumio; Kohashi, Kenichi; Sugimoto, Masaaki; Takamatsu, Dai; Kiyozawa, Daisuke; Eto, Masatoshi; Oda, Yoshinao (2020): The SWI/SNF chromatin-remodeling complex status in renal cell carcinomas with sarcomatoid or rhabdoid features. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 477 (5), S. 651–660. DOI: 10.1007/s00428-020-02839-z.
- Kononen, Juha; Bubendorf, Lukas; Kallioniemi, Anne; Barlund, Maarit; Schraml, Peter; Leighton, Stephen et al. (1998): Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. In: *Nature medicine*, 844-847.
- Lang, Gudrun (2006): Histotechnik. Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik ; [für MTA und biomedizinische AnalytikerInnen]. Wien: Springer. Online verfügbar unter <http://swbplus.bsz-bw.de/bsz255243367cov.htm>.
- Liao, Lili; Testa, Joseph R.; Yang, Haifeng (2015): The roles of chromatin-remodelers and epigenetic modifiers in kidney cancer. In: *Cancer genetics* 208 (5), S. 206–214. DOI: 10.1016/j.cancergen.2015.02.008.
- Liao, Xiaoyan; Abu-Farsakh, Sohaib H.; Zhang, Dongwei (2019): Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma With Unusual Metastasis to the Small Intestine Manifesting as Perforated Appendicitis. In: *In vivo (Athens, Greece)* 33 (6), S. 2225–2228. DOI: 10.21873/invivo.11726.
- Mashtalir, Nazar; D'Avino, Andrew R.; Michel, Brittany C.; Luo, Jie; Pan, Joshua; Otto, Jordan E. et al. (2018): Modular Organization and Assembly of SWI/SNF Family Chromatin Remodeling Complexes. In: *Cell* 175 (5), 1272-1288. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.032.
- Miyake, Noriko; Abdel-Salam, Ghada; Yamagata, Takanori; Eid, Maha M.; Osaka, Hitoshi; Okamoto, Nobuhiko et al. (2016): Clinical features of SMARCA2 duplication overlap with Coffin-Siris syndrome. In: *American journal of medical genetics. Part A* 170 (10), S. 2662–2670. DOI: 10.1002/ajmg.a.37778.
- Moch, Holger; Humphrey, Peter A.; Ulbright, Thomas M.; Reuter, Victor (Hg.) (2016): WHO Classification of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs. World Health Organization. 4. Aufl.: International Agency for Research on Cancer.
- Moch, Holger; Schraml, Peter; Bubendorf, Lukas; Richter, Jan; Gasser, Thomas C.; Mihatsch, Michael; Sauter, Guido (1998): Intratumoral Heterogeneity of Von Hippel-Lindau Gene Deletions in Renal Cell Carcinoma Detected by Fluorescence in Situ Hybridization. In: *Cancer research*, S. 2304–2309.

- Motzer, Robert J.; Jonasch, Eric; Agarwal, Neeraj; Bhayani, Sam; Bro, William P.; Chang, Sam S. et al. (2017): Kidney Cancer, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. In: *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 15 (6), S. 804–834. DOI: 10.6004/jnccn.2017.0100.
- Nagl, Norman G.; Wang, Xiaomei; Patsialou, Antonia; van Scy, Michael; Moran, Elizabeth (2007): Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control. In: *The EMBO Journal* (26), S. 752–763.
- Nocito, Antonio; Kononen, Juha; Kallioniemi, Olli-P.; Sauter, Guido (2001): Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. In: *Cancer*, S. 1–5.
- Pawłowski, Rafal; Mühl, Sarah M.; Sulser, Tullio; Krek, Wilhelm; Moch, Holger; Schraml, Peter (2013): Loss of PBRM1 expression is associated with renal cell carcinoma progression. In: *International journal of cancer* 132 (2), 11-17. DOI: 10.1002/ijc.27822.
- Peinado, Paola; Andrades, Alvaro; Cuadros, Marta; Rodriguez, Maria Isabel; Coira, Isabel F.; Garcia, Daniel J. et al. (2020): Comprehensive Analysis of SWI/SNF Inactivation in Lung Adenocarcinoma Cell Models. In: *Cancers* 12 (12). DOI: 10.3390/cancers12123712.
- Peña-Llopis, Samuel; Vega-Rubín-de-Celis, Silvia; Liao, Arnold; Leng, Nan; Pavía-Jiménez, Andrea; Wang, Shanshan et al. (2012): BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. In: *Nature genetics* 44 (7), S. 751–759. DOI: 10.1038/ng.2323.
- Peralta-Venturina, Mariza de; Moch, Holger; Amin, Mutual; Tamboli, Pheroze; Hailemariam, Seife; Mihatsch, Michael et al.: sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma.
- Peterson, Craig; Dingwall, Andrew; Scott, Matthew (1994): Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (91), S. 2905–2908.
- Reisman, D.; Glaros, S.; Thompson, E. A. (2009): The SWI/SNF complex and cancer. In: *Oncogene* 28 (14), S. 1653–1668. DOI: 10.1038/onc.2009.4.
- Reuter, Victor; Argani, Pedram; Zhou, Ming; Delahunt, Brett (2014): Best Practices Recommendations in the Application of Immunhistochemistry in the Kidney Tumors. In: *Am J Surg Pathol*, S. 35–49.
- Ring, H. Z., et al. (1998): Five SWI/SNF-Related, Matrix-Associated, Actin-Dependent Regulator of Chromatin (SMARC) Genes Are Dispersed in the Human Genome. In: *Genomics*, S. 140–143.

Robert-Koch-Institut (2015): Krebs in Deutschland 2011/2012. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 10 Ausg. 2015.

Roberts, Charles W. M.; Biegel, Jaclyn A. (2009): The role of SMARCB1/INI1 in development of rhabdoid tumor. In: *Cancer biology & therapy* 8 (5), S. 412–416. DOI: 10.4161/cbt.8.5.8019.

Romero, O. A.; Sanchez-Cespedes, M. (2014): The SWI/SNF genetic blockade: effects in cell differentiation, cancer and developmental diseases. In: *Oncogene* 33 (21), S. 2681–2689. DOI: 10.1038/onc.2013.227.

Romero, Octavio A.; Setien, Fernando; John, Sam; Gimenez-Xavier, Pol; Gómez-López, Gonzalo; Pisano, David et al. (2012): The tumour suppressor and chromatin-remodelling factor BRG1 antagonizes Myc activity and promotes cell differentiation in human cancer. In: *EMBO molecular medicine* 4 (7), S. 603–616. DOI: 10.1002/emmm.201200236.

S3-Leitlinie (2017): Nierenzellkarzinom, S. 1–219.

Sasaki, Mariko; Ogiwara, Hideaki (2020): Synthetic lethal therapy based on targeting the vulnerability of SWI/SNF chromatin remodeling complex-deficient cancers. In: *Cancer science* 111 (3), S. 774–782. DOI: 10.1111/cas.14311.

Schaaf, Christian P.; Zschocke, Johannes (2018): Basiswissen Humangenetik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Schaefer, Inga-Marie; Hornick, Jason L. (2021): SWI/SNF complex-deficient soft tissue neoplasms: An update. In: *Seminars in diagnostic pathology* 38 (3), S. 222–231. DOI: 10.1053/j.semdp.2020.05.005.

Sekine, Ikuo; Sato, Mitsuo; Sunaga, Noriaki; Toyooka, Shinichi; Peyton, Michael; Parsons, Ramon et al. (2005): The 3p21 candidate tumor suppressor gene BAF180 is normally expressed in human lung cancer. In: *Oncogene* 24 (16), S. 2735–2738. DOI: 10.1038/sj.onc.1207694.

Shain, A. Hunter; Pollack, Jonathan R. (2013): The Spectrum of SWI/SNF Mutations, Ubiquitous in Human Cancer. In: *PLoS one*, S. 1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0055119.t001.

Siegel, Rebecca L.; Miller, Kimberly D.; Jemal, Ahmedin (2019): Cancer statistics, 2019. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 69 (1), S. 7–34. DOI: 10.3322/caac.21551.

Simon, Ronald; Sauter, Guido (2010): Tissue Microarrays. Totowa, NJ: Humana Press (664).

Störkel, Stephan; Eble, John N.; Adlakha, K.; Amin, Mahul B.; Blute, Michael L.; Bostwick, David G. et al. (1997): Classification of renal cell carcinoma. In: *Cancer*, S. 987–989.

- Torhorst, Joachim; Bucher, Christoph; Kononen, Juha; Haas, Philippe; Zuber, Markus; Köchli, Ossi R. et al. (2001): Tissue Microarrays for Rapid Linking of Molecular Changes to Clinical Endpoints. In: *The American Journal of Pathology* 159 (6), S. 2249–2256. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63075-1.
- Tuoc, Tran Cong; Boretius, Susann; Sansom, Stephen N.; Pitulescu, Mara-Elena; Frahm, Jens; Livesey, Frederick J.; Stoykova, Anastassia (2013): Chromatin regulation by BAF170 controls cerebral cortical size and thickness. In: *Developmental cell* 25 (3), S. 256–269. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.04.005.
- Versteege, Isabella; Sévenet, Nicolas; Lange, Julian; Rousseau-Merck, Marie-Francoise; Ambros, Peter; Handgretinger, Rupert et al. (1998): Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. In: *Nature* (394), S. 203–206.
- Wang, Gangmin; Lv, Qi; Ma, Chunhui; Zhang, Yinan; Li, Haoming; Ding, Qiang (2021): SMARCC1 expression is positively correlated with pathological grade and good prognosis in renal cell carcinoma. In: *Translational andrology and urology* 10 (1), S. 236–242. DOI: 10.21037/tau-20-935.
- Wang, Yemin; Hoang, Lien; Ji, Jennifer X.; Huntsman, David G. (2020): SWI/SNF Complex Mutations in Gynecologic Cancers: Molecular Mechanisms and Models. In: *Annual review of pathology* 15, S. 467–492. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012917.
- Wang, Zixing; Kim, Tae Beom; Peng, Bo; Karam, Jose; Creighton, Chad; Joon, Aron et al. (2017): Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma Has a Distinct Molecular Pathogenesis, Driver Mutation Profile, and Transcriptional Landscape. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23 (21), S. 6686–6696. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1057.
- Warren, Anne Y.; Harrison, David (2018): WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. In: *World journal of urology* 36 (12), S. 1913–1926. DOI: 10.1007/s00345-018-2447-8.
- Yoshinaga, Steven; Peterson, Craig; Herskowitz, Ira; Yamamoto Keith (1992): Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 Proteins for Transcriptional Enhancement by Steroid Receptors. In: *Science*, S. 1598–1604.

VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	-	Abbildung
ACTL6A	-	Actin like 6A
adj HR	-	adjusted hazard ratio
AP-1	-	Aktivator-Protein 1
ARID	-	AT-rich interaction domain
ATP	-	Adenosintriphosphat
ATPase	-	Adenosintriphosphatase
BAF	-	BRG1-/BRM-assoziierter Faktor
BAP	-	BRCA-assoziiertes Protein
BCL7A	-	B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 7 protein family member A
BRD	-	Bromodomain-containing Protein
BRG1	-	Brahma-related gene 1
BRM	-	Brahma
bzw.	-	beziehungsweise
CD10	-	cluster of differentiation 10
CI	-	confidence interval
CK7	-	Zytokeratin 7
cM	-	clinical metastases
CT	-	Computertomographie
DAB	-	3,3'-Diaminobenzidine
d. h.	-	das heißt
DNS	-	Desoxyribonucleinsäure
DPF1/2/3	-	double PHD fingers 1
ebd.	-	ebenda
EKLF	-	Erythroid Krüppel-like factor
EMT	-	epitheliale-mesenchymale Transition
eNOS	-	endothelial nitric oxide synthase
ERK	-	extracellular signal-regulated kinase 1
FISH	-	Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung
G	-	Tumograd
ggf.	-	gegebenenfalls
GLTSCR1	-	Glioma Tumor Suppressor Candidate Region Gene 1
GLTSCR1L	-	GLTSCR1-like
HE	-	Hämatoxylin-Eosin
HIF	-	Hypoxie-induzierter Faktor
HR	-	hazard ratio

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IFN	-	Interferon
IL	-	Interleukin
INI1	-	integrase interactor 1
ISUP	-	International Society of Urological Pathology
kzNZK	-	klarzelliges Nierenzellkarzinom
L	-	Lymphgefäßinvasion
MAPK	-	mitogen activated protein kinase
MEK	-	MAPK/ERK-Kinase
MRT	-	Magnetresonanztomographie
mTOR	-	mammal target of rapamycin
N	-	Nodalstatus
n. b.	-	nicht bekannt
ncBAF	-	non-canonical BAF-Komplex
OS	-	overall survival – Gesamtüberleben
p	-	pathologisch
PAX8	-	Paired-Box-Protein 8
PBAF	-	Polybromo-assozierter-BAF-Komplex
PBRM1	-	Polybromo 1
PCR	-	Polymerasekettenreaktion
PDGF	-	platelet-derived growth factor
PD-L1	-	programmes death-ligand 1
PFS	-	progression-free survival – progressionsfreies Überleben
PHF10	-	PHD finger protein 10
PI3K	-	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PTEN	-	“phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten” Gen
RAC	-	rho family small GTP-binding protein
RNase	-	Ribonuklease
RTK	-	Rezeptortyrosinkinase
SAP	-	Systemanalyse Programmentwicklung
SMARC	-	SWI/SNF-related, matrix associated, actindependent regulator of chromatin
sog.	-	sogenannt
SPSS	-	Statistical Package of Social Science
SS18	-	synovial sarcoma translocation, chromosome 18
SWI/SNF	-	Switch/Sucrose
T	-	Tumorstadium
Tab.	-	Tabelle

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TMA	-	Tissue Microarrays
TNM	-	Tumor, Nodes, Metastasen
TP53	-	Tumor Protein 53
TT	-	Target Therapie
u.a.	-	unter anderem
uncert. Sig.	-	uncertain significance
V	-	venöse Angioinvasion
VEGF	-	vascular endothelial growth factor
VHL	-	von-Hippel-Lindau
vs.	-	versus
vsl.	-	voraussichtlich
WHO	-	World Health Organisation
z.B.	-	zum Beispiel
z.T.	-	zum Teil

IX. HERSTELLERANGABEN ZU VERWENDETEN REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTEN

Reagenzien/Material	Firmenname	Stadt	Land
Präzisions-Stanzgerät	Beecher Instruments	Sun Prairie	USA
EnVision Flex High pH	Agilent	Santa Clara	USA
EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801)	Agilent	Santa Clara	USA
EnVision FLEX Wash Buffer	Agilent	Santa Clara	USA
EnVision Flex Hämatoxylin	Agilent	Santa Clara	USA
Dako Autostainer Link48	Agilent	Santa Clara	USA
ZytoLightFISH-Tissue Implementation Kit	ZytoVision	Bremerhaven	Deutschland
ZytoLight SPEC VHL/CEN 3 Sonde	ZytoVision	Bremerhaven	Deutschland
Incu-Line Ofen	VWR	Radnor	USA
Olympus BX53 Mikroskop	Olympus	Shinjuku	Japan
Rotihistol	Roth	Karlsruhe	Deutschland
GeneRead DNS FFPE Kit	Qiagen	Venlo (Holding) Hilden (operativ)	Niederlande Deutschland
QIAamp MinElute-Säule	Qiagen	Venlo (Holding) Hilden (operativ)	Niederlande Deutschland
MyTaqHS Polymerase	Bioline	Memphis	USA
Polymerase Phire Hot Start	Thermo Scientific	Waltham	USA
Agarose Gel	Roth	Karlsruhe	Deutschland
Midori Green Farbstoff	BioCon	Mönchberg	Deutschland
Exonuklease I	Thermo Scientific	Waltham	USA

HERSTELLERANGABEN ZU VERWENDETEN REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTEN

Reagenzien/Material	Firmenname	Stadt	Land
Alkalische Phosphatase	Thermo Scientific	Waltham	USA
BD Puffer	Thermo Scientific	Waltham	USA
BDX64	NimaGen	Nijmegen	Niederlande
BigDye Cycling Sequencing Kit v1.1	Applied Biosystems	Darmstadt	Deutschland
BigDye Cycling Sequencing Kit v3.1	Applied Biosystems	Darmstadt	Deutschland
BigDye XTerminator Purification Kit	Applied Biosystems	Darmstadt	Deutschland
SPSS Amos 27 Software	IBM	Ehningen	Deutschland

X. THESEN PAPER

1. 70 % aller Nierenzellkarzinome sind klarzellige Nierenzellkarzinome; eine Subgruppe mit spezieller genetischer Aberration und in der Regel klarzelliger Morphologie mit starkem Gefäßreichtum. 5 % davon weisen eine Dedifferenzierung mit rhabdoider und/oder sarkomatoider Komponente auf. Eine sarkomatoide und/oder rhabdoide Komponente verschlechtert die Prognose der Patient:innen mit Nierenzellkarzinom signifikant.
2. Bislang ist wenig über molekulare Mechanismen bekannt, die zur Dedifferenzierung in Nierenzellkarzinomen führen. Es gibt aber erste Hinweise, dass der Switch-Sucrose-Pfad eine Rolle spielen könnte. Funktionell ist der SWI/SNF-Komplex entscheidend bei der ATP-abhängigen Chromatinremodellierung und einzelne Untereinheiten wirken als Tumorsuppressor.
3. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Zusammenhang zwischen einer Dedifferenzierung in NZK und einem Proteinverlust des SWI/SNF-Komplexes zu zeigen.
4. Die häufigsten Proteinverluste fanden sich bei BAF180, SMARCB1 und SMARCC1, danach von ARID1A. SMARCA4-Verlust trat nur in Kombination mit einem SMARCA2-Verlust auf. Es gab keine Verluste von SMARCC2.
5. Ein Proteinverlust trat vermehrt in NZK mit sarkomatoider und/oder rhabdoider Morphologie auf. Ein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen dem SWI/SNF-Verlust in einer hochgradigen Tumorkomponente (vs. kein Verlust) und einer verkürzten Überlebenszeit.
6. Der SWI/SNF-Proteinverlust trat überwiegend in der hochgradigen Komponente von NZK auf, konnte jedoch bereits in der niedriggradigen Komponente vorhanden sein. Dies könnte als Hinweis gewertet werden, dass der SWI/SNF-Proteinverlust früh in der Tumorentwicklung auftritt mit Folge der Dedifferenzierung in klarzelligen NZK.
7. Es wurde versucht zu klären, ob Mutationen für die Verluste des SMARCB1 verantwortlich sind. Es fanden sich in sieben von 26 Fällen (27 %) mit SMARCB1-Verlust Mutationen, so dass abgesehen von Mutationen andere Mechanismen für die Stilllegung des Gens eine Rolle spielen dürften.

XI. LEBENSLAUF

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf nicht online veröffentlicht.

XII. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Aus Datenschutzgründen wird die eidestattliche Versicherung nicht online veröffentlicht.

XIII. DANKSAGUNG

Aus Datenschutzgründen wird die Danksagung nicht online veröffentlicht.