

Aus der
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Immunologische Marker und somatische Mutationen
als Prädiktoren für die Therapieauswahl beim
metastasierten Nierenzellkarzinom**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Herrmann, Lisa

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Bedke

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. D. Hartkopf

Tag der Disputation: 27.01.2025

Widmung

Meiner geliebten Familie.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Formelverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis und Symbolverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Das Nierenzellkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.3 Diagnostik	4
1.1.4 Klassifikation	5
1.1.5 Therapie	7
1.1.5.1 Aktive Überwachung	7
1.1.5.2 Ablative Verfahren und Palliation	8
1.1.5.3 Operative Therapien	8
1.1.5.4 Systemtherapien	10
1.1.6 Prognose	16
1.2 Potenzielle Biomarker für das Nierenzellkarzinom	18
1.2.1 Programmed Cell Death Rezeptor 1 (PD-1) und sein Ligand (PD-L1)	19
1.2.2 B- und T-Lymphozyten-Attenuator (BTLA)	22
1.2.3 T-Zell Immunglobulin- und Muzindomänen-haltiges Protein-3 (hTIM3)	24
1.2.4 Zytotoxisches T-Lymphozyten-Assoziiertes Protein 4 (CTLA4)	25
1.2.5 Lymphozytenaktivierungsgen 3 (LAG3)	26
1.3 Somatische Mutationen	28
1.4 Zellkulturmethoden als Ansatz für in-vitro Therapieansprechen	33
1.5 Fragestellung der Arbeit	36

2	Material und Methoden	38
2.1	Patientenkollektiv und Datenerhebung	38
2.2	Gewebeprobenmaterial	39
2.3	Hämatoxylin-Eosin-Schnitte	40
2.4	Einscannen und Bearbeiten der Hämatoxylin-Eosin-Schnitte	40
2.5	DNA Isolierung und Konzentrationsbestimmung	41
2.6	Mutationsanalysen mittels Next Generation Sequencing	44
2.7	Tissue Micro Array Technik	45
2.8	Immunhistochemie EN Vision Methode	47
2.9	Standardisierte automatisierte Auswertung mit Tissue Studio®	49
2.10	Zellkultur	54
2.10.1	Generierung und Kultivierung von Patientenabgeleiteten Air-Liquid-Interface Tumormodellen	54
2.10.2	Passagieren und Einfrieren der Tumormodelle	55
2.10.3	Charakterisierung der Tumormodelle	55
2.10.4	Zelltoxizitätsassay	56
2.11	Statistische Auswertung	57
2.12	Tabellarische Auflistung von verwendetem Material und Geräten	59
2.12.1	Antikörper	59
2.12.2	Kits	60
2.12.3	Zellkulturmedium	61
2.12.4	Reagenzien und Chemikalien	62
2.12.5	Arbeitsgeräte	64
2.12.6	Einwegmaterial	66
2.12.7	Software	67
3	Ergebnisse	68
3.1	Patientenkohorte	68
3.2	Proteinexpression	70
3.3	Resultate der standardisierten Software-Auswertung	71
3.3.1	Evaluation der Proteinexpression von PD-L1	71
3.3.2	Evaluation der Proteinexpression von BTLA	75
3.3.3	Evaluation der Proteinexpression von hTIM3	78

3.3.4	Evaluation der Proteinexpression von CTLA4	81
3.3.5	Evaluation der Proteinexpression von LAG3	84
3.3.6	Exemplarische Gegenfärbung auf CD8	87
3.4	Korrelation der Proteinexpression im Primärtumorgewebe zu klinisch-pathologischen Merkmalen	88
3.4.1	Evaluation der Proteinexpression von PD-L1 im Primärtumor in Korrelation zu klinisch-pathologischen Merkmalen	89
3.4.2	Evaluation der Proteinexpression von BTLA im Primärtumor in Korrelation zu klinisch-pathologischen Merkmalen	89
3.4.3	Evaluation der Proteinexpression von hTIM3 im Primärtumor in Korrelation zu klinisch-pathologischen Merkmalen	90
3.5	Korrelation der Proteinexpression im Metastasen- und Primärtumorgewebe mit dem Überleben (OS/CSS)	91
3.5.1	Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von PD-L1 im Metastasengewebe mit dem Überleben	92
3.5.2	Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von PD-L1 im Primärtumorgewebe mit dem Überleben	95
3.5.3	Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von BTLA im Metastasengewebe mit dem Überleben	97
3.5.4	Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von BTLA im Primärtumorgewebe mit dem Überleben	100
3.5.5	Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von hTIM3 im Metastasengewebe mit dem Überleben	102
3.5.6	Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von hTIM3 im Primärtumorgewebe mit dem Überleben	105
3.5.7	Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von CTLA4 im Metastasengewebe mit dem Überleben	107
3.5.8	Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von LAG3 im Metastasengewebe mit dem Überleben	108
3.6	Evaluation der Proteinexpression im zeitlichen Verlauf	109
3.6.1	Evaluation der Proteinexpression im Metastasengewebe im zeitlichen Verlauf	110
3.6.2	Evaluation der Proteinexpression in Metastasen vs. Primärtumor im zeitlichen Verlauf	112
3.7	Evaluation der Proteinexpression in Zusammenhang mit somatischen Mutationen	113

3.8	Evaluation der Auswirkungen einer systemischen Therapie auf die Proteinexpression	118
3.9	Zytotoxizität von Nivolumab auf ALI Tumormodelle	122
4	Diskussion	128
5	Zusammenfassung	154
6	Literaturverzeichnis	157
7	Erklärung zum Eigenanteil	179
8	Veröffentlichungen	181
9	Danksagung	183

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung des Tissue-Studio-Scores (Score _{TS}).....	52
---	----

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verwendetes Sequenzierungspanel mit 1248 Zielregionen von 32 Kandidatengen, die mit der Pathophysiologie des RCC in Zusammenhang stehen [192].	45
Abbildung 2: TMA (hTIM3) für die Auswertung mit Tissue Studio® (Definiens AG).	53
Abbildung 3: Gewebestanden mit unterschiedlich starker PD-L1 Färbung.....	71
Abbildung 4: Auswertung der Proteinexpression von PD-L1 mit der Software Tissue Studio® (Definiens AG).	72
Abbildung 5: Expression von PD-L1, BTLA und hTIM3 im Metastasen- vs. Primärtumorgewebe (n = 59).	73
Abbildung 6: PD-L1-Expression im Metastasengewebe je nach Lokalisation. .	74
Abbildung 7: Gewebestanden mit unterschiedlich starker BTLA Färbung.....	75
Abbildung 8: Auswertung der Proteinexpression von BTLA mit der Software Tissue Studio® (Definiens AG).	75
Abbildung 9: BTLA-Expression im Metastasengewebe je nach Lokalisation. ..	77
Abbildung 10: Gewebestanden mit unterschiedlich starker hTIM3 Färbung.....	78
Abbildung 11: Auswertung der Proteinexpression von hTIM3 mit der Software Tissue Studio® (Definiens AG).	78
Abbildung 12: HTIM3-Expression im Metastasengewebe je nach Lokalisation.	80
Abbildung 13: Gewebestanden mit negativer und positiver CTLA4 Färbung. ..	81
Abbildung 14: Auswertung der Gesamtzellzahl bei CTLA4 Färbung mit der Software Tissue Studio® (Definiens AG).	81
Abbildung 15: CTLA4-Expression in Metastasen vs. Primärtumor.	82
Abbildung 16: CTLA4-Expression im Metastasengewebe je nach Lokalisation.	83
Abbildung 17: Gewebestanden mit negativer und positiver LAG3 Färbung.	84

Abbildung 18: Auswertung der Gesamtzellzahl bei LAG3 Färbung mit der Software Tissue Studio® (Definiens AG).....	84
Abbildung 19: LAG3-Expression in Metastasen vs. Primärtumor.	85
Abbildung 20: LAG3-Expression im Metastasengewebe je nach Lokalisation.	87
Abbildung 21: Positive Gewebestanze der Gegenfärbung auf CD8.	87
Abbildung 22: BTLA-Expression vs. Geschlecht.	90
Abbildung 23: PD-L1-Expression in den Metastasen vs. Überleben.	94
Abbildung 24: PD-L1-Expression im Primärtumor vs. Überleben.	96
Abbildung 25: BTLA-Expression in den Metastasen vs. Überleben.	99
Abbildung 26: BTLA-Expression im Primärtumor vs. Überleben.	101
Abbildung 27: HTIM3-Expression in den Metastasen vs. Überleben.....	104
Abbildung 28: HTIM3-Expression im Primärtumor vs. Überleben.	106
Abbildung 29: CTLA4-Expression für alle Metastasen (n = 230) vs. Überleben.	107
Abbildung 30: LAG3-Expression für alle Metastasen (n = 230) vs. Überleben.	108
Abbildung 31: Zeitliche Verläufe von Metastasen und Proteinexpression.....	109
Abbildung 32: Proteinexpression in den Metastasen (n = 230) im zeitlichen Verlauf.....	111
Abbildung 33: Proteinexpression in Metastasen vs. Primärtumor im zeitlichen Verlauf.....	112
Abbildung 34: PD-L1-Expression vs. Tumormutationslast (mTOR).....	115
Abbildung 35: PD-L1-Expression vs. Tumormutationslast (VHL).	117
Abbildung 36: Abfolge der Metastasenoperationen und der verabreichten Systemtherapien (n = 82).....	119
Abbildung 37: Abfolge der Metastasenoperationen und der präoperativ erhaltenen Systemtherapien (n = 31).	120
Abbildung 38: Proteinexpression in den Metastasen vs. Systemtherapie (n = 31).	121
Abbildung 39: Cellimaging der ALI Tumormodelle.....	122
Abbildung 40: Immunhistochemische Charakterisierung eines ALI Tumormodells.	123

Abbildung 41: Immunhistochemie der mit Nivolumab behandelten Gewebekultur nach sieben Tagen.	124
Abbildung 42: Immunhistochemie der Kontrollgruppe (unbehandelte Gewebekultur) nach sieben Tagen.	125
Abbildung 43: Cellimaging des CellTox™ Green Cytotoxicity Assay der mit Nivolumab behandelten Gewebekulturen nach sieben Tagen.	126
Abbildung 44: Cellimaging des CellTox™ Green Cytotoxicity Assay der Kontrollgruppe (unbehandelte Gewebekulturen) nach sieben Tagen.....	126
Abbildung 45: Ergebnisse des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays.	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tumorstadien des Nierenzellkarzinoms nach der 8. Edition der UICC-TNM von 2017 [3].	6
Tabelle 2: Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms nach UICC [3].	6
Tabelle 3: Grading-System der WHO/ISUP für das klarzellige und das papilläre Nierenzellkarzinom [31].	7
Tabelle 4: Übersicht systemischer Therapeutika.	16
Tabelle 5: Verwendete validierte Antikörper für Immunhistochemie (EN Vision Methode) und Verdünnungen.	59
Tabelle 6: Verwendete Kits mit Inhalt.	60
Tabelle 7: Zellkulturmedium Patientenabgeleitete Air-Liquid-Interface Tumormodelle und Zusätze.	61
Tabelle 8: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.	62
Tabelle 9: Verwendete Arbeitsgeräte.	64
Tabelle 10: Verwendetes Einwegmaterial.	66
Tabelle 11: Verwendete Software.	67
Tabelle 12: Patientenkohorte mit detaillierten klinisch-pathologischen Charakteristika.	68
Tabelle 13: Zuordnung Histologie Primärtumor vs. Histologie Metastasen.	70
Tabelle 14: Übersicht der Korrelationen der Proteinexpression im Primärtumorgewebe mit den klinisch-pathologischen Merkmalen.	88
Tabelle 15: Übersicht der Korrelationen (p-Werte) der Proteinexpression mit dem Überleben (OS/CSS).	91
Tabelle 16: Übersicht ausgewertete Gene vs. PD-L1-Expression in Metastasen.	113
Tabelle 17: Tumormutationslast (mTOR, VHL) vs. Proteinexpression (PD-L1).	114

Abkürzungsverzeichnis und Symbolverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AS	engl.: Active Surveillance
adj.	adjustiert
AKT	Proteinkinase B = PKB
ALI	engl.: Air-Liquid-Interface
BR	engl.: Broad Range
BSA	engl.: Bovine Serum Albumin
BTLA	B- und T-Lymphozyten-Attenuator
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
ccRCC	engl.: Clear cell Renal Cell Carcinoma
CD	engl.: Cluster of Differentiation
chrRCC	engl.: chromophobe Renal Cell Carcinoma
CSS	engl.: Cancer Specific Survival
CT	Computertomographie
CTL	engl.: Cytotoxic T-Lymphocyte
CTLA4	engl.: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: Desoxyribonucleid Acid
dsDNA	doppelsträngige DNA
EU	Europäische Union
FFPE	engl.: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissue
FUP	engl.: Follow-up
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Ggf.	gegebenenfalls
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRP	engl.: Horseradish peroxidase
HS	engl.: High Sensitivity

Abkürzung	Bedeutung
hTIM3	engl.: human T-Cell Immunoglobulin and Mucin Containing Protein-3
ICI	Immun-Checkpoint-Inhibitoren
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IKP	Institut für Klinische Pharmakologie
IL	Interleukin
IMDC	engl.: International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium
IO	Immunonkologie
ISUP	engl.: International Society of Urothology
LAG3	engl.: Lymphocyte Activation Gene 3
MDSC	engl.: Myeloid-Derived Suppressor Cells
mRCC	engl.: metastatic Renal Cell Carcinoma
MRT	Magnetresonanztherapie
mTOR	engl.: Mammalian Target of Rapamycin
NA	engl.: not available bzw. Keine Angabe/unbekannt
NGS	engl.: Next Generation Sequencing
NK	Natürliche Killerzellen
NSCLC	engl.: Non-Small-Cell Lung Cancer
o. g.	oben genannt
OP	Operation
ORR	engl.: Objective Response Rate
OS	engl.: Overall Survival
papRCC	engl.: papillary Renal Cell Carcinoma
PBMC	engl.: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	engl.: Phosphate Buffered Saline
PCR	engl.: Polymerase Chain Reaction
PD-1	engl.: Programmed (Cell) Death-1 Receptor
PD-L1	engl.: Programmed (Cell) Death-1 Receptor Ligand
PDO	engl.: Patient Derived Organoid

Abkürzung	Bedeutung
PFA	Phosphatgepuffertes Formaldehyd
PFS	engl.: Progression Free Survival
PI3-K	Phosphoinosid-3-Kinase
RBK	Robert-Bosch-Krankenhaus
RCC	engl.: Renal Cell Carcinoma
RNA	engl.: Ribonucleid Acid
ROI	engl.: Region Of Interest
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s. o. / s. u.	siehe oben / siehe unten
ScoreTS	engl.: Tissue-Studio-Score
SHP	engl.: Src homology domain 2 Phosphatase
sPD-(L)1	engl.: soluble PD-(L)1
SRM	engl.: Small Renal Mass
T(H)1/2	T-Helferzellen Typ 1/2
Tab.	Tabelle
TBST	engl.: Tris-Buffered-Saline plus Tween
TC	engl.: Tissue Cultures
TCGA	engl.: The Cancer Genome Atlas
TCR	engl.: T-Cell Receptor
TIGIT	T-Zell-Immunrezeptor mit Ig- und ITIM-Domänen
TIL	Tumorerfiltrierende Lymphozyten
TKI	Tyrosinkinaseinhibitoren
TMA	engl.: Tissue Micro Array
TMB	engl.: Tumor Mutation Burden
TME	engl.: Tumor Micro Environment
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen
u. a.	unter anderem
UICC	franz.: Union Internationale Contre Le Cancer
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
v. a.	vor allem

Abkürzung	Bedeutung
VEGF(/R)	engl.: Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)
VHL	Von-Hippel-Lindau
vs.	versus
WHO	engl.: World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
Symbol	Bedeutung
°C	Grad Celcius
X ⁺	positiv
X ⁻	negativ
+	plus
%	Prozent
α	alpha
γ	gamma
x g	Zentrifugalbeschleunigung
x	Verdünnung
cm	Centimeter
mm	Millimeter
h	Stunde
M	Molar
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
mg	Milligramm
Min.	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
pg	Pikogramm
Sek.	Sekunde
St.	Stück

Das im Text verwendete generische Maskulinum dient der besseren Lesbarkeit. Dabei werden weibliche und andere Geschlechteridentitäten ausdrücklich mitgemeint, sofern es für die Aussage erforderlich ist.

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom (engl.: Renal Cell Carcinoma = RCC) ist eine bösartige Tumorerkrankung der Niere und stellt mit anteilig über 95 Prozent (%) die größte Gruppe dieser Malignome beim Erwachsenen dar. Unter die übrigen 5 % fällt beispielsweise (bspw.) das Urothelkarzinom des Nierenbeckens oder das im Kindesalter vorkommende Nephroblastom, auch Wilmstumor genannt [1]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland für Männer bei circa (ca.) 68 Jahren und für Frauen bei ca. 71 Jahren [2]. Das RCC ist somit eher eine Erkrankung, die im höheren Alter auftritt. Mit 3,6 % aller Krebsneuerkrankungen beim Mann und 2,1 % bei der Frau ist das RCC 2020 nicht die häufigste maligne Neoplasie, aber dennoch ist sie unter allen diagnostizierten Krebsneuerkrankungen auf Platz acht beziehungsweise (bzw.) elf in Deutschland [1]. Insgesamt macht das RCC ca. 3 % aller Karzinome aus [3]. In Europa und weltweit steigt die Neuerkrankungsrate in den letzten Jahrzehnten jährlich um etwa 2 % an, sodass in der Europäischen Union (EU) im Jahr 2018 99.200 neue RCC-Fälle detektiert wurden [3]. Während hierzulande die altersstandardisierte Inzidenz leicht gesunken ist, stieg die absolute Zahl an Neuerkrankungen seit Ende der 1990er Jahre im Schnitt leicht an [2]. Jedoch sind im Jahr 2020 insgesamt 14.160 Menschen, davon 9.330 Männer bei einer standardisierten Erkrankungsrate von 15,2 pro 100.000 Menschen und 4.830 Frauen bei einer standardisierten Erkrankungsrate von 6,6 pro 100.000 Menschen und damit weniger als die vorhergehenden Jahre an einem RCC erkrankt [1]. Die 5-Jahres- sowie die 10-Jahres-Prävalenz ist seit 1990 ebenfalls angestiegen und jetzt leicht rückläufig [2]. Erstere wird für Männer mit 36.300 und für Frauen mit 19.400 im Jahr 2020 angegeben. Für die 10-Jahres-Prävalenz ist

für Männer ein leichter Rückgang auf 63.800 und für Frauen auf 35.400 zu verzeichnen [1]. Das RCC ist nach dem Prostatakarzinom und dem Harnblasenkarzinom die dritthäufigste urologische bösartige Entartung und ist ursächlich für 2,5 % der Krebssterbefälle bei Männern und 1,9 % bei Frauen im Jahr 2020. In absoluten Zahlen sind in Deutschland im Jahr 2021 3.070 Männer bei einer standardisierten Sterberate von 4,1 pro 100.000 Personen und 1.790 Frauen bei einer standardisierten Sterberate von 1,7 pro 100.000 Personen an einer malignen Nierenneoplasie verstorben. Die altersstandardisierte Mortalitätsrate scheint hierbei bei beiden Geschlechtern einem leicht rückläufigen Trend zu folgen [1]. Europaweit war bis in die 1990er Jahre ein Anstieg der Mortalitätsrate zu verzeichnen, wobei die Rate seither analog zu Deutschland in vielen westeuropäischen Ländern eher eine fallende Tendenz aufweist. Dennoch sind in der EU im Jahr 2018 insgesamt 39.100 Menschen bedingt durch ein RCC verstorben [3]. Der insgesamt rückläufige Trend könnte auf verbesserte Diagnose- und Therapiekonzepte in der Gegenwart zurückzuführen sein. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt im Mittel bei 77 % für Männer und bei 79 % für Frauen und ist abhängig vom Tumorstadium, welche sich Tabelle (Tab.) 2 entnehmen lassen. Sie nimmt von 97 % im Stadium I über 87 % im Stadium II, 69 % im Stadium III ab auf nur noch 14 % im metastasierten Stadium IV [2]. In Deutschland werden 61 % der RCCs in einem frühen Stadium entdeckt [1] (siehe = s. Tab. 2).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Histologisch lässt sich das RCC in mehrere Subtypen unterteilen. Am häufigsten mit 70-80 % ist das klarzellige RCC (engl.: Clear cell Renal Cell Carcinoma = ccRCC), das so genannt wird, da der hohe Lipidgehalt im Zytoplasma im Rahmen der histologischen Präparation aufgelöst wird und ein klares Zytoplasma zurückbleibt. Am zweithäufigsten findet sich mit 10-15 % das papilläre RCC (engl.: papillary Renal Cell Carcinoma = papRCC). Die Zellen weisen typischerweise ein basophiles Zytoplasma auf [4]. Seltener ist das chromophobe RCC (engl.: chromophobe Renal Cell Carcinoma = chrRCC) mit 3-5 % [5].

Zu den eher vereinzelt auftretenden Subtypen gehört bspw. das Sammelrohrkarzinom, auch Ductus-Bellini-Karzinom genannt, welches etwa 1 % der malignen Nierenneubildungen ausmacht und seinen Ursprung in den Sammelrohrzellen der Niere hat [6]. Es wird angenommen, dass ccRCCs und papRCCs ihren Ursprung in den proximalen Tubulusepithelzellen in der Nierenrinde haben, während sich chrRCCs von Zellen des distalen Nephrons ableiten [7]. Zu den modifizierbaren Risikofaktoren mit starkem Konsens gehören das Rauchen, Adipositas und Bluthochdruck [2]. Welche Rolle körperliche Aktivität bei der Entstehung des RCC spielt ist noch nicht abschließend geklärt, wobei ihr eher ein positiver Effekt zugesprochen wird [3, 8]. Die Einnahme von Diuretika und anderen blutdrucksenkenden Medikamenten wurde ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für RCCs in Verbindung gebracht, aber ein unabhängiger Effekt von dem des Bluthochdrucks wurde nicht nachgewiesen bzw. ist nicht sicher hiervon abzugrenzen [9, 10]. Welchen Einfluss die Ernährung auf die Genese des RCC hat ist nicht ausreichend belegt, jedoch scheinen Obst, ballaststoffreiches Gemüse sowie Kaffee einen protektiven Effekt zu haben, wohingegen der Verzehr von verarbeitetem Fleisch sowie einige Analgetika von Nachteil zu sein scheinen [8, 11-13]. Außerdem mutet es an, dass die berufsbedingte Exposition mit einigen kanzerogenen Stoffen wie bspw. Trichlorethylen in der Metallindustrie oder bestimmten Benzinbestandteilen das Risiko für ein RCC erhöht [14, 15]. Als nicht modifizierbarer Risikofaktor mit starkem Konsens ist vor allem (v. a.) die terminale Niereninsuffizienz von Bedeutung [1, 2, 16]. Ein Erklärungsansatz hierfür ist das pathohistologische Bild der Niere bei terminaler Niereninsuffizienz. Es wird von Veränderungen dominiert, die direkt oder indirekt aus dem Verlust der funktionellen und strukturellen Integrität, der Tubulusatrophie, der interstitiellen Entzündungsreaktion und Fibrosierung, der arteriellen und glomerulären Sklerose sowie den krankheitsbedingt erworbenen Zysten resultieren [17]. Die meisten RCCs treten ohne familiäre Häufung auf. Jedoch erhöht sich das Risiko für Verwandte ersten oder zweiten Grades von Patienten mit einem RCC, ebenfalls daran zu erkranken [18]. In etwa 4 % der Fälle tritt das RCC im Rahmen einer hereditären Erkrankung auf. Die erblich bedingten Karzinome sind oft

bilateral lokalisiert und treten in einem jüngeren Alter auf [1, 19]. Bis heute gibt es zehn bekannte erbliche RCC-Syndrome, die mit spezifischen Keimbahnmutationen, Histologie und Komorbiditäten einhergehen [3]. Zu den bekannteren Entitäten gehören unter anderem (u. a.) das hereditäre papRCC [20], das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom [21, 22], die hereditäre Leiomyomatose [23], tuberöse Sklerose [24] sowie das Von-Hippel-Lindau (VHL)-Syndrom. Das am häufigsten vorkommende VHL-Syndrom wird durch einen Keimbahnfunktionsverlust des VHL-Gens auf einem Allel auf Chromosom 3p25-26 verursacht, der auch in sporadischen RCCs vorkommt. Ein somatisches "second hit"-Ereignis führt zum Verlust des zweiten Allels und zur Tumorneogenese. Bei Normoxie und funktionsfähigem VHL-Gen, kodiert dieses für das VHL-Protein. Letzteres ist Bestandteil eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes. Dieser Komplex markiert einen Transkriptionsfaktor, präziser den Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF), mit in der Folge dessen Ubiquitinierung und proteasomvermittelten Abbau. Der Funktionsverlust von VHL oder eine zelluläre Hypoxie führen zu einer erhöhten Expression, Stabilisierung und damit Akkumulation von HIF [25, 26]. HIF transloziert in den Zellkern und führt dort zur Transkription von Genen, die maßgeblich an der Tumorprogression beteiligt sind, bspw. der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der die Neovaskularisation im Tumor begünstigt [25].

1.1.3 Diagnostik

Früher ist das RCC v. a. im fortgeschrittenen Stadium durch die klassische Symptomtrias Flankenschmerz, tastbare abdominelle Schwellung und Hämaturie entdeckt worden. Spät auftretende Zeichen der Erkrankung können außerdem Müdigkeit, Gewichtsverlust und Anämie sein. Bis zu 40 % der Patienten mit einem symptomatischen RCC leiden im fortgeschrittenen Stadium unter paraneoplastischen Syndromen, zu denen u. a. Fieber unklarer Genese, Hyperkalziämie sowie Neuropathie gezählt werden [27, 28]. Zunehmend werden RCCs in der Bildgebung inzidentell und damit in den früheren Stadien I und II entdeckt (s. Tab. 2), was mit einer verbesserten Prognose einhergeht [29, 30].

Zur präoperativen Diagnostik und Resektionsplanung wird als Goldstandard eine Computertomographie (CT) des Abdomens bzw. bei Niereninsuffizienz oder Verdacht auf das Vorliegen eines Cavazapfens eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt. Gleichzeitig sollte eine CT-Thorax zum Ausschluss von Metastasen erfolgen. Eine Stanzbiopsie des Nierentumors oder der Metastasen wird nur durchgeführt, sofern sich dadurch die Therapieempfehlung ändert oder eine ablativ Therapie geplant ist. Die Biopsie dient dann der optimalen Therapieanpassung bzw. Vermeidung von Übertherapien [2].

1.1.4 Klassifikation

Die Klassifikation des RCC erfolgt durch den Pathologen anhand der allgemein gültigen TNM-Klassifikation, die 1974 erstmals von der „Union Internationale Contre Le Cancer“ (UICC) herausgegeben wurde und seither als internationaler Standard zur Einteilung herangezogen wird. Hierbei steht T für den Tumor und dessen lokale Ausbreitung, N für Nodus und beschreibt das Fehlen oder Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und M steht für Metastasen und beschreibt das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen. Die Klassifikation unterliegt regelmäßigen Überarbeitungen, wobei hier die 8. Ausgabe aus dem Jahr 2017 verwendet wurde. Die TNM-Tumorstadien lassen sich Tab. 1 entnehmen, die UICC-Stadieneinteilung des RCC findet sich in Tab. 2 [3]. Beim ccRCC und papRCC erfolgt die Einteilung zusätzlich durch das Grading-System der World Health Organization (WHO) und der International Society of Urothology (ISUP). Das Fuhrman-System war viele Jahre das am häufigsten verwendete Grading-System beim RCC, wird aber nicht für chrRCCs angewendet. Darüber hinaus ist das Fuhrman-System für einige der neueren Subtypen des RCC nicht validiert worden. Aus diesen Gründen wird heutzutage das vierstufige WHO/ISUP-Grading-System von der WHO empfohlen, welches der Tab. 3 entnommen werden kann [31]. Im Falle einer sarkomatoiden Differenzierung soll diese ergänzend angegeben werden, da dies die Prognose negativ beeinflusst [2].

Tabelle 1: Tumorstadien des Nierenzellkarzinoms nach der 8. Edition der UICC-TNM von 2017 [3].

8. Edition TNM der UICC	
T - TumorgroÙe	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Nachweis eines Primärtumors
T1	Tumor ≤ 7 cm in der größten Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T1a	Tumor ≤ 4 cm oder weniger
T1b	Tumor > 4 cm aber ≤ 7 cm
T2	Tumor > 7 cm in der größten Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T2a	Tumor > 7 cm aber ≤ 10 cm
T2b	Tumor > 10 cm
T3	Tumor reicht in die großen Venen oder das perinephrische Gewebe, jedoch nicht in die ipsilaterale Nebenniere und nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3a	Tumor reicht bis in die Nierenvene oder ihre segmentalen (muskelhaltigen) Äste, oder Tumor dringt in perirenales und/oder peripelvines (Sinus-) Fett ein, jedoch nicht über die Gerota-Faszie
T3b	Tumorausdehnung in Vena cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumorausdehnung in Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder infiltriert die Venenwand auf jeder Ebene
T4	Infiltration über die Gerota-Faszie (einschließlich ipsilateraler Nebenniere)
N - Nodalstatus	
NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen vorhanden
N1	Metastasen in einem oder mehreren regionalen Lymphknoten
M - Metastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms nach UICC [3].

Stadium	TNM
Stadium I	T1N0M0
Stadium II	T2N0M0
Stadium III	T3N0M0 oder T1-3N1M0
Stadium IV	T4NX-1M0 oder T1-4NX-1M1

Tabelle 3: Grading-System der WHO/ISUP für das klarzellige und das papilläre Nierenzellkarzinom [31].

Grad	Beschreibung
Grad 1	Nukleoli sind abwesend oder unauffällig und basophil bei 400-facher Vergrößerung
Grad 2	Nukleoli sind auffällig oder eosinophil bei 400-facher Vergrößerung und sichtbar, aber nicht prominent bei 100-facher Vergrößerung
Grad 3	Nukleoli sind auffällig und eosinophil bei 100-facher Vergrößerung
Grad 4	Es finden sich ein extremer Kernpleomorphismus, vielkernige Riesenzellen und/oder eine rhabdoide und/oder sarkomatoide Differenzierung.

1.1.5 Therapie

Für das RCC stehen mehrere Therapiemöglichkeiten zur Verfügung, die individuell auf den Patienten abgestimmt und gegebenenfalls (ggf.) kombiniert werden sollen.

1.1.5.1 Aktive Überwachung

Aktive Überwachung (engl.: „Active Surveillance“ = AS) ist definiert als die anfängliche Beobachtung der Tumorgöße mittels abdomineller Bildgebung. Falls es zu einer klinischen Progression des Tumors kommt, kann zu einem späteren Zeitpunkt interveniert werden. Unterschieden wird die AS von „Watchful Waiting“, welches RCC-Patienten vorbehalten ist, die aufgrund von Komorbiditäten nicht für eine spätere Therapie infrage kommen und somit keine bildgebende Nachsorge benötigen [3]. Angewendet wird die AS insbesondere bei kleinen Nierentumoren (engl.: Small Renal Mass = SRM) < 4 cm, wobei eine Tumorgöße von < 4 cm dem Übergang von Stadium T1a zu T1b nach den UICC-TNM-Stadien entspricht [2]. Die Tumorgöße, die mittels bildgebender Verfahren kontrolliert wird, gilt als wichtigster Verlaufsparemeter, ebenso wie die Wachstumsrate. Bevölkerungsbasierte Analysen demonstrieren die AS als Option für RCC-Patienten mit gutem Risikoprofil oder fortgeschrittenem Alter und/oder Komorbiditäten. Zwar zeigten operativ behandelte Patienten eine signifikant niedrigere krebsspezifische Mortalität, allerdings waren die Patienten, die dem Überwachungsarm zugewiesen wurden, älter und wahrscheinlich gebrechlicher und daher weniger geeignet für eine Operation (OP). Die Sterblichkeitsraten für andere Ursachen waren in der nicht operierten Gruppe

deutlich höher als in der chirurgischen Gruppe. In AS-Kohorten war das Wachstum von SRM in den meisten Fällen gering und eine Progression zu einer metastasierenden Erkrankung war selten und trat eher zu einem späten Zeitpunkt auf (1-2 %). Um das Progressionsrisiko abschätzen zu können sowie die Intervalle für die Bildgebung anzupassen kann es hilfreich sein, mittels Biopsie eine histologische Charakterisierung vorzunehmen [3]. So wurde in einer untersuchten Kohorte, die mit AS behandelt wurde, ein signifikanter Unterschied in Wachstum und Progression zwischen den verschiedenen RCC-Subtypen festgestellt. CcRCCs wuchsen schneller als papRCCs vom Typ 1 [32].

1.1.5.2 Ablative Verfahren und Palliation

Ablative, minimalinvasive Verfahren, wie die Kryo- und die Radiofrequenzablation, kommen für oben genannte (o. g.) Patientengruppen als fokale Therapie ebenfalls in Betracht. Hierbei werden die Tumoren durch Kälte oder Hitze thermisch geschädigt [2].

Im fortgeschrittenen Stadium ohne kurativen Ansatz steht zudem die palliative Therapie mit supportiven Maßnahmen bei tumorassoziierten Krankheitssymptomen im Sinne einer „best supportive care“ zur Verfügung [33]. Eine psychoonkologische Betreuung soll den Patienten und ihren Angehörigen während des gesamten Krankheitsverlaufs ggf. mehrfach angeboten werden [2].

1.1.5.3 Operative Therapien

Die kurative Therapie der Wahl im lokalisierten Stadium ist nach wie vor die chirurgische Kompletresektion. Der Goldstandard zur organerhaltenden Therapie im lokalisierten Tumorstadium (T1-T2) ist heute die Nierenteilresektion. Dieses Verfahren geht mit einer besseren Lebensqualität, Erhalt der Nierenfunktion sowie einer Verringerung von kardiovaskulären Folgeerkrankungen einher [34-36]. Wenn technisch möglich kann die OP minimalinvasiv durchgeführt werden [2].

Hinsichtlich des onkologischen Outcomes der Patienten sowie des Gesamtüberlebens (engl.: Overall Survival = OS), des tumorspezifischen Überlebens (engl.: Cancer Specific Survival = CSS) und des progressionsfreien Überlebens (engl.: Progression Free Survival = PFS) ergibt sich kein Unterschied zwischen dem offenen und laparoskopischen Operationsverfahren, weder für die partielle noch für die radikale Nephrektomie. Ist die partielle Nephrektomie technisch nicht möglich oder aufgrund der Tumorgöße nicht durchführbar, so wird eine radikale Nephrektomie durchgeführt [37]. Seit einigen Jahren wird die Tumornephrektomie alternativ auch roboterassistiert durchgeführt. Die Datenlage hierzu ist allerdings noch nicht ausreichend, um abschließend die Vor- und Nachteile zu beurteilen [2, 38]. Die angewendeten Verfahren sollten für jeden Patienten individuell abgewogen werden, wobei ein Erhalt der Nierenfunktion ohne negative Beeinflussung des onkologischen Outcomes priorisiert werden sollte [39].

Grundsätzlich ist eine R0 Komplettresektion anzustreben. Bei verbliebenen mikroskopisch sichtbaren Tumorzellen, pathohistologischer R1 Status, ist das Risiko für ein Lokalrezidiv erhöht, jedoch besteht keine signifikante Assoziation mit einem schlechteren OS für die Patienten, weswegen keine Nachresektion durchgeführt werden soll, sondern eine engmaschige bildgebende Überwachung empfohlen wird [2, 40-42].

Im metastasierten Stadium sollte das weitere Vorgehen generell interdisziplinär im Rahmen des Tumorboards diskutiert werden. Bei synchron metastasierten Patienten galt viele Jahre, dass der Primarius zur Prognoseverbesserung im Sinne der zytoreduktiven Therapie entfernt werden soll [2, 43, 44]. Hierzu gibt es aktuell widersprüchliche Daten. Jüngere Studien haben gezeigt, dass die direkte Systemtherapie der zytoreduktiven Therapie in Kombination mit einer Systemtherapie nicht unterlegen ist. Primärer Endpunkt war das OS (CARMENA) [45]. Bei einer metachron auftretenden Oligometastasierung mit solitären Herden soll in kurativer Intention abhängig vom Organsystem eine operative Entfernung diskutiert werden bzw. bei fehlender Möglichkeit der kompletten Resektion lokal therapiert werden, um ein klinisches M0 Stadium zu erreichen [46-50].

1.1.5.4 Systemtherapien

Anders als bei vielen Tumorentitäten stellt die klassische intravenöse Chemotherapie für das RCC keine Behandlungsoption dar. Gängige Zytostatika haben aufgrund von Resistenzen keinen zytoreduktiven Effekt. Einige Studien zeigten zwar geringe Ansprechraten bei einer sarkomatoiden Differenzierung, jedoch ergab sich kein Unterschied für das OS [51]. Während in der Vergangenheit auch die Zytokintherapie als unspezifische Immuntherapie mit bspw. Interleukin-2 (IL) und/oder Interferon- α (IFN) eine Rolle in der Behandlungsstrategie des metastasierten Nierenzellkarzinoms (engl.: metastatic Renal Cell Carcinoma = mRCC) gespielt hat, da es v. a. in Kombination mit einer Nephrektomie zu einem verbesserten OS kam, ist diese heute als alleinige Therapie bei zu geringen Ansprechraten nicht mehr empfohlen [2].

Der Bedarf an neuen Therapieoptionen für das mRCC war offensichtlich und mit besserem molekularbiologischem Verständnis wurden sogenannte zielgerichtete (engl.: targeted) Therapien entwickelt, die heute aus den Behandlungsregimen nicht mehr wegzudenken sind. Grundsätzlich geht man davon aus, dass Tumorzellen auf bestimmte biologische Stoffwechselwege angewiesen sind, die sich durch Medikamente hemmen lassen und so das Tumorstadium eindämmen können. Ein solcher Stoffwechselweg ist die Neoangiogenese. VEGF, ein starker angiogener Faktor, wird von vielen menschlichen Krebsarten sezerniert, hierbei weist das ccRCC besonders hohe Konzentrationen auf und hat ein stark vaskuläres histologisches Erscheinungsbild [52]. Wie bereits erwähnt kommt es auch in 70 % der sporadischen RCCs durch mutationsbedingte Inaktivierung des VHL-Gens zu einer Akkumulation von HIF. Über eine Überexprimierung von hypoxieinduzierbaren Genen wie VEGF wird die Angiogenese begünstigt, was einen Effekt auf die Tumorentstehung sowie die Progression hat [53]. 2003 wurde erstmals eine klinische Phase-III-Studie veröffentlicht, die gezeigt hat, dass monoklonale Antikörper, die sich gegen den membrangebundenen Wachstumsfaktor VEGF oder seinen Rezeptor (VEGF/R) richten und somit die Signaltransduktion für die Angiogenese hemmen, die Zeit

bis zum Fortschreiten der Tumorerkrankung signifikant verlängern können [54]. Seit der Erstzulassung im Jahr 2006 gehört die Targettherapie zum Standard. Zunächst hat die Hinzunahme von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) für Patienten mit günstigem oder intermediärem Risikoprofil in randomisierten kontrollierten Studien eine deutliche Verbesserung hinsichtlich des PFS im Vergleich zu einer unspezifischen Immuntherapie mit IFN gezeigt. Zu den heute angewendeten TKI gehören u. a. Cabozantinib, Pazopanib, Sunitinib, Sorafenib und Tivozanib [55-60] (s. Tab. 4).

Neben TKI gibt es mittlerweile eine Reihe neuerer Substanzklassen. Darunter zählen bspw. Inhibitoren des mammalian Target of Rapamycin (mTOR), die die Zellproliferation hemmen. Hierunter zählt z. B. Everolimus (s. Tab 4).

Einen bahnbrechenden weiteren Angriffspunkt bilden die sogenannten Immun-Checkpoints. Zu den Immun-Checkpoints gehört eine große Anzahl von Hemmungswegen, die im Immunsystem fest verdrahtet sind und die für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz, die Modulation der Dauer und Amplitude der Immunantwort zur Minimierung von kollateralen Gewebeschäden unerlässlich sind, wodurch das Immunsystem vor überschießenden Entzündungsreaktionen geschützt wird. Tumoren können bestimmte Immun-Checkpoint-Signalwege als Mechanismus der Immunresistenz durch Überexpression aktivieren, insbesondere gegen die zytotoxische Wirkung antigenspezifischer T-Zellen. Damit entziehen sich insbesondere auch RCCs dem Immunsystem und hemmen dessen antitumorale Reaktionen [61]. Das gehemmte Immunsystem greift die Tumorzellen in der Folge nicht an.

Liganden-Rezeptor-Interaktionen induzieren die suppressiven Aktivitäten der Immun-Checkpoints. Sie können durch Antikörper blockiert werden, um die endogenen antitumoralen Effekte durch Aktivierung von CD4⁺ (positiv) und CD8⁺ T-Zellen zu verstärken (engl.: Cluster of Differentiation = CD) [62]. Dabei kann zwischen koinhibitorischen (zum Beispiel = z. B. PD-1, PD-L1, BTLA, CTLA4) und kostimulatorischen (z. B. CD28, CD40, CD27) Signalen unterschieden werden [63]. Wird die Hemmung durch Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) medikamentös unterbunden, kann das aktivierte körpereigene Immunsystem die

Tumorzellen erkennen und selbst bekämpfen. Dies ist die wissenschaftliche Grundlage für den klinischen Einsatz von ICI in der Onkologie.

Zu den ICI zählen Inhibitoren des Programmed Cell Death-1 (PD-1) Rezeptors sowie seines Liganden (engl.: Programmed Cell Death Receptor Ligand-1 = PD-L1) oder auch Inhibitoren des zytotoxischen T-Lymphozyten assoziierten Proteins 4 (engl.: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 = CTLA4). Eine Übersicht über die systemischen Immuntherapeutika kann Tab. 4 untenstehend entnommen werden.

Um Patienten in Subgruppen für bestimmte Therapieregime in der Erstlinie einzuteilen, soll neben patientenindividuellen Faktoren und Komorbiditäten laut der 2020 erschienenen deutschen S3 Leitlinie das Modell des International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium (IMDC) verwendet werden [2]. Das Modell des IMDC bietet prognostische Informationen für Patienten mit mRCC. In einer Studie wurde das Modell extern validiert, indem es mit anderen Prognosemodellen verglichen wurde. Die Risikofaktoren, die das Datenbankkonsortium einbezog (Anämie, Thrombozytose, Neutrophilie, Hyperkalziämie, Karnofsky-Performance-Status < 80 % und Intervall von Erstdiagnose bis zur Systemtherapie im Rezidiv unter einem Jahr) gelten als unabhängige Prädiktoren für ein schlechtes OS. Die Patienten wurden anhand der genannten Faktoren in drei Risikokategorien eingeteilt. Patienten mit günstigem Risikoprofil (keine Risikofaktoren), intermediärem Risikoprofil (ein bis zwei Risikofaktoren) und schlechtem Risikoprofil (drei oder mehr Risikofaktoren). Die Risikogruppen korrelieren mit dem medianen OS (43,2 Monate bei günstigem, 22,5 Monate bei intermediärem und 7,8 Monate bei ungünstigem Risikoprofil), welches als primärer Endpunkt der Untersuchung galt [64].

Bei Patienten mit tumorassoziierten Symptomen bzw. ungünstigem Risikoprofil soll die Systemtherapie schnellstmöglich begonnen werden, da von einem schnellen Voranschreiten der Krankheit ausgegangen wird. Bei besserer Ausgangssituation kann für die Einleitung einer systemischen Therapie ein Tumorprogress abgewartet werden, da die Wachstumsraten des RCC stark variieren und es in seltenen Fällen sogar zu Spontanremissionen kommt [65].

In klinisch durchgeführten Studien hat sich je nach Konstellation entweder die Kombination eines TKI plus (+) ICI oder ICI + ICI als Erstlinientherapie etabliert. Seit 2019 kann in allen Risikogruppen Pembrolizumab + Axitinib (KEYNOTE-426) in der Erstlinie verabreicht werden. Die Patienten unter dieser Therapie hatten insgesamt ein besseres OS sowie PFS als die Patienten mit einer Sunitinib Monotherapie [66, 67]. Die CLEAR-Studie hat außerdem einen Vorteil für Lenvatinib + Pembrolizumab versus (vs.) Sunitinib bezogen auf PFS, OS und der Ansprechrate (engl.: Objective Response Rate = ORR) demonstriert. Neuere Studiendaten aus randomisierten kontrollierten Phase-III-Studien zur Untersuchung der Immun-Checkpoint-Blockade (PD-1 oder dessen Ligand PD-L1) beim fortgeschrittenen ccRCC wurden 2022 in die S3 Leitlinie aufgenommen. Die CheckMate-9ER-Studie zeigte einen anhaltenden Vorteil in Bezug auf das PFS, das OS und die Lebensqualität für die Kombination aus Cabozantinib + Nivolumab [68]. In der JAVELIN Renal 101-Studie konnte im PFS ebenfalls ein signifikanter Vorteil vs. Sunitinib für Avelumab + Axitinib demonstriert werden, diese Kombination kann alternativ zu den Erstgenannten in der Erstlinie verabreicht werden [67]. In den gegen Sunitinib randomisierten Phase-III-Studien (KEYNOTE-426, CLEAR, CheckMate-9ER, JAVELIN Renal 101) zeigte sich für alle Kombinationen ein signifikanter Vorteil für das PFS als primären Endpunkt gegenüber Sunitinib als Monotherapie. Hinsichtlich des OS und der ORR waren die Kombinationstherapien ebenfalls in vielen Subgruppen überlegen. In der JAVELIN Renal 101-Studie konnte ein Vorteil in Bezug auf das OS jedoch nur in der Subgruppe mit schlechtem Risiko und nicht in der Gesamtpopulation gezeigt werden, weswegen die Empfehlung in der S3 Leitlinie etwas abgeschwächt ist [2].

Für Patienten mit intermediärem oder gar schlechtem Risikoprofil ist neben erstgenannter Kombination auch Ipilimumab + Nivolumab empfohlen (CheckMate 214). Bereits in der Zwischenanalyse wurde ein Vorteil hinsichtlich OS sowie ORR gezeigt. Ein 5-Jahres Update der CheckMate 214 bestätigt den langfristigen OS-Vorteil von Ipilimumab + Nivolumab bei mittlerem und hohem Risiko nach IMDC. So lag das mediane OS in der Intention-to-treat-Population bei 55,7 vs. 38,4 Monaten mit Sunitinib. Nach 60 Monaten waren noch 58 % der

Patienten unter Ipilimumab + Nivolumab am Leben verglichen zu 37 % unter Sunitinib ($p < 0,0001$) [69, 70]. Die Komplettremission lag unter dieser Therapie bei 9,4 %, für Sunitinib bei 1 %. Hiermit wird deutlich, welche Chancen die Therapiekonzepte der Immunonkologie (IO) für Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorleiden bieten [71].

Neben des Therapieziels der Komplettremission gibt es Konstellationen, in denen die Symptomkontrolle im Vordergrund steht. Hierfür wird v. a. die ORR betrachtet. Alle Therapiekombinationen, bis auf Ipilimumab + Nivolumab, wiesen im Vergleich zu Sunitinib höhere ORR sowie gleichzeitig niedrigere Progressionsraten auf. Für Ipilimumab + Nivolumab war die ORR vs. Sunitinib mit 42 % vs. 27 % ebenfalls erhöht, die Progressionsrate war mit 20 % vs. 17 % für Ipilimumab + Nivolumab jedoch geringfügig höher als für Sunitinib [2, 66, 67, 71].

Beachtet werden soll in jedem Fall auch die Toxizität der angewendeten Therapeutika [2]. Bei den TKI zählen zu den häufigsten Nebenwirkungen Müdigkeit, Mukositis, Diarrhoe, Emesis, Hautausschlag, Anämie und Bluthochdruck [72]. Da es sich bei den ICI um Medikamente handelt, die das Immunsystem aktivieren, kann es hier v. a. zu überschießenden Immunreaktionen kommen. Das Nebenwirkungsspektrum erstreckt sich über eine Vielzahl möglicher autoimmun vermittelter Prozesse. Alle unerwünschten Wirkungen bedürfen ihrerseits einer Begleittherapie, welche bei ausgeprägten Nebenwirkungen die höher dosierte Glukokortikoidgabe beinhaltet, um unnötige Dosisreduzierungen oder Therapiepausen zu vermeiden, wodurch die Wirksamkeit abgeschwächt werden könnte [2, 66, 71, 72].

Nach Versagen der Erstlinientherapie soll nach Möglichkeit die Substanzklasse gewechselt werden. Nach Ipilimumab + Nivolumab kann ein TKI gegeben werden. Nach VEGF/R-basierter Therapie soll Nivolumab oder Cabozantinib verwendet werden. Im Vergleich zu Everolimus weisen diese Therapien einen Überlebensvorteil (OS) auf [73, 74]. Nach Behandlung mit einem ICI oder einem mTOR-Inhibitor gibt es weniger Daten. Nach Therapieversagen kann hier mit einer TKI-Behandlung (nach ICI + ICI oder ICI + TKI) bzw. einem TKI oder Nivolumab (nach mTOR-Inhibitor) begonnen werden.

Ein Therapiewechsel soll aber erst bei gesichertem Progress bzw. fehlender lokaler Therapieoption oder unkontrollierbaren Nebenwirkungen erfolgen.

Generell sieht die S3 Leitlinie alle sechs bis zwölf Wochen eine bildgebende Verlaufskontrolle (CT/MRT) unter laufender Systemtherapie vor [2]. Röntgenologisch kann es in der Anfangsphase der ICI-Behandlung zu einer Größenzunahme („Pseudoprogess“) kommen, bevor ein Tumorrückgang folgt [75]. Die Auswertung des Ansprechens auf eine Immuntherapie erfolgt anhand der RECIST-Kriterien. Bei gutem Allgemeinzustand sowie guter Verträglichkeit der Therapie kann eine moderate Größenzunahme des Tumors unter ICI zunächst beobachtet und im Verlauf kontrolliert werden [2, 76]. Weitere Studien mit langfristiger Nachbeobachtung sind erforderlich, um das Ansprechen nach der Behandlung über die Progression hinaus richtig zu erkennen und vorherzusagen. Aufgrund des zunehmenden klinischen Einsatzes von ICI sollten Radiologen, Urologen und Onkologen mit den üblichen bildgebenden Befunden unter dieser Therapie vertraut sein [77].

Durch die Kombination von TKI + ICI bzw. ICI + ICI zeigen sich heute Komplettremissionsraten von bis zu 16 % unter bspw. Lenvatinib + Pembrolizumab in der Phase-III CLEAR-Studie [78]. Therapiepausen stellen bei stabiler Erkrankungssituation (engl.: stable disease) oder auf Patientenwunsch eine Alternative dar, um durch eine Verringerung der unerwünschten Nebenwirkungen die Lebensqualität der Patienten zu verbessern. Retrospektive Analysen haben bei initial guter Wirksamkeit auf die zielgerichtete Therapie mit VEGF/R-Inhibitoren und nach Erreichen einer stable disease bei Reexposition ebenfalls gute Ansprechraten (86,9 %) gezeigt. In dieser Analyse erlitten 66,7 % ein Rezidiv, wobei der mediane Zeitraum der Unterbrechung bei sieben Monaten lag [79]. Eine Therapiepause kann demnach unter den genannten Voraussetzungen in Betracht gezogen werden, die Patienten müssen jedoch engmaschig nachbeobachtet werden. Für die Therapie mit ICI liegen noch keine entsprechenden Daten zur Therapiepause vor [2].

Für die sarkomatoide Differenzierung des RCC, welche als besonders aggressiv gilt, hat eine Untergruppenanalyse der klinischen IMmotion151-Studie vor

kurzem einen Überlebensvorteil (PFS) bei Gabe von Atezolizumab + Bavacizumab im Vergleich zu Sunitinib gezeigt. Mehr Patienten, die Atezolizumab + Bevacizumab erhielten, berichteten außerdem über eine stärkere Symptomverbesserung als bei Sunitinib [80]. Für sarkomatoide RCCs hat sich in der CheckMate 214-Studie außerdem ein Vorteil in ORR und OS für Ipilimumab + Nivolumab im Vergleich zu Sunitinib gezeigt [81].

Eine neoadjuvante Therapie wird aktuell nicht standardmäßig durchgeführt. Allerdings laufen derzeit klinische Studien, die eine neoadjuvante Therapie mit einem TKI + ICI bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen oder oligometastasierten RCCs einschließen [82]. Adjuvante Therapien mit Targettherapeutika oder Vakzin-basierte Therapien haben bisher in Studien keinen relevanten Vorteil in Bezug auf das Auftreten eines Tumorrezidivs gezeigt [2, 83]. Die Keynote 564-Studie konnte jetzt erstmals positive Daten in Bezug auf das Disease Free Survival für eine adjuvante Therapie mit Pembrolizumab beim high risk RCC herausarbeiten [84].

Table 4: Übersicht systemischer Therapeutika.

Substanzklasse	Substanzen in alphabetischer Reihenfolge
Tyrosinkinaseinhibitoren oder gegen VEGF gerichtete monoklonale AK (VEGF/R-Inhibitoren)	Axitinib, Bevacizumab, Cabozantinib, Lenvatinib, Pazopanib, Sorafenib, Sunitinib, Tivozanib
mTOR-Inhibitoren	Everolimus, Temsirolimus
Immun-Checkpoint-Inhibitoren	Avelumab (PD-L1), Ipilimumab (CTLA4), Nivolumab (PD-1), Pembrolizumab (PD-1)

1.1.6 Prognose

Die Prognose des RCC ist abhängig von mehreren Variablen. Beeinflusst wird sie u. a. von anatomischen, histologischen, klinischen und molekularen Faktoren [3, 85]. Zu den anatomischen Kriterien gehören die Tumorgöße, Lage und Parameter wie Fettinvasion und eine Beteiligung der Hilusvenen, was zusammengefasst im TNM-Klassifikationssystem enthalten ist [3]. Eine Fettinvasion sowie eine Beteiligung der hilären Venen deuten auf ein lokal fortgeschrittenes Stadium (pT3a) hin, was ebenfalls mit einem schlechteren CSS assoziiert ist [86]. Zu den histologischen Faktoren gehören bspw. Tumorgading, Subtyp des RCC, lymphatische Invasion und Tumornekrose [3].

Histologisch betrachtet scheinen Patienten mit chrRCC die beste Prognose aufzuweisen vs. papillär vs. klarzellig [87, 88]. Patienten mit klarzelliger Differenzierung haben im lokalisierten Stadium eine schlechtere Prognose als diejenigen mit papillärer Differenzierung. Im metastasierten Stadium trifft dies laut Metaanalysen nicht zu. Eine rhabdoide Differenzierung und der Prozentsatz der sarkomatoiden Komponente scheinen ebenfalls prognostisch bedeutsam zu sein, wobei ein größerer Anteil der Beteiligung mit einem schlechteren Überleben verbunden ist [3, 89]. Die alleinige histologische Einteilung zur Prognoseabschätzung hat sich aufgrund des variablen Krankheitsverlaufes beim RCC als nicht ausreichend erwiesen [90]. Zu den klinischen Faktoren gehören körperlicher Leistungsstatus, lokale Symptome, Kachexie, Anämie, Thrombozytenzahl, Neutrophilenzahl, Lymphozytenzahl, C-reaktives Protein, Albumin und verschiedene von diesen Faktoren abgeleitete Indizes [3]. Adipositas gilt als ein ätiologischer Faktor (siehe oben = s. o.), kann jedoch auch prognostische Informationen liefern. Ein hoher Body-Mass-Index scheint sowohl beim nicht-metastasierten als auch beim mRCC mit einem besseren Überleben verbunden zu sein [91-93]. Mit einem verbessertem OS scheint die Einnahme von Statinen oder Sartanen assoziiert zu sein [94]. Aktives Rauchen hat nicht nur einen Einfluss auf die Pathogenese des RCC (s. o.), sondern geht bei mRCC-Patienten, die mit Targettherapien behandelt werden, auch mit einem verminderten Überleben einher. Patienten, die mit dem Rauchen aufhörten, hatten jedoch wieder ein ähnliches Risiko, an einem RCC zu sterben, wie Patienten, die nie geraucht haben. Daher sollte Raucherentwöhnung bei mRCC-Patienten, die mit zielgerichteten Wirkstoffen behandelt werden, in die Beratung mit einfließen [95].

Zahlreiche molekulare Marker wurden bereits hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft untersucht. Die Ergebnisse sind bislang jedoch wenig validiert. Ihr routinemäßiger Einsatz in der klinischen Praxis wird daher nicht empfohlen [3]. Bei allen RCC-Typen verschlechtert sich die Prognose mit dem Stadium [96]. Entscheidend für die Prognose scheint das Vorhandensein einer Fernmetastasierung zu sein. Leider entwickeln bis zu 30 % der Patienten nach

Nephrektomie im Verlauf eine Metastasierung, obwohl zum OP-Zeitpunkt bildgebend keinerlei Hinweis darauf bestand [97]. Dank des immensen Fortschritts in der Therapie des RCC, die die Entwicklung der zielgerichteten Medikamente in den letzten 15 Jahren mit sich gebracht hat, hat sich die mediane Überlebenszeit von ca. 13 Monaten [98, 99] auf aktuell ca. 39 Monate verlängert [67, 100-102]. Weitere epidemiologische Daten zum RCC lassen sich auch Kapitel 1.1.1 entnehmen. Obwohl sich die Überlebenschancen für Patienten mit einem fortgeschrittenen RCC mit der Entwicklung neuer Therapien drastisch verbessert haben, versterben noch viele Patienten RCC-bedingt.

In vielen Fällen kommt es zu Resistenzbildungen gegen die verwendeten Medikamente und folglich zu einem erneuten Fortschreiten der Erkrankung. Welcher Patient eher von einer dualen Immuntherapie (ICI + ICI) oder von der Kombination aus TKI + ICI profitiert, lässt sich bislang nicht voraussagen. Es besteht ein hoher Bedarf Prognose- und Risikoscores in ihrer Vorhersagegenauigkeit zu verbessern. Genexpressionsanalysen und die Entdeckung neuer Biomarker für das Ansprechen (prädiktiver Biomarker) zur weiteren Optimierung der Therapiewahl und der Patientenergebnisse bleiben wesentliche aktuelle medizinische Ziele.

1.2 Potenzielle Biomarker für das Nierenzellkarzinom

Obwohl in den letzten zehn Jahren eine Fülle neuer zielgerichteter Therapien für das RCC entwickelt wurden, gibt es derzeit keinen prädiktiven molekularen Biomarker, der in der klinischen Routine als Begleitdiagnostikum für eine personalisierte Therapie eingesetzt wird [103]. Zwar identifizierten einige Studien potenzielle Biomarker mit einem prognostischen Wert, die untersuchten Marker konnten sich aber aufgrund bislang zu geringer Vorhersagekraft klinisch nicht durchsetzen. Beispielhaft war ein erhöhter phosphorylierter-mTOR-Status mit einer schlechteren Prognose [104], ein erniedrigtes Serumalbumin bei Patienten nach TKI-Behandlung mit einem schlechteren PFS assoziiert [105]. Die IMDC-Klassifizierung ist nach wie vor das einzige weitgehend validierte Instrument für die Wahl der Primärtherapie.

Im Folgenden werden einige potenzielle Biomarker mit ihrer physiologischen Funktion dargestellt sowie der aktuelle Stand der Forschung beschrieben.

1.2.1 Programmed Cell Death Rezeptor 1 (PD-1) und sein Ligand (PD-L1)

Der PD-1-Rezeptor, auch bekannt als CD279, ist einer der wichtigsten koinhibitorischen Rezeptoren, die bei der T-Zell-Aktivierung auf deren Oberfläche exprimiert werden. Kommt es nach wiederholter Stimulierung der T-Zellen zu einem Verlust der schützenden Effektorfunktion der aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, so spricht man von einer Erschöpfung der T-Zellen. Diese exprimieren auf ihrer Oberfläche dann u. a. PD-1 [106]. PD-1 wird nach Bindung an seine Liganden, hauptsächlich PD-L1, aktiviert und rekrutiert die Src homology domain 2 enthaltende Protein-Tyrosin-Phosphatase (SHP) in der Nähe des T-Zell-Rezeptors (engl.: T-cell Receptor = TCR) und des CD28-Signalwegs. Dieser Vorgang führt zur Dephosphorylierung und Abschwächung von Schlüsselmolekülen im TCR- und CD28-Signalweg, was zu einer Hemmung der T-Zell-Proliferation, -Aktivierung, Zytokinproduktion, verändertem Stoffwechsel und Killerfunktionen der zytotoxischen T-Lymphozyten (engl.: Cytotoxic T-Lymphocyte = CTL) und schließlich zum Untergang der aktivierten T-Zellen führt [107].

Sein Ligand PD-L1 wird auch B7-H1 genannt. PD-L1 ist ein Glykoprotein der B7-Familie, das von RCC-Zellen überexprimiert wird und mit einer Beeinträchtigung der T-Zellfunktion in Beziehung steht, was zu einer gestörten antitumoralen Immunität des Wirts führt [108]. Die Expression von PD-L1 bei Krebs wird außerdem mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) in Verbindung gebracht, welche die PD-L1-Expression durch die Freisetzung von IFN- γ vermitteln [109]. Tumorzellen nutzen die Überexpression von PD-L1, um sich der Immunüberwachung des Organismus zu entziehen. Die abnorm hohe Expression von PD-L1 in der Tumormikroumgebung (engl.: Tumor Micro Environment = TME) kann primär auf die Aktivierung mehrerer onkogener Signalwege und sekundär auf die Induktion durch Entzündungsfaktoren wie IFN- γ zurückzuführen sein. Klinisch gesehen reaktivieren Antikörper, die auf PD-1/PD-L1 abzielen, die erschöpften T-Zellen im TME. Die PD-L1-Expression, die Infiltration mit CTLs und die Tumormutationslast (engl.: Tumor Mutation

Burden = TMB) werden allgemein als die wichtigsten Faktoren angesehen, die die Wirksamkeit der PD-1/PD-L1-Blockade beeinflussen [107].

Bislang ist die tumorale PD-L1-Expression der am meisten untersuchte prädiktive Biomarker in Bezug auf eine IO-Therapie. Allerdings sind die Ergebnisse bisweilen sehr uneinheitlich und reichen von signifikant positiven Korrelationen der PD-L1-Expression mit dem Ansprechen auf eine Systemtherapie und verbessertem Patientenoutcome bis zu einer fehlenden Korrelation [67, 71, 73, 110-112]. Einige Arbeiten haben gezeigt, dass die Überexpression von PD-L1 mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem höheren Fuhrman-Grading, dem Vorhandensein einer Nekrose, einer sarkomatoiden Differenzierung und einer schlechteren Überlebensrate korreliert ist, was durchaus auf eine prognostische Funktion der PD-L1-Expression hindeutet [113-116]. Die negative prognostische Wirkung der PD-L1-Expression wurde zunächst auf ihre immunsuppressive Wirkung zurückgeführt. Es gab zudem Hinweise darauf, dass die Kostimulation von T-Zellen einen Einfluss auf die Prognose von RCC-Patienten haben könnte [108]. Da die Daten zu einer möglichen Rolle der PD-L1-Testung als prädiktivem Biomarker für das Therapieansprechen auf eine ICI bislang so widersprüchlich ausfallen, fließen sie nicht in die Entscheidungsfindung ein [2]. Eine Erklärung für den begrenzten prädiktiven Wert der tumoralen PD-L1-Expression ist, dass die PD-L1-Expression sowohl intratumoral im Primarius als auch zwischen Primärtumor und Metastasen sehr heterogen ist [114, 117-119]. Außerdem wurde für andere Tumorentitäten berichtet, dass die PD-L1-Expression dynamisch ist und durch Behandlungen stark beeinflusst wird [108, 120, 121]. In einer prospektiven Studie wurde bei Patienten mit einem mRCC, die mit Nivolumab behandelt wurden konträr zwar eine Veränderung von verschiedenen Chemokinen jedoch keine Veränderung für PD-L1 beobachtet [122]. Darüber hinaus ist die Bewertung der PD-L1-Expression in hohem Maße vom verwendeten Antikörper abhängig [108].

Eine Metaanalyse hat PD-L1 als prognostischen Faktor untersucht. PD-L1 wurde mit 24,2 % in klarzelligen Tumoren im Vergleich zu 10,9 % in nicht klarzelligen Tumoren häufiger exprimiert. In der Gesamtpopulation sowie in der Subgruppe des ccRCC erhöhte eine höhere PD-L1-Expression zudem das Sterberisiko.

Diese Metaanalyse deutet darauf hin, dass eine höhere PD-L1-Expression ein negativer prognostischer Faktor beim RCC ist [123].

Die Daten der CheckMate 025-Studie bestätigten, dass Patienten mit einer hohen PD-L1-Expression ein kürzeres Überleben hatten, unabhängig davon, welche Behandlung sie erhalten haben (Nivolumab oder Everolimus) [73, 108]. In der CheckMate 214-Studie hatte die PD-L1-Expression einen negativen prognostischen Einfluss auf das Überleben von Patienten, die mit Sunitinib behandelt wurden, nicht aber für Patienten, die mit der Kombinationstherapie behandelt wurden. Nivolumab + Ipilimumab als Erstlinientherapie erhöhte das OS und die ORR im Vergleich zu Sunitinib bei Patienten mit mittlerem und hohem Risiko über alle PD-L1-Expressionsniveaus hinweg, mit dem größten Nutzen für Patienten mit PD-L1⁺ Tumoren gegenüber PD-L1⁻ (negativ) Tumoren [71].

Die Analyse der Biomarker aus der JAVELIN Renal 101-Studie ergab, dass das PFS in der Sunitinib-Gruppe bei Patienten mit PD-L1⁺ Tumoren signifikant kürzer war als bei Patienten mit PD-L1⁻ Tumoren [124]. In Ergänzung dazu wurde in der Axitinib + Avelumab-Gruppe je nach PD-L1-Expression im Update ein signifikanter Unterschied im PFS festgestellt. Bei den Patienten in der PD-L1⁺ Population war das PFS in der Kombinationsgruppe signifikant länger als in der Sunitinib-Gruppe. Die Ergebnisse in der Gesamtpopulation stimmten mit denen der PD-L1⁺ Population überein und zeigten eine signifikante Verlängerung des PFS in der Kombinationsgruppe gegenüber der Sunitinib-Gruppe, aber noch keinen Vorteil in Bezug auf OS [125].

Drei Phase-III-Studien, darunter die KEYNOTE-426-, die CLEAR- und die CheckMate-9ER-Studie, mit antivaskulärem TKI (Sunitinib) + Anti-PD-1-Inhibitoren zeigten einen Vorteil in Bezug auf PFS und OS im Vergleich zu Sunitinib in der Erstlinientherapie [68, 101, 102].

Zwischenanalysen der IMmotion151-Studie berichteten über ein verbessertes PFS bei Patienten mit PD-L1⁺ mRCC, die Atezolizumab + Bevacizumab gegenüber der Patienten, die Sunitinib erhielten [126]. Der PD-L1-Status auf Immunzellen wurde immunhistochemisch untersucht. Obwohl die Kombination aus Atezolizumab + Bevacizumab einen PFS-Vorteil gegenüber Sunitinib zeigte, konnte die endgültige Analyse der IMmotion151-Studie keine Verbesserung des

OS für Patienten mit mRCC in der PD-L1⁺ Population nachweisen. Derzeit fehlt den Autoren eine eindeutige Erklärung für den fehlenden OS-Vorteil der verabreichten Kombinationstherapie. Mutmaßlich könnten laut den Autoren Unterschiede im Targeting-Molekül sowie Unterschiede im Studiendesign, in der Population, in der Durchführung und im Zugang zu nachfolgenden Therapien der Grund für den fehlenden Überlebensvorteil von Atezolizumab + Bevacizumab sein [127].

1.2.2 B- und T-Lymphozyten-Attenuator (BTLA)

Der B- und T-Lymphozyten-Attenuator (BTLA oder CD272) ist ein Immun-Checkpoint, der an der Unterdrückung von Immunreaktionen beteiligt ist [128]. Es handelt sich um ein transmembranöses Protein, welches u. a. auf erschöpften T-Zellen exprimiert wird. Diese sammeln sich im Tumor an und sind allerdings weniger in der Lage, Zytokine zu produzieren und Tumorzellen abzutöten [129, 130]. Daher trägt die Erschöpfung der T-Zellen wahrscheinlich zum fortschreitenden Tumorwachstum bei, auch wenn CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen vorhanden sind [106, 131].

BTLA als Immunglobulin-Domäne-enthaltendes Glykoprotein kann auf weiteren Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen (NK) nachgewiesen werden [62, 128, 132]. Während naive T-Zellen kein BTLA exprimieren, wird es während der Aktivierung induziert und bleibt auf T-Helferzellen vom Typ 1 (T(H)1), nicht aber auf T(H)2-Zellen exprimiert. Die Vernetzung von BTLA mit Antigenrezeptoren induziert seine Tyrosinphosphorylierung und Assoziation mit SHP-1 und SHP-2 und dämpft die Produktion von IL-2. BTLA-defiziente T-Zellen weisen eine erhöhte Proliferation auf. B7x, ein peripheres Homolog von B7, ist ein Ligand von BTLA. Somit ist BTLA ein inhibitorischer Rezeptor auf T-Lymphozyten mit Ähnlichkeiten zu PD-1 (s. o.) und CTLA4 (siehe unten = s. u.) [133]. Darüber hinaus kann BTLA die Funktion von B-Zellen abschwächen [128].

In einer Studie wurden Blutproben von Patienten mit einem RCC hinsichtlich der Zusammensetzung der Leukozyten vor Nephrektomie untersucht. Vor der Nephrektomie waren ccRCCs im Vergleich zu gesunden Kontrollen mit einer

systemischen Anhäufung sowohl von erschöpften CD8⁺ T-Zellen, wie durch die BTLA-Expression an der Oberfläche angezeigt, als auch von bestimmten monozytären myeloid-derived suppressor cells (MDSC) verbunden. Dieser Anstieg der BTLA⁺/CD8⁺ T-Zellen war besonders ausgeprägt bei Patienten mit Tumoren der Kategorie T3, was auf eine anhaltende, aber unwirksame endogene Immunantwort auf das Nierentumorwachstum hindeutet. Für den prozentualen Anteil von BTLA⁺ oder PD-1⁺/CD4⁺ T-Zellen ergab sich kein Unterschied, obwohl die Häufigkeit von BTLA⁺/CD4⁺ Zellen tendenziell leicht anstieg. Interessanterweise befanden sich bei Patienten mit ccRCCs signifikant weniger PD-1⁺/CD8⁺ T-Zellen im Blutkreislauf als bei gesunden Kontrollpersonen. In der Patientenkohorte der genannten Studie waren lokalisierte ccRCCs mit einem signifikanten Anstieg der zirkulierenden Mengen an erschöpften BTLA⁺/CD8⁺ T-Zellen, aber einem Rückgang der erschöpften T-Zellen, die PD-1 exprimieren, verbunden. Zu einem frühen Zeitpunkt nach der Nephrektomie (~ 30 Tage) war die systemische Immunantwort weitgehend unverändert. Die einzige signifikante Veränderung war ein Rückgang des mittleren Prozentsatzes der zirkulierenden BTLA⁺/CD8⁺ T-Zellen. Die Anzahl der BTLA⁺/CD4⁺, PD-1⁺/CD4⁺ oder PD-1⁺/CD8⁺ T-Zellen veränderte sich nicht signifikant. Die Studie kam zu der Schlussfolgerung, dass die Nephrektomie im ersten Monat nach der OP die systemische Erschöpfung und Dysfunktion der CD8⁺ T-Zellen, die durch die BTLA-Expression gekennzeichnet ist, verringern kann. Eine anhaltende Entzündungsreaktion und das Vorhandensein von MDSCs wirken diesem positiven Effekt wahrscheinlich entgegen. Systemisch konnten im Falle des fortgeschrittenen ccRCC zudem erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer, protumogener Zytokine und Chemokine nachgewiesen werden, die auch nach Nephrektomie weitestgehend bestehen blieben. Die entzündliche und protumogene Umgebung bleibt also auch bei klinischer Tumorfreiheit bestehen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die systemische Immunantwort bei Patienten mit ccRCC im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen verändert ist. Die zirkulierende Menge an BTLA⁺/CD8⁺ T-Zellen könnte ein wichtiger Biomarker für die Tumorlast bei Patienten mit lokalisiertem ccRCC sein. Zu OS oder PFS gibt es bisher keine Langzeitergebnisse [106].

1.2.3 T-Zell Immunglobulin- und Muzindomänen-haltiges Protein-3 (hTIM3)

Das humane T-Zell Immunglobulin- und Muzindomänen-haltige Protein-3 (engl.: human T-Cell Immunoglobulin and Mucin Containing Protein-3 = hTIM3; auch bekannt als CD366) ist ein immunmodulierendes Transmembranglykoprotein. Diese Proteine regulieren zusammen mit TCR- und kostimulatorischen Signalen die Expansion und die Effektorfunktionen von T-Helferzellen [134]. Das hTIM3-Protein wird spezifisch auf T(H)1-Zellen exprimiert und moduliert deren Reaktionen hemmend [135]. Es ist außerdem bekannt, dass die inhibitorischen Rezeptoren PD-1 und hTIM3 die gegen das gut charakterisierte Tumorantigen NY-ESO-1 gerichteten CD8⁺ T-Zellantworten negativ regulieren [129].

Die glykosylierte Immunglobulin-domäne von hTIM3 bindet das zellassoziierte Galectin-9 [136]. Dies induziert die Phosphorylierung von hTIM3 und führt zur Apoptose von T(H)1-Zellen [137, 138]. Bei chronischen Entzündungen, Autoimmunkrankheiten und einigen Krebsarten wird hTIM3 auf mehreren hämatopoetischen Zelltypen hochreguliert [139, 140]. Seine Blockade führt zu einer erhöhten IFN- γ -Produktion, T(H)1-Zellproliferation und Zytotoxizität [139, 141-143], zur Entwicklung regulatorischer T-Zellen [141] und zu einem Anstieg der Makrophagen- und Neutrophileninfiltration in Entzündungsherde [144]. Darüber hinaus kann die gleichzeitige Blockade von hTIM3 und PD-1 in präklinischen Modellen zu einer Rückbildung des Tumors führen und die Reaktion der T-Zellen auf Krebs bei Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen fördern [145].

In einer Analyse von kryokonservierten Nierentumorproben wurde unter Verwendung einer multispektralen Fluoreszenzbildgebungstechnologie in Verbindung mit einer Bildanalysesoftware festgestellt, dass die Koexpression von PD-1 und hTIM3 auf tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen mit einer schlechten Prognose beim RCC korreliert ist [146].

Eine präklinische Studie an Mäusen berichtet, dass das tumorassoziierte VEGF die Expression von PD-1 und anderen hemmenden Kontrollpunkten, die an der Erschöpfung der CD8⁺ T-Zellen beteiligt sind, wie CTLA4 (s. u.), hTIM3 und LAG3 (s. u.), verstärkte und dass die gezielte Inhibition von VEGF die Expression der hemmenden Kontrollpunkte umkehrte [147].

Eine neuere Studie konnte demonstrieren, dass Patienten mit hTIM3⁺ Tumor ein signifikant längeres OS und PFS als solche mit hTIM3⁻ Tumor bei besserer Ansprechrate auf die verabreichte Immuntherapie (Anti-PD-1) aufwiesen. Immunhistochemische Untersuchungen an Proben, die nach der Anti-PD-1-Therapie gewonnen wurden, zeigten eine Infiltration von CD163-Makrophagen und die Freisetzung von HMGB1, einem Liganden von hTIM3, im nekrotischen Tumorbereich. Um zu erfassen, ob die hTIM3-Expression auf Tumorzellen vor einer systemischen Therapie die Wirksamkeit der Anti-PD-1-Therapie beim RCC im klinischen Umfeld vorhersagen lässt, sind weitere Studien nötig [148].

1.2.4 Zytotoxisches T-Lymphozyten-Assoziiertes Protein 4 (CTLA4)

Das zytotoxische T-Lymphozyten-Assoziierte Protein 4, auch CD152 genannt, ist ein weiteres Protein, das eine Rolle in der Regulierung der Immunantwort bei der Tumorgenese spielt. Es wird vorübergehend auf aktivierten T-Zellen und in hohem Maß auf regulatorischen T-Zellen exprimiert. CTLA4 wird außerdem auf der Oberfläche von T-Helferzellen exprimiert und sendet ein hemmendes Signal an T-Zellen [149].

In ruhenden T-Zellen ist CTLA4 ein intrazelluläres Protein; nach der Bindung an einen TCR und einem kostimulatorischen Signal durch CD28 wandert CTLA4 jedoch an die Zelloberfläche. CTLA4 ähnelt CD28 in Aminosäuresequenz, Struktur und genomischer Organisation. Während CD28 bei der T-Zell-Aktivierung ein kostimulatorisches Signal liefert (s. o.), reguliert CTLA4 die zellvermittelten Immunantworten negativ durch Interaktion mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), die auf antigenpräsentierenden Zellen vorhanden sind. Durch die Bindung an CD80 und CD86 wird CD28 verdrängt, wodurch hemmende Signale an die T-Zelle vermittelt werden, was zu einer Unterbrechung sowohl der Proliferation als auch der Aktivierung führt [149].

Eine Studie mit unselektierten RCCs hat ergeben, dass die CTLA4-Expression in der gesamten Kohorte sowie in einer Subgruppe mit ausschließlich ccRCCs signifikant mit einem schlechteren OS und CSS verbunden ist. Die CTLA4-Expression ist ein prognostischer Marker, der in der gesamten Kohorte

unabhängig mit einem schlechteren Ergebnis verbunden war. Patienten mit kombinierter CTLA4- und PD-1-Expression hatten in dieser Studie das höchste Risiko für ein schlechtes OS und CSS. Die Studie lieferte einen Hinweis darauf, dass mit dem Ergebnis Hochrisikopatienten identifiziert werden könnten [150]. Ebenso hat eine weitere Arbeit gezeigt, dass CTLA4 mit einer schlechteren Prognose beim ccRCC assoziiert ist [151].

1.2.5 Lymphozytenaktivierungsgen 3 (LAG3)

Das Lymphozytenaktivierungsgen 3 (engl.: Lymphocyte Activation Gene 3 = LAG3; auch bekannt als CD223) gehört ebenfalls zu den inhibitorischen Immunmodulatoren. Es handelt sich um ein Transmembranprotein, das u. a. auf T-Zellen nachgewiesen werden kann. Die Hochregulierung von LAG3 verhindert die übermäßige Aktivierung und das Auftreten von Autoimmunität. Eine andauernde Antigenexposition im TME führt zu einer anhaltenden LAG3-Expression, die zu einem Erschöpfungszustand beiträgt, der sich in einer beeinträchtigten Proliferation und Zytokinproduktion äußert [152]. Strukturell ähnelt es CD4 und kann daher ebenfalls Major histocompatibility complex Klasse II binden. Die genauen Signalmechanismen, die LAG3 nachgeschaltet sind, und das Zusammenspiel mit anderen Immun-Checkpoints sind jedoch noch weitgehend unbekannt [153]. Es wird vermutet, dass die intrazelluläre zytoplasmatische Domäne von LAG3 hemmende Signale sendet, wodurch es sich von anderen inhibitorischen Rezeptoren unterscheidet [154].

In einigen Tumorentitäten konnte die Koexpression von PD-1 und LAG3 sowie ein synergistischer Effekt zwischen deren Blockade festgestellt werden [155, 156].

Diese Ergebnisse legen die potenzielle Bedeutung der dualen LAG3/PD-1-Targettherapie in der klinischen Anwendung nahe. Für das mRCC ist aktuell kein Medikament zugelassen, das LAG3 inhibiert, bei laufenden klinischen Studien. Derzeit befinden sich vier auf LAG3 abzielende Therapien in der klinischen Erprobung und viele weitere in der präklinischen Entwicklung [152].

In einer Arbeit wurden ccRCCs zunächst auf Einzel-Zellebene hinsichtlich ihrer Expression von LAG3-, hTIM3- und T-Zell-Immunrezeptoren mit Ig- und ITIM-

Domänen (TIGIT) untersucht. Verwendet wurden Primärzellen. Auf der Grundlage von normalisierten LAG3-, hTIM3- und TIGIT⁺ Zelldichten in jedem Tumor wurden drei Gruppen mit unterschiedlichen Rezeptorwerten identifiziert. Die phänotypischen Signaturen von hTIM3 (44 %), LAG3 (43 %) und TIGIT (13 %) waren jeweils in unabhängigen Clustern dominant. Obwohl sich das PFS zwischen den drei Clustern nicht unterschied, war der LAG3-Cluster in der Kaplan-Meier-Analyse mit dem schlechtesten OS assoziiert und zeigte signifikante Unterschiede zu Patienten mit günstigen hTIM3-Clustern ($p = 0,047$). Darüber hinaus war in der multivariablen Analyse der LAG3-Cluster ($p = 0,037$) ein unabhängiger Risikofaktor für die Gesamtmortalität nach der OP, zusammen mit dem Patientenalter, dem nukleären Grading und der Tumorgroße [157].

Eine weitere Analyse hat gezeigt, dass das immunmodulatorische Molekül LAG3 mit einer schlechteren Prognose beim ccRCC und papRCC assoziiert ist [151].

Eine kleine klinische Phase-I-Studie, in der 21 Patienten mit einem mRCC eine antikörperbasierte Monotherapie erhielten, führte zu einer signifikanten Induktion von CD28 exprimierenden T-Zellen mit Effektor-Gedächtnis. Obwohl kein objektives Ansprechen berichtet wurde, kam es bei sieben von acht Patienten mit höheren Dosen zu einer stable disease und verbessertem PFS im Vergleich zu nur drei von elf Patienten in der niedrigeren Dosisgruppe. Es wurden keine klinisch signifikanten unerwünschten Ereignisse beobachtet [158]. Diese Daten zur Verträglichkeit und die geringen positiven Signale für die Monotherapie liefern ein Argument dafür, den Wirkstoff mit anderen Therapieoptionen zu kombinieren, um die Anti-Tumor-Aktivität insgesamt zu verbessern [152].

Derzeit läuft eine randomisierte Phase-I/IIa Dosisescalations- und Kohortenerweiterungsstudie zur Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit des monoklonalen Anti-LAG3-Antikörpers (Relatlimab), der allein und in Kombination mit dem monoklonalen Anti-PD-1-Antikörper (Nivolumab) bei fortgeschrittenen soliden Tumoren verabreicht wird, u. a. beim RCC [159].

Ein weiterer monoklonaler Anti-LAG3-Antikörper (LAG525) befindet sich derzeit in der klinischen Entwicklung der Phase I/II, um seine Sicherheit und sein pharmakokinetisches Profil zu bestimmen. In dieser Studie wird der Wirkstoff als Monotherapie oder in Kombination mit einem neuartigen Anti-PD-1-Inhibitor

(PDR001) mitunter Patienten, die an einem RCC erkrankt sind, verabreicht. Im Rahmen dieser Studie werden Biomarker-Analysen, einschließlich der Korrelation der PD-L1-Expression mit dem klinischen Ergebnis durchgeführt [160].

Eine Studie hat TILs und autologe periphere mononukleäre Blutzellen (engl.: Peripheral Blood Mononuclear Cell = PBMC) von Patienten isoliert, die sich wegen eines Primärtumors einer OP unterzogen hatten. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen wiesen eine erhöhte Häufigkeit von PD-1⁺, LAG3⁺ und hTIM3⁺ Zellen auf TILs auf. Die häufigste Rezeptorkombination war PD-1 und LAG3 sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ TILs. Die Blockade von PD-1 führte zu einer signifikanten Hochregulierung von LAG3, aber nicht von hTIM3. Die duale Blockade von PD-1 und LAG3, aber nicht von PD-1 und hTIM3, führte zu einer erhöhten IFN- γ -Freisetzung bei in-vitro-Stimulation. Diese Daten untermauern die Hypothese, dass die duale Blockade von PD-1 und LAG3 eine vielversprechende Kombinationsbehandlung ist [161].

1.3 Somatische Mutationen

Mehrere prognostische und prädiktive Markersignaturen wurden für spezifische systemische Behandlungen des mRCC beschrieben. Kürzlich konnte erstmals in klinischen Phase-II- und Phase-III-Studien ein Zusammenhang zwischen Genexpressionssignaturen im Primärtumor und dem Therapieansprechen und Benefit einer Therapie mit einem TKI, ICI oder der Kombination aus TKI + ICI gezeigt werden. In der JAVELIN Renal 101-Studie zeigte sich eine Beziehung zwischen der immunmodulatorischen Gensignatur aus 26 Genen und dem PFS bei Patienten, die mit Avelumab + Axitinib behandelt wurden, während eine Angiogenese-Gensignatur mit dem PFS für Sunitinib assoziiert war. Mutationsprofile und Histokompatibilitäts-Leukozyten-Antigen-Typen waren ebenfalls mit dem PFS assoziiert, die PD-L1-Expression und die Tumormutationslast in dieser Studie dagegen nicht [162].

Die identifizierte Signatur umfasst Gene aus den Bereichen der TCR-Signale, -Aktivierung, -Proliferation und -Differenzierung, NK-vermittelten Toxizität, Chemokine und anderer Immunantwortgene [124].

In der IMmotion150- und IMmotion151-Studie gelang es die Tumoren in die molekularen Subtypen Angiogenese, Immunität (einschließlich T-Effektor-Präsenz und -Funktion, IFN- γ -Antwort, ICI und Antigenpräsentation) sowie immunsuppressive myeloische Inflammation zu unterteilen [124, 163]. Eine T-Effektor/IFN- γ -hohe oder Angiogenese-arme Genexpressionssignatur sagte ein besseres PFS für Atezolizumab + Bevacizumab im Vergleich zu Sunitinib voraus. Die Genexpressionssignatur "Angiogenese hoch" korrelierte hingegen mit einem längeren PFS sowie einer verbesserten ORR der mit Sunitinib behandelten Patienten [164]. In der Untergruppe „Angiogenese niedrig“ zeigte die Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie mit Sunitinib ein besseres PFS [163]. Die Untergruppe mit hoher Expression der Immunität-Gensignatur (T-Effektor) war in der Analyse positiv mit der Proteinexpression von PD-L1 auf tumorinfiltrierenden Immunzellen und der CD8⁺ T-Zell-Infiltration assoziiert, was auf eine bereits vorhandene adaptive Antitumor-Immunität hinweist. Ein hohes Expressionslevel der Immunität-Gensignatur war mit einer verbesserten ORR und einem verbesserten PFS im Vergleich zu einer niedrigen Expression für die mit der Kombinationstherapie behandelten Patienten verbunden. Im Vergleich zwischen den Behandlungsarmen war eine hohe Immunität-Gensignatur-Expression mit einem verbesserten PFS unter der Kombinationstherapie gegenüber Sunitinib assoziiert [163]. Außerdem war eine hohe myeloische Entzündungssignatur mit einem schlechteren PFS bei Atezolizumab-Monotherapie gegenüber Sunitinib assoziiert, dies galt jedoch nicht zwischen der Kombinationstherapie und Sunitinib. Insgesamt deuten die Daten von IMmotion150 darauf hin, dass die Kombinationstherapie im Vergleich zu Sunitinib den PFS-Vorteil bei Patienten mit bereits vorhandener Antitumor-Immunität verstärken kann [163].

In der CheckMate 214-Studie war eine höhere Angiogenese-Gensignatur mit einer besseren ORR und einem besseren PFS für Sunitinib assoziiert, während ein niedrigerer Angiogenese-Score mit einer höheren ORR bei den mit Nivolumab + Ipilimumab behandelten Patienten verbunden war [3, 165].

Eine die Diagnostik und Therapieauswahl erschwerende Gegebenheit stellt die Heterogenität des RCC dar. Man spricht dabei von intratumoraler, den soliden Tumor selbst betreffend, sowie von intertumoraler, die verschiedenen Tumoren betreffenden, Heterogenität. Die Heterogenität des RCC kann zu einer Unterschätzung der aus einzelnen Tumorbiopsien dargestellten Tumor-Genomlandschaft führen und stellt eine große Herausforderung für die personalisierte Medizin und die Entwicklung von Biomarkern dar. Die intratumorale Heterogenität, die mit heterogenen Proteinfunktionen einhergeht, kann durch darwinistische Selektion eine Tumoranpassung und damit ein therapeutisches Versagen begünstigen [76]. Bis vor einigen Jahren wurde die intratumorale Heterogenität noch nie systematisch mittels Sequenzierung analysiert. *Gerlinger et al.* gelang es an primären RCCs und korrespondierendem Metastasengewebe die phänotypischen Folgen der genetischen Heterogenität bei Patienten darzustellen, die sich einer Everolimus-Therapie unterzogen. Pro Patienten wurden neun Regionen des Primärtumors sowie mehrere Proben aus Metastasengewebe untersucht. In einer einzigen Biopsie des ersten Patienten wurden durchschnittlich 70 somatische Mutationen nachgewiesen, was etwa 55 % aller in diesem Tumor entdeckten Mutationen entsprach. Nur 34 % aller Mutationen, die durch Multiregionssequenzierung in der Nephrektomieprobe entdeckt wurden, waren in allen Regionen vorhanden, was darauf hindeutet, dass eine einzelne Biopsie nicht repräsentativ für die Mutationslandschaft des gesamten Tumors ist. Es mutet an, dass sich die räumlich getrennten Metastasen aus regional heterogener klonaler Evolution bzw. verzweigten Mutationsprofilen entwickeln. Ein Zweig entwickelte sich in der Untersuchung zu den Klonen, die in metastatischen Stellen vorkamen, und der andere diversifizierte sich zu Primärtumorregionen. Die unterschiedlichen somatischen Mutationen und chromosomale Ungleichgewichte führen folglich zu einer phänotypischen Diversität [76].

Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit die Gabe von Everolimus die Mutationslast beeinflusst, indem Proben vor und nach der Gabe verglichen wurden. Eine Vielzahl der Mutationen nach der Behandlung waren bereits vor der Behandlung in dem jeweiligen Gewebe vorhanden, was das Vorhandensein einer

intratumoralen Heterogenität weiter unterstütze und außerdem darauf hindeutet, dass Everolimus selbst nicht ursächlich für die Mutationen zu sein scheint. Dieses Ergebnis konnte für die anderen drei Patienten bestätigt werden. Von allen somatischen Mutationen, die bei der Multiregionssequenzierung gefunden wurden, waren 63-69 % heterogen und somit nicht in jeder sequenzierten Region nachweisbar. Um die entsprechenden Proteinfunktionen der mutierten Gene zu untersuchen, wurden Färbungen durchgeführt, die belegen konnten, dass einige der Mutationen mit einem Funktionsverlust und trotzdem mit einer konvergenten phänotypischen Entwicklung einhergehen, was ein hohes Maß an Mutationsvielfalt während der Tumorprogression wahrscheinlich macht [76]. Die Hinweise auf mehrere genetisch unterschiedliche Subklone in den Primärtumoren oder zwischen dem Primärtumor und seinen Metastasen kann die Schwierigkeiten bei der Validierung onkologischer Biomarker aufgrund von Stichprobenverzerrungen erklären. Außerdem kann sie zur darwinistischen Selektion bereits existierender arzneimittelresistenter Klone beitragen und könnte somit für die oftmals beschriebenen Vorteile der zytoreduktiven Nephrektomie verantwortlich sein, da sie ein evolutionäres Reservoir an phänotypischer Tumorzellvielfalt eliminiert [76]. Ob genetische Analysen in Biopsieproben von mehreren Metastasierungsorten unmittelbar vor Beginn einer systemischen Therapie den Vorhersagewert erhöhen können, ist unbekannt, wobei ein solcher Ansatz oft klinisch nicht praktikabel ist.

In einer nachfolgenden Arbeit von *Gerlinger et al.* wurde die Genomlandschaft des RCC bei zehn Patienten weiter untersucht. Obwohl der Mutationsnachweis in drei Fällen mit zunehmender Biopsiezahl zu stagnieren schien, war in den anderen sieben Fällen ein anhaltender Anstieg der Anzahl der nachgewiesenen Mutationen mit jeder zusätzlichen Biopsie zu beobachten. Somit könnte eine weitere Erhöhung der Anzahl der Proben aus unterschiedlichen Tumorregionen zur Identifizierung zusätzlicher Subklone führen. Daher unterschätzt der Multiregionssequenzierungs-Ansatz wahrscheinlich immer noch die Anzahl der in vielen ccRCCs vorhandenen Mutationen [166].

Im Folgenden sind weitere Forschungsarbeiten dargestellt, die sich mit Mutationen beim RCC befasst haben.

In mehreren retrospektiven Studien wurde der prädiktive Wert einzelner Genmutationen, wie BAP1 oder PBRM1 untersucht, jedoch auch hier mit einem uneinheitlichen Bild. So zeigte sich in verschiedenen retrospektiven Untersuchungen eine Assoziation einer Mutation in PBRM1 zu einem verbesserten Ansprechen sowie klinischen Benefit für Nivolumab, aber auch für eine VEGF/R-gesteuerte Therapie oder Everolimus [163, 167-169].

Wie oben erwähnt stehen ccRCCs, in engem Zusammenhang mit der Mutation oder Inaktivierung des VHL-Tumorsuppressorgens, das für das VHL-Protein kodiert und durch den zuvor beschriebenen Signalweg eine Schlüsselkomponente in der Karzinogenese darstellt [170]. Der Phosphoinosid-3-Kinase (PI3-K)/Proteinkinase B (PKB oder AKT)/mTOR-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung vieler Tumoren. Beim RCC führt der Verlust des Tumorsuppressorgens VHL zur direkten Aktivierung des PI3-K/AKT/mTOR-Signalwegs [171]. Darüber hinaus steuert der mTOR-Signalweg die Synthese von Schlüsselproteinen, die für die Tumor- und Endothelzellproliferation benötigt werden [172].

Polymorphismen in Genen, die für T-Zell-regulierende Proteine und Zytokine kodieren, können über die Regulierung der Antitumor-Immunantwort die Entzündung und Krebsentwicklung beeinflussen. Daten aus einer spanischen Kohorte deuten darauf hin, dass das CTLA4-Gen ein Kandidat für die Entstehung eines RCC sein könnte [173]. In einer anderen Studie zeigten sich Polymorphismen in den CTLA4- und CD28-Genen, insbesondere wenn sie zusammen als Haplotypen betrachtet wurden, mit einem erhöhten ccRCC-Risiko, vorrangig mit Nekrose und mit dem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung assoziiert [174].

In einer weiteren Studie wurden Patienten mit einem RCC mittels Immunophänotypisierung in drei molekulare Subtypen unterteilt, von denen zwei Patientengruppen möglicherweise empfindlicher auf eine Anti-CTLA4-Therapie,

eine Anti-PD-1/PD-L1-Therapie oder eine Kombination von Immuntherapien reagieren [175].

Des Weiteren konnte in einer Arbeit eine messenger Ribonucleic Acid (RNA)-Signatur basierend auf differentiell exprimierten Genen entwickelt werden, die Hochrisikopatienten identifiziert. Diese Signatur war positiv mit der Expression von u. a. CTLA4 und LAG3 korreliert [176].

Die Heterogenität der Subtypen des RCC spiegelt den Zelltyp wider, aus dem es aus dem Nephron hervorgegangen ist, und hat wie beschrieben Konsequenzen für Therapie und Prognose. Eine Studie hat vor kurzem durch Sequenzierung von RNA gezeigt, dass Hypertonizität im Nierenmark die nephronspezifische Genexpression reguliert. Hier konnten Gene identifiziert werden, die durch Hypertonie differentiell exprimiert wurden, wodurch sich das CSS für ccRCC-Patienten vorhersagen ließ [177].

Eine weitere Studie erstellte ein Überlebensprognosemodellsystem auf der Grundlage von vier immunbezogenen Genen beim ccRCC. Patienten in der ungünstigen Risikogruppe wiesen eine hohe CD8⁺ T-Zell-, regulatorische T-Zell- und NK-Infiltration sowie eine hohe Expression von PD-1, CTLA4, CD137, TIGIT und LAG3 auf [178].

Einer Arbeitsgruppe gelang es außerdem eine 17-Gen-Signatur zu identifizieren, die die Prognose des RCC besser abschätzen lässt [179].

Die zahlreichen Arbeiten, die sich mit genetischen Mutationen beim RCC befassen, verdeutlichen die klinische Relevanz des Themas.

1.4 Zellkulturmethoden als Ansatz für in-vitro Therapieansprechen

Es ist bekannt, dass die Mikroumgebung des Tumors beim Ansprechen auf ICI eine Rolle spielt [180]. Das TME ist ein räumlich organisiertes und dynamisches Netzwerk aus Tumor-, Immun-, und Endothelzellen, Strukturmolekülen, extrazellulärer Matrix und vielen anderen Zellen wie neuroendokrinen Zellen, Fett- oder Stromazellen [181]. Das Zusammenspiel moduliert alle Aspekte der Tumorentwicklung, der Tumorprogression und der Therapieresistenz [180, 182].

Eine Analyse der Immunzellen zeigte, dass T-Zellen die Hauptpopulation darstellten (fast 50 %). Die mittlere Häufigkeit von myeloischen Zellen, NK und B-Zellen betrug 31 %, 9 % und 4 %. Nur wenige Granulozyten und Plasmazellen wurden identifiziert [183].

Die Mikroumgebung des RCC gilt als immunsuppressiv und hemmt gleichzeitig die Funktion von schützenden Immunzellen, während sie unterdrückende Zellen und Zytokine induziert. MDSCs bilden eine Schlüsselpopulation von protumorigenen Leukozyten [184]. MDSCs sind eine phänotypisch heterogene Zellpopulation, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnet, die Funktion von T-Zellen und NK zu unterdrücken [185]. Ihre Konzentrationen sind bei Patienten mit RCC deutlich höher als bei Kontrollpersonen, und ihre relative Häufigkeit in anderen Tumorarten korreliert positiv mit der metastatischen Tumorlast [186, 187]. Darüber hinaus konnte in einer kürzlich erschienenen Arbeit aus der Kooperation der Immunologie und Urologie der Universität Tübingen der hohe Stellenwert der fünf inhibitorischen Rezeptoren PD-1, BTLA, hTIM3, CTLA4, und LAG3 auf TILs beim ccRCC gezeigt werden. Hier war PD-1 der am häufigsten exprimierte Immunrezeptor auf TILs, gefolgt von BTLA und LAG3. Die BTLA-Expression war in autologen PBMCs höher als auf TILs [161]. Die Erschöpfung der Effektor-T-Zellen, die die Tumorbeseitigung vermitteln, wird durch Zelloberflächenmarker wie PD-1 und BTLA angezeigt [106].

Um möglichst realistische Tumormodelle zu generieren, die ein Therapieansprechen vorhersagen lassen, werden Tumorzellen unter Laborbedingungen in Kultur genommen. Diese in-vitro-Krebskulturen enthalten in der Regel ausschließlich neoplastisches Epithel und müssen daher künstlich rekonstituiert werden, um das TME nachzubilden. Mit Hilfe einer Luft-Flüssigkeit-Schnittstelle (engl.: Air-Liquid-Interface = ALI) Methode wurden in einer Arbeit Organoide von Patienten (engl.: Patient Derived Organoid = PDO) aus Biopsien als Tumorepithelien mit eingebetteten Immunzellen (T-, B-Zellen, NK und Makrophagen) vermehrt [188]. Das Kulturmedium kann auf diese Weise diffundieren, dessen ungeachtet haben die Zellen Zugang zu genügend Sauerstoff [182].

Es konnte gezeigt werden, dass PDO-TILs das ursprüngliche TCR-Spektrum des Tumors präzise erhalten. Entscheidend ist, dass humane PDO die ICI mit Anti-PD-1 und/oder Anti-PD-L1 erfolgreich modellierten, indem sie tumorantigenspezifische TILs expandierten und aktivierten und eine Tumorzytotoxizität auslösten [188]. Darüber hinaus handelt es sich bei den PDO um Material aus relativ frühen Passagen, im Gegensatz zu 2D-Krebszelllinien mit langer Passage, die aufgrund fortgesetzter genomischer Instabilität möglicherweise nicht mehr die Genetik ihrer ursprünglichen Tumoren repräsentieren [182]. Die Kultur von Gewebefragmenten ermöglicht die Erzeugung von PDO als Krebszellen en bloc neben endogenen nativen Stroma- und Immunkomponenten ohne Rekonstitution. Die PDO rekapitulierten in der Regel die Histologie des Primärtumors. Die Etablierung war bei schnell wachsenden hochgradig malignen Tumoren tendenziell robuster. In funktionellen Versuchen an den Modellen mit Anti-PD-L1-Wirkstoffen wurde die Abtötung von Tumorepithelzellen gefördert. Die organoidbasierte Vermehrung von Primärtumorepithel en bloc mit endogenem Immunstroma soll immunonkologische Untersuchungen innerhalb des TME ermöglichen und die Erprobung personalisierter Immuntherapien in-vitro erleichtern. Dennoch bewahren solche in-vitro-Modelle der Tumormunität nicht die gesamte komplexe Vielfalt des TME, sie stellen jedoch einen wichtigen Ansatz zur Untersuchung der ICI dar [188].

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren ist die Grundlage der adjuvanten und metastasierten Therapie des Nierenzellkarzinoms. Bis heute gibt es jedoch keine im klinischen Alltag anwendbaren Biomarker, die das Ansprechen der Patienten auf eine systemische Behandlung vorhersagen. In anderen Tumorentitäten sind Biomarker bereits gut exploriert oder kommen gar in der klinischen Anwendung zum Tragen. Für das mRCC sind immunologische Marker bislang unzureichend erforscht [103].

Aktuell basiert die Entscheidung für die Art der systemischen Therapie allein auf dem IMDC-Risikomodell [189]. Trotz einer signifikanten Steigerung der ORR sowie des OS sprechen bei weitem nicht alle Patienten auf die Therapie an und die meisten behandelten Patienten zeigen keine dauerhaften klinischen Remissionen [190, 191].

PD-L1, BTLA, hTIM3, CTLA4 und LAG3 sind Biomarker, die für das RCC im Rahmen von Krankheitsprogress bzw. Regress oder Therapiemöglichkeiten eine wichtige Rolle spielen oder hierfür aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften potenziell in Frage kommen.

In der Behandlung der metastasierten Erkrankung wird oftmals ein gemischtes Ansprechen, z. B. mit einer Komplettremission einzelner Metastasen beobachtet, während hingegen andere Metastasenlokalisationen oder auch der Primarius nur unzureichend ansprechen. Diese intertumorale Variabilität als auch die intratumorale Heterogenität sind bekannte Phänomene, die zum Teil auf unterschiedliche Treibermutationen zurückzuführen sind. Für das Immunsystem als tragende Säule in der Systemtherapie des RCC ist im Hinblick auf die inter- und intratumorale Heterogenität bislang wenig bekannt.

Zielsetzung der Arbeit ist es daher Rückschlüsse auf Vorhersagbarkeit für Therapieansprechen oder Krankheitsprogress beim mRCC anhand der untersuchten Marker zu ziehen und so die Methoden der individualisierten Krebstherapie zu verbessern. Explizit wurden folgende Fragestellungen beleuchtet:

- Unterscheidet sich die Expression der Biomarker PD-L1, BTLA, hTIM3, CTLA4 und LAG3 beim mRCC intratumoral oder intertumoral im zeitlichen bzw. örtlichen Verlauf in den korrespondierenden Metastasen im Vergleich zum Primarius?
- Ist die Höhe der Proteinexpression der immunologischen Marker im Tumorgewebe mit klinisch-pathologischen Merkmalen assoziiert?
- Gibt es eine Korrelation zwischen der Markerexpression auf Proteinebene mit dem Vorhandensein von somatischen Mutationen im RCC?
- Lässt sich auf Basis von funktionellen Untersuchungen der identifizierten immunologischen Markerproteine in Zellkulturexperimenten mit von Patienten abgeleiteten ALI Tumormodellen das in-vitro Therapieansprechen prognostizieren?

2 Material und Methoden

Für die Beantwortung der Fragestellung dieser retrospektiven Studie wurden am Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart (IKP) bereits etablierte Methoden angewendet. Alle Arbeiten wurden unter Hilfestellung und Aufsicht von Herr T. Hees, Frau L. Menig-Benzig und Frau Dr. E. Schaeffeler aus dem IKP durchgeführt. Das im Labor verwendete Wasser wurde mittels einer Aufbereitungsanlage (MilliQ) von Millipore zu VE-Wasser (Reinstwasser) oder Life-Science Wasser (hochreines Wasser) aufbereitet.

2.1 Patientenkollektiv und Datenerhebung

In Zusammenarbeit mit der Urologie am Universitätsklinikum Tübingen (UKT) und des IKP Stuttgart besteht eine anonymisierte Datenbank (Onkostar), die bereits über 900 Patienten mit einem RCC beinhaltet. Aufgeführt werden neben patientenbezogenen klinisch-pathologischen Daten wie Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, Noxen, Vorerkrankungen und Medikamenten auch tumorbezogene Daten wie Lokalisation, Größe, Grading, Stadium nach UICC, Subtyp, Nekrose und Infiltration von umliegendem Gewebe. Spezifische Parameter zu Narkoserisiko, Karnofsky-Index, prä- und postoperative Laborwerte und OP-Technik werden ebenfalls gelistet. Außerdem werden die erhaltenen Systemtherapien samt Therapiedauer und Zeitpunkt sowie die Lokalisation von Metastasen erfasst.

Die für die retrospektive Studie herangezogene Kohorte beinhaltet Patienten, die zwischen 1990 und 2020 an einem mRCC erkrankt sind und in der Urologischen Klinik am UKT operativ behandelt wurden oder sich einer Systemtherapie unterzogen haben. Eingeschlossen wurden sowohl klarzellige als auch papilläre und chromophobe histologische Subtypen. Für die Analysen standen klinische Daten und Gewebe von 111 Patienten zur Verfügung, die die Kriterien vollständig erfüllten. Für jeden Patienten wurden analog klinisch-pathologische Parameter erhoben. Falls die Patienten am UKT operativ versorgt wurden, waren die Formalin-fixierten Paraffinblöcke der Tumoren und Metastasen, teilweise mit Normalgewebe, vorhanden.

Die pathologische Klassifizierung der Primärtumoren erfolgte anhand des TNM-Systems der 8. Edition des UICC/American joint committee on cancer system (s. Tab. 1). Außerdem erfolgte eine Zuteilung nach dem nukleären Gradingssystem nach Fuhrmann durch die Pathologie am UKT.

Die Überlebensanalyse erfolgte für alle Patienten anhand einer zuvor durchgeführten telefonischen Erfragung des Gesundheitszustandes. Der OP-Zeitpunkt des Tumors wurde als Beginn des Follow-ups (FUP) festgesetzt. Endpunkte waren ein tumorabhängiges Versterben oder das Gesamtüberleben bis zur letzten FUP-Erhebung im Oktober 2020. Für die vorliegende Studie konnten Patienten mit FUP-Zeiträumen von 0,3-30,4 Jahre inkludiert werden. Die Patienten erhielten teilweise systemische Therapien. Die klinisch-pathologischen Merkmale und Überlebensdaten sind in Tab. 12 ersichtlich.

Es lagen schriftliche Einverständniserklärungen vor, die die Verwendung des Gewebes zu Forschungszwecken erlauben. Ein Ethikvotum (Antragsnummer 566/2020BO) der Ethikkommission der Universität Tübingen lag für die durchgeführten Untersuchungen vor.

2.2 Gewebeprobenmaterial

Aus der beschriebenen Patientenkohorte wurden, sofern die Patienten am UKT operiert wurden, alle vorhandenen Pathologieberichte und darin enthaltene Informationen zum Tumor zusammengetragen und anhand dessen passende Schnitte und Paraffinblöcke ausgewählt. Zuvor wurden die während OPs gewonnenen Präparate durch Medizinisch-technische Assistenten des Pathologischen Instituts des UKT in 4,5 % Phosphatgefuffertem Formaldehyd (PFA) fixiert. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (70 % Ethanol = EtOH, 96 % EtOH, 100 % EtOH; je zweimal 30 Min.) zur Dehydrierung und die anschließende Einbettung in Paraffin (Xylol einmal 60 Min. und einmal 120 Min., dann bei 60 Grad Celsius (°C) Paraffin einmal 60 Min., danach 120 Min.) mit Hilfe eines Einbettautomaten an einer Gießstation. Nach einer Einweisung in das Archiv des Pathologischen Instituts des UKT wurden die Schnitte mit passenden Blöcken eigenhändig herausgesucht, in einer Studienliste dokumentiert und mikroskopiert, um zu beurteilen, ob sie tatsächlich für das Projekt geeignet sind.

Die Metastasen dieser Patienten wurden teilweise schon in anderen Studien untersucht. Diese wurden bereits mit dem am IKP etablierten Genpanel, welches 32 Kandidatengene abdeckt, sequenziert. Die Daten standen zur Verfügung [192].

2.3 Hämatoxylin-Eosin-Schnitte

Für einen Teil der Paraffinblöcke waren in der Pathologie keine angefärbten Hämatoxylin-Eosin (HE)-Schnitte vorhanden. Hierfür wurden mit dem Mikrotom Schnitte angefertigt und mit HE gefärbt, um zu beurteilen, ob der Block für die Gewebeentnahme geeignet ist. Nach dem Schneiden wurden die Objektträger über Nacht bei 56 °C im Wärmeschrank inkubiert und vor der Färbung 15 Min. in Neo-Clear entparaffiniert. Die Färbung wurde mit einer absteigenden Alkoholreihe begonnen (3 Min. 100 % EtOH, 3 Min. 96 % EtOH, 3 Min. 70 % EtOH) und nach 1 Min. wässern (Leitungswasser) wurden die Schnitte für 15 Sek. in filtriertes Hämatoxylin gehalten. Anschließend wurde unter fließendem Wasser 5 Min. gespült und die Schnitte dann 1 Min. in Eosin getaucht. Nach kurzem erneuten wässern folgte analog eine aufsteigende Alkoholreihe (1 Min. 70 % EtOH, 3 Min. 96 % EtOH, 100 % EtOH) und abschließend dreiminütiges Eintauchen in Neo-Clear. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit Neomount eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

2.4 Einscannen und Bearbeiten der Hämatoxylin-Eosin-Schnitte

Die fertigen HE-Schnitte wurden mit dem Olympus VS120-S5 Slidescanner mit einem 20er Objektiv eingescannt. So können die eingescannten Schnitte am Monitor mikroskopiert, beurteilt und digital markiert werden. Für alle Schnitte erfolgte jeweils eine rote Markierung im Tumorareal für die Gewebeentnahmen und falls vorhanden, eine grüne Markierung für das benigne Gewebe. Die genaue Handhabung des Slidescanners lässt sich im Benutzerhandbuch nachlesen.

2.5 DNA Isolierung und Konzentrationsbestimmung

Die Desoxyribonukleinsäure (engl.: Desoxyribonucleid Acid = DNA) Isolierung erfolgte mit dem AllPrep® DNA/RNA FFPE Kit exakt nach dem dazugehörigen Handbuch [193]. Nacheinander können mit dem Kit reine DNA und RNA aus dem gleichen FFPE-Gewebe (engl.: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissue = FFPE) isoliert werden.

Der Inhalt des Kits sowie verwendete Abkürzungen lassen sich Tab. 6 entnehmen. Das Ansetzen der Puffer und Lösungen sowie die Lagerung der Bestandteile erfolgte anhand der Hinweise im Benutzerhandbuch.

FFPE Proben müssen mit Formaldehyd fixiert und anschließend eingebettet werden. Aufgrund dessen sind die Nukleinsäuren regelhaft stark fragmentiert und durch Formaldehyd chemisch modifiziert, wobei der Grad der Fragmentierung von der Art und dem Alter sowie von den Bedingungen für die Fixierung, Einbettung und Lagerung der Probe abhängt. Dies kann Einfluss auf spätere Analysen der Nukleinsäuren haben [193].

Um aus FFPE Gewebelöcken Material für eine DNA-Analyse zu gewinnen, mussten zunächst Schnitte angefertigt werden. Die Schnittdicke betrug 4 µm. Die Gewebelöcke wurden zuvor auf Eis gelagert, damit das Paraffin fest genug zum Schneiden war. Zur Vorbereitung zählt, das Mikrotom und alle benötigten Utensilien mit RNase Away zu reinigen, um Verunreinigungen der Probe mit anderen DNA/RNA-Resten zu verhindern. Dieser Schritt musste nach jedem Block wiederholt werden. Außerdem wird das Wasserbad (37 °C) gereinigt und eine separate Schüssel mit kaltem Wasser bereitgestellt. Für die Proben wurden Eppendorfgefäße bereitgestellt und beschriftet. Der zuvor digital markierte Schnitt wurde zum Vergleich herangezogen, sodass in das Eppendorfgefäß möglichst nur Tumormaterial gelangte. Zwischen den einzelnen Blöcken erfolgte jeweils ein Handschuhwechsel, um Kontaminationen zu vermeiden.

Um die Isolierung zu beginnen, musste die Probe zunächst mittels Zugabe von 1 mL Xylol, einem Lösungsmittel, entparaffiniert werden. Die Suspension wurde gevortext und anschließend bei voller Geschwindigkeit für 2 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipetiert und verworfen. Anschließend wurde 1 mL Ethanol (96-100 %) zugegeben, um das restliche Xylol zu entfernen. Es

folgte erneut ein Vortexen der Probe, Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit für 2 Min. und Verwerfen des Überstands. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß mit offenem Deckel bei 37 °C inkubiert, bis das restliche Ethanol verdampft war. Das Pellet wurde nun mit 150 µL PKD-Puffer, einem Verdauungspuffer, resuspendiert und unter Schwenken gelöst. Nach Hinzufügen von 10 µL Proteinase K wurde das Eppendorfgefäß gevortext und anschließend bei 56 °C für 15 Min. inkubiert. In diesem Schritt sollen die Zellbestandteile bis auf die Nukleinsäuren runterverdaut werden. Nach dreiminütigem Inkubieren auf Eis und 15-minütigem Zentrifugieren bei 20000 x g, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues 2 mL Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet, das die DNA enthält, kann bis zu 2 h bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt werden und nach der RNA-Aufreinigung weiterbearbeitet werden. Begonnen wurde mit der RNA-Aufreinigung, da RNA noch instabiler als DNA ist. Die RNA wurde isoliert und steht dem Institut für spätere Analysen zur Verfügung. Die RNA Eluate wurden für hierfür bei -80 °C eingefroren. Die genauen Arbeitsschritte lassen sich dem Handbuch entnehmen.

Daraufhin konnte die DNA-Aufreinigung aus dem Pellet beginnen. Zunächst wurde das Pellet mit 180 µL ATL-Puffer, einem Gewebe-Lysepuffer, und 40 µL Proteinase K resuspendiert und gevortext. Nach der Inkubation für 1 h bei 56 °C folgte noch eine Inkubation für 2 h bei 90 °C ohne jegliche Erschütterung. Dieser Inkubationsschritt macht die Formaldehydmodifikation der Nukleinsäuren teilweise rückgängig. Längere Inkubationszeiten oder höhere Inkubationstemperaturen können zu einer stärkeren Fragmentierung der DNA führen. Schütteln während dieses Inkubationsschritts führt zu geringeren DNA-Ausbeuten. Durch vorsichtiges Zentrifugieren konnten anschließend Tropfen von der Deckelinnenseite gelöst werden. Nachdem die Probe auf RT abgekühlt war, wurden 4 µL RNase A (100 mg/mL) hinzugefügt und bei RT für 2 Min. inkubiert, um RNA-Reste zu verdauen. Daraufhin gab man 200 µL AL-Puffer hinzu, ein Lysepuffer, und hat gevortext, bevor 200 µL Ethanol (96-100 %) hinzugegeben und erneut gevortext wurde, damit eine homogene Lösung entsteht. Das Gemisch wurde auf die QIAmp MinElute spin column (DNA-Säule) gegeben, welche in ein 2 mL Sammelgefäß gesteckt war. Die Säule wurde für 1 Min. bei

8000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgten zwei Waschschrte. Zuerst wurden 700 µL Puffer AW1 auf die Säule gegeben, für 15 Sek. bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde mit Waschpuffer AW2 wiederholt. Anschließend wurden 700 µL Ethanol (96-100 %) auf die Säule gegeben und bei geschlossenem Deckel für 15 Sek. bei 8000 x g zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde nun durch fünfminütiges Zentrifugieren mit geöffnetem Deckel bei voller Geschwindigkeit getrocknet und anschließend in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß gesteckt. Es ist wichtig, die Membran der Spin Column zu trocknen, da restliches Ethanol nachgeschaltete Reaktionen beeinträchtigen kann. Die Zentrifugation mit geöffneten Deckeln gewährleistet, dass bei der DNA-Elution kein Ethanol verschleppt wird. 76 µL ATE-Puffer, ein EDTA-armer Elutionspuffer, wurden direkt auf die Säulenmembran pipettiert und für 1 Min. bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation von 1 Min. bei voller Geschwindigkeit wurde die DNA eluiert. Das Totvolumen der QiAmp MinElute-DNA-Säule beträgt ca. 5 µL, das Eluat maß dann ca. 70 µL [193].

Das Konzentrationsergebnis der Aufreinigung der DNA wurde quantitativ mit Hilfe des Spektralphotometers Nanodrop gemessen. Dieser misst allerdings auch fragmentierte Nukleinsäuren. Es handelt sich um eine photometrische Konzentrationsbestimmung mit Messung der Extinktion bei 260 nm (A_{260}). Das Verhältnis der Messwerte bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) liefert einen Schätzwert für die Reinheit in Bezug auf Verunreinigungen, die im UV-Spektrum absorbieren, wie z. B. Protein. Reine DNA hat ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,7-1,9. Das Scannen der Absorption von 220-320 nm zeigt, ob Verunreinigungen vorhanden sind, die die Absorption bei 260 nm beeinflussen. Das Ergebnis wurde dem Qubit™ mithilfe eines Kits verifiziert. Die Analyse ist hochselektiv für doppelsträngige DNA (dsDNA) gegenüber RNA und ist so konzipiert, dass er für anfängliche Probenkonzentrationen von 100 pg/µl bis 1.000 ng/µl im breiten Bereich (engl.: Broad Range = BR) bzw. von 10 g/µL bis 100 ng/µL im hochsensitiven Bereich (engl.: High Sensitivity = HS) genau ist. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine photometrische Konzentrationsbestimmung. Zunächst wurde mit dem im Kit enthaltenen

Reagenz und dem Puffer eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von 1 : 200 gemischt. Anschließend wurden zwei Standards für die Messung hergestellt. Hierfür wurden 10 µL Standard 1 bzw. 2 aus dem Kit benutzt und mit 190 µL der Arbeitslösung in einem Teströhrchen verdünnt. In weiteren Röhrchen wurde nun 1 µL der Probe mit 199 µL der Arbeitslösung verdünnt, sodass alle Teströhrchen ein Volumen von 200 µL beinhalten. Die vorbereiteten Röhrchen wurden 2-3 Sek. gemischt und noch für 2 Min. bei RT inkubiert. Nach Messung der beiden Standards konnten die Proben photometrisch gemessen werden. Die DNA Eluate wurden im nächsten Schritt für das Next Generation Sequencing (NGS) vorbereitet (s. u.).

2.6 Mutationsanalysen mittels Next Generation Sequencing

Die verwendeten molekularen Daten stammen aus einer zuvor durchgeführten Arbeit von *Sauter-Meyerhoff et al.* [192] und wurden für die hiesigen Analysen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. In der Arbeit von *Sauter-Meyerhoff et al.* wurden bereits die Metastasen des Patientenkollektivs hinsichtlich genetischer Veränderungen analysiert. Es wurden 82 Metastasen (FFPE) aus 18 Organen von 57 Patienten untersucht. Bei 19 Patienten lag Probenmaterial aus mehreren Metastasen zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten vor [192].

Für die Genauswahl des am Institut etablierten verwendeten Panels wurden Daten aus Literatur und dem Cancer Genome Atlas (TCGA) ausgewertet. Basierend auf diesen Daten zielt das Panel auf ganze Exonregionen oder ausgewählte Genregionen ab, die für das Entstehen und Fortschreiten des RCC bekannt oder potenziell wichtig sind. Es wurden 32 Kandidatengene untersucht, die sich im Detail Abb. 1 entnehmen lassen. Unter anderem zielt das Panel auf das VHL-Gen ab [192].

Für spätere Arbeiten wurde das Metastasenkollektiv um fehlende Metastasen ergänzt. Zusätzlich wurden die korrespondierenden Primärtumoren, falls vorhanden, für NGS-Analysen vorbereitet.

Das verwendete Kit ist das Agilent NGS FFPE QC Kit. Der Inhalt lässt sich Tab. 6 entnehmen, die genaue Durchführung lässt sich dem Handbuch entnehmen. Zunächst wurde mit Hilfe des Kits eine quantitative Polymerase Ketten Reaktion

(engl.: Polymerase Chain Reaction = PCR) durchgeführt, um die Quantität der amplifizierbaren DNA nachzuweisen. Die DNA aus FFPE Proben ist durch langjähriges Einlagern oft fragmentiert und deutlich degradiert. Anschließend konnten die geeigneten Proben nach Protokoll für die Sequenzierung vorbereitet werden. Die genetischen Analysen wurden dann mittels NGS außer Haus durchgeführt.

All exons of:	Cancer Hotspot Regions of:
▪ MET	▪ TERT 5'UTR/promoter
▪ BAP1	▪ HRAS
▪ PIK3CA	▪ RET
▪ FH	▪ PTPN11
▪ TCEB1	▪ STK11
▪ TP53	▪ FLT3
▪ TSC2	▪ JAK3
▪ SETD2	▪ RB1
▪ MTOR	▪ CSF1R
▪ TSC1	▪ CTNNB1
▪ PBRM1	▪ ABL1
▪ VHL	▪ GNA11
▪ KDM5C	
▪ ARID1A	
▪ PTEN	
▪ ATM	
▪ KMT2C/MLL3	
▪ STAG2	
▪ NF2	
▪ TERT	

Abbildung 1: Verwendetes Sequenzierungspanel mit 1248 Zielregionen von 32 Kandidatengenen, die mit der Pathophysiologie des RCC in Zusammenhang stehen [192].

2.7 Tissue Micro Array Technik

Unter einem Tissue Micro Array (TMA) versteht man, dass mehrere unterschiedliche Gewebeproben auf einem Paraffinblock vereint werden. Die Technik wurde von *Battifora et al.* [194] im Jahre 1986 entwickelt. Für die Untersuchung des hiesigen Kollektivs wurde ein Apparat nach *Kononen et al.*

[195] zur TMA-Herstellung verwendet. Die TMA-Technik ermöglicht eine große Anzahl an Gewebeproben auf einem Objektträger durch nur einen Färbeporgang zeitsparend und gleichmäßig zu bearbeiten. Im Falle der Immunhistochemie können alle Proben den gleichen experimentellen Bedingungen zugeführt werden. Für jedes Core auf dem TMA sind die Reagenzienkonzentration, die Inkubationszeiten, Temperaturen und Waschbedingungen exakt gleich. Dies erlaubt neben effizientem und wirtschaftlichem Arbeiten ein hohes Maß an Standardisierung. Die Proben können nebeneinander ausgewertet werden und die Variabilität von Objektträger zu Objektträger wird so verringert [196, 197] und die Qualität der aus den Immunhistochemie gewonnenen Daten gesteigert [197]. Studien zufolge besteht zwischen den TMA-Cores und den Schnitten mit komplettem Gewebe eine hohe Konkordanz, sodass Gewebeheterogenität keine Einschränkung darstellt [196]. In einer weiteren Studie konnte validiert werden, dass der berechnete Score von zwei Histopunkten ausreicht, um den Score des kompletten Gewebestücks zu 95 % darzustellen [198].

Die vorliegenden Proben wurden wie oben beschrieben mikroskopisch betrachtet, markiert und histologisch reevaluiert. Für jeden Patienten wurden zwei Tumorgewebebereiche für die Gewebeproben ausgewählt. Dabei wurden pathologisch repräsentative Areale für den Tumor bevorzugt, die weder Nekrosen noch größere Gefäße oder Einblutungen enthielten. Die Auswahl erfolgte unter Anleitung von Dr. med. Viktoria Stühler und Dr. med. M. Scharpf. Die markierten Areale wurden im vorhandenen Paraffinblock aufgesucht. Mit Hilfe eines Manuellen Tissue Microarrayers Model MTA-1, der über eine Hohlzylinder verfügt, wurde aus allen markierten Arealen ein Gewebezylinder entnommen. Die Gewebeproben wurden mit einem Durchmesser von 0,6 mm und einer Tiefe von 3 mm ausgestanzt. Im Pathologischen Institut des Robert-Bosch-Krankenhauses (RBK) in Stuttgart wurden leere Paraffinblöcke gegossen, in die die Gewebezylinder in davor passend ausgestanzte Hohlräume mit einer Tiefe von 3 mm platziert wurden. Hierbei half eine X-Y-Koordinateneinstellung. Wenn von einem Patienten mehrere Tumoren vorhanden waren, wurden diese ebenfalls nebeneinander positioniert, um die Auswertung zu erleichtern. Zur Orientierung auf dem Block wurde zuvor eine Layouttabelle erstellt, die mit dem

Koordinatensystem die richtige Anordnung auf dem Block und die Zuordnung von Patientendaten gewährleistet.

Nachdem die Gewebestanden platziert waren, wurden die Paraffinblöcke manuell auf einen Objektträger aufgebracht und zur Fixierung angedrückt. Nach Abkühlung auf 4 °C konnte der TMA-Block vom Objektträger entfernt werden. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Blöcke über Nacht bei -20 °C aufbewahrt. Mittels eines Mikrotoms wurden von den TMA-Blöcken 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Super Frost R Plus Objektträger aufgebracht. Je nach Dicke der Gewebestanden können so zahlreiche Schnitte aus einem TMA-Block angefertigt werden, die dann für Analysen zur Verfügung stehen.

Nach dem Schneiden folgte die immunhistochemische Färbung der TMAs.

2.8 Immunhistochemie EN Vision Methode

Bereits seit den 1970er Jahren wird die Immunhistochemie (IHC) als gut etablierte Technik routinemäßig in der molekularen und diagnostischen Pathologie eingesetzt. Sie dient hierbei der Identifizierung und Lokalisierung von zellgebundenen Antikörpern [195, 197].

Die EN Vision Methode ist eine indirekte immunhistochemische Nachweismethode. Zunächst wurden die aus den TMAs erstellten Schnitte bei 56 °C für 30 Min. im Wärmeschrank entparaffiniert und anschließend zur weiteren Entparaffinisierung für 30 Min. in Neo-Clear getaucht, ein xylolähnliches Lösungsmittel. Währenddessen wurde ein Dampfkochtopf maximal mit entionisiertem Wasser gefüllt und eingeschaltet. Hierin wurde die Target Retrieval Solution mit entsprechendem pH-Wert, welche im Verhältnis 1 : 10 mit Life Science Wasser verdünnt wurde, für 20 Min. vorgewärmt. Der Färbeprozess begann mit einer absteigenden Alkoholreihe zur Rehydrierung (je 3 Min. EtOH 100 %, 96 %, 70 %) woraufhin zwei- bis dreimal je 3 Min. mit Tris buffered saline + 0,1 % Tween (TBS-T-Puffer = TBST) gewaschen wurde. Es folgte die hitzeinduzierte Demaskierung der Epitope im Dampfgerät, um die mit der Vorbehandlung durch Formalin und Paraffin verlorengangene Immunreaktivität wieder herzustellen. Hierfür wurden die Schnitte 30 Min. in der vorgewärmten Target Retrieval Solution (pH 6 bzw. pH 9) erhitzt und

anschließend ca. 20 Min. in diesem Puffer abgekühlt. Die Schnitte wurden erneut zwei- bis dreimal für je 3 Min. in TBST-Puffer gewaschen und darauffolgend in die Feuchtkammer gestellt. Hierauf folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase (0,03 % H₂O₂) mit einem Deckglas für 10 Min. mit 100 µL, um unspezifische Bindungen und damit Hintergrundfärbungen zu verhindern und nochmals zwei bis drei Waschschrte für je 3 Min. in TBST-Puffer.

Jetzt wurden 100 µL Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung in Phosphate Buffered Saline (PBS) sowie ein neues Deckglas aufgebracht und 30 Min. bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert (s. Tab. 5). Der Primärantikörper bindet direkt auf die spezifischen Strukturen, die von den Tumorzellen exprimiert werden.

Auf den Primärantikörper folgte erneutes zwei- bis dreimaliges Waschen in TBST-Puffer für je 3 Min. Im Fall des Antikörpers hTIM3 musste für 30 Min. ein Brückenantikörper gebunden werden, da der hTIM3-Antikörper aus der Ziege stammt und die im Anschluss verwendeten Sekundärantikörper nur an Kaninchen- oder Mausimmunglobuline binden können.

Für die in-vitro Detektion der Antikörperbindung wurde das Kit Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) verwendet.

Teil des Kits ist das Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV). Hierbei handelt es sich um ein mit Peroxidase- und sekundären Ziegenantikörpermolekülen, die sich gegen die Kaninchen- und Mausimmunglobuline richten, gekoppeltes Dextran. Dieses dient als Nachweisreagenz. Hiervon wurden pro TMA 100 µL aufgetragen und für 30 Min. inkubiert. Daraufhin wurde erneut zwei- bis dreimal mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die im Kit enthaltene Diaminobenzidinlösung (Dako REAL™ DAB+ Chromogen; 20 µL) mit dem enthaltenen wasserstoffperoxidhaltigen Substratpuffer (Dako REAL™ Substrate Buffer; 1 mL) verdünnt und jeweils 100 µL dieses Substratsystems auf die TMAs aufgetragen. Nach 10 Min. Inkubation erfolgte für 3 Min. unter fließendem Leitungswasser ein Waschschrte. Um die Orientierung auf den Schnittpräparaten zu gewährleisten, folgte eine Gegenfärbung für ca. 10 Sek. mit filtrierte Hämalaun, welches die Kerne anfärbt. Es folgte das Bläuen für 3 Min. unter fließendem Leitungswasser. Analog

zur HE-Färbung wurden die gefärbten TMA-Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert (je 3 Min. EtOH 70 %, 96 %, 100 %) und anschließend zur Fixierung für 5 Min. mit Neo-Clear behandelt. Nachdem die Schnitte angetrocknet waren, wurden sie mit Neo-Mount eingebettet und mittels Deckglas eingedeckelt.

Die optimale Konzentration des primären Antikörpers wurde zuvor auf Testgeweben in Verdünnungsreihen bestimmt. Zur Kontrolle und Gewährleistung der Qualität der Antikörperfärbungen gegen Lymphozyten (CTLA4, LAG3), wurde noch eine Färbung mit einem Antikörper gegen CD8 durchgeführt.

Für alle anderen Antikörper folgte nach dem Waschschrift direkt die Zugabe von 100 µL Sekundärantikörper mit einem Deckglas und wieder zwei- bis dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer für je 3 Min. Der Sekundärantikörper enthält das Enzym Horseradish peroxidase (HRP) und bindet an den Primärantikörper. Die Objektträger wurden daraufhin mit 100 µL Substrat/Chromogen-Mix (im Verhältnis 1 mL/20 µL) mit einem Deckglas versehen für exakt 10 Min. inkubiert und anschließend 3 Min. unter fließendem Leitungswasser gespült. Das Substrat reagiert mit dem konjugierten HRP, wodurch die gebundenen Strukturen später unter dem Mikroskop farbig sichtbar sind. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte noch für exakt 10 Sek. mit filtriertem Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend nochmals für 3 Min. unter fließendem Leitungswasser gespült. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 Min. EtOH 70 %, 96 %, 100 %) endete der Färbeprozess mit dem Eintauchen in Neo-Clear für 5 Min. und dem Einbetten der Schnitte mit Neo-Mount. Abschließend wurde luftblasenfrei ein Deckglas auf dem Objektträger aufgebracht, die Schnitte wurden unter dem Abzug getrocknet und konnten dann unter dem Mikroskop begutachtet werden.

2.9 Standardisierte automatisierte Auswertung mit Tissue Studio®

Für die automatisierte quantitative Auswertung der Proteinexpression wurde das Software-basierte Bildanalyse-Programm Tissue Studio® v.4.4.3 (Definiens AG, München, Deutschland) angewendet. Tissue Studio® gewährleistet dem Anwender die Quantifizierung von Bildern der Breitfeld-Immunhistochemie. Ein in der Software enthaltenes Arbeitsinstrument ist die TissueMap 3.0, welches

sich zur automatisierten Quantifizierung von Biomarkern im Zellkern, in der Membran und im Zytoplasma eignet. Es kann für komplette Gewebeschnitte sowie für TMAs verwendet werden. Anhand eines mehrstufigen Algorithmus bearbeitet die Software die eingescannten Bilder der Gewebestanden auf den Objektträgern und führt an der Zellmembran eine kontinuierliche, quantitative Messung der immunhistochemischen Färbungen an der Zellmembran durch. Die Arbeitsschritte erfolgten nach den Herstellerangaben.

Der Arbeitsprozess wurde durch das Wählen des Portals Definiens Tissue Studio (TMA) gestartet. Dieses wird für die Analyse von TMAs mit immunhistochemischen Breitfeldbildern empfohlen. Die eingescannten TMA-Objektträger wurden importiert. Die TMA-Stanzbereiche, auch Cores genannt, können anschließend mit einem benutzerdefinierten Raster durch Eingabe der Reihen- und Spaltenanzahl der Gewebestanden, Festlegung der positiven Cores und Markieren der leergebliebenen Plätze automatisch durch die Software detektiert werden. Es folgte eine Zuordnung der Positionen auf einem Gitterlayout. Die angezeigten Ergebnisse der automatischen Core-Detektion und des Matchings konnten manuell nachbearbeitet werden. Hierzu wurden Cores entweder gelöscht, die aus dem Matching-Prozess und der darauffolgenden Auswertung ausgeschlossen werden sollten, Cores manuell hinzugefügt oder deren „Region of Interest“ (ROI) verändert, also die Region, die für die Auswertung herangezogen wurde. Mit Hilfe des Rasters konnten Daten, bspw. die zugeordnete Nummer, aus einer csv.Datei hochgeladen und zur Auswertung gespeichert werden. Für die Analyse wurde die vordefinierte Option „Nuclei, Membranes and Cells“ mit den Zusatzfunktionen „ROI detection, nucleus and membrane detection and cell classification“ verwendet. Die ROI wurden ausgewählt, um zwischen Tumorgewebe (IHC positiv oder negativ) und bspw. nekrotischen, eingebluteten Arealen oder Bindegewebe zu unterscheiden. Die Software kann anschließend, in einem Trainingsmodus anhand von maximal zwölf manuell ausgewählten Cores, bis zu acht verschiedene Kategorien erlernen. Für die Auswertung wurden die Klassen „Tumor positiv“, „Tumor negativ“, „Bindegewebe“ und „Hintergrund“ namentlich gewählt und jeweils eine Farbe zugeordnet. Die Trainingsbilder, die in ihrer Morphologie möglichst

heterogen aussehen sollen, um ein qualitativ hochwertiges Training zu gewährleisten, wurden von der Software in Segmente unterteilt, deren Größe angepasst werden konnte. Manuell wurden zu den definierten Klassen Segmente ausgewählt, die sich dann mit der jeweiligen Farbe gefüllt haben. Im darauffolgenden Schritt wendete die Software die festgelegten Bereiche auf die zwölf Trainingsbilder an. Dieser Prozess konnte durch den Anwender beurteilt werden und somit überprüft werden, ob das Einteilungsschema mit dem zugrundeliegenden Gewebe übereinstimmte. Die Segmentwahl konnte bei Bedarf angepasst und verbessert werden, bis die Klassen mit dem Originalbild histologisch übereinstimmten. Für die nukleäre und membranöse Erkennung wurden Schwellenwerte hinzugefügt und anhand der zwölf Trainingsbilder evaluiert, bis auch hier die Übereinstimmung mit dem histologischen Originalbild gegeben war. Die von der Software detektierten Zellen wurden anschließend noch entsprechend ihrer immunhistochemischen Färbeintensität in „negativ“, „niedrig“, „moderat“ und „stark“ in Subgruppen eingeteilt. Diese Subklassifizierung wurden ebenfalls anhand der Trainingsbilder kontrolliert und ggf. angepasst.

Das Prinzip der software-basierten Auswertung besteht darin, eine Maske durch Festlegung von Schwellenwerten eines Markers auf den Bildern herzustellen. So kann Tumorgewebe von umliegendem Stroma oder eingebluteten Bereichen unterschieden werden. Der Software ist es auf diese Weise möglich, die Anzahl der Tumorzellen, die den Marker exprimieren (IHC positiv) oder nicht exprimieren (IHC negativ), pro TMA-Core digital zu zählen und in verschiedene Expressionsstufen einzuteilen.

Das Analyseprogramm wurde anschließend gestartet und die hinterlegte Maske ist über alle im Arbeitsspeicher enthaltenen Bilder gelaufen. Nach Beendigung des Analyselaufs entsteht im Exportvorgang eine csv.Datei, die zu jedem Core Informationen über die Zellzahl und Expressionsstufen enthält. Die Datei konnte nach Excel exportiert werden und stand somit direkt für die Datenverarbeitung zur Verfügung. Zu jedem Core des TMAs wurden Bildschirmfotos der ROI, detaillierte Analysebilder der Kerne und Membranen sowie die Unterteilung in

unterschiedlich angefärbte Klassen abgespeichert. Die Bilder konnten begutachtet und die zugehörigen Ergebnisse analysiert werden.

Zur quantitativen Auswertung der Proteinexpression wurde anschließend der Tissue-Studio-Score (Score_{TS}) aus der Anzahl der Zellen in der Tumorregion (IHC „positiv“ und „negativ“), multipliziert mit der Färbeintensität und dividiert durch die Anzahl aller detektierten Zellen in der Gewebestanze gebildet [199].

$$Score_{TS} = \frac{IHC_{neg}(\#neg \times 0 + \#low \times 1 + \#high \times 3) + IHC_{pos}(\#neg \times 0 + \#low \times 1 + \#high \times 3)}{\#IHC_{neg} + \#IHC_{pos}}$$

Formel 1: Berechnung des Tissue-Studio-Scores (Score_{TS}).

Das beschriebene Verfahren wurde für die TMAs angewendet, die mit Antikörpern gegen PD-L1, BTLA und hTIM3 gefärbt wurden. CTLA4 und LAG3 werden überwiegend auf Lymphozyten exprimiert. Die Anzahl der Tumorzellen wurde für die Tumorstanzen analog mit Tissue Studio® bestimmt. Der Schritt der „cell classification“ und der Score_{TS} wurden bei diesen Färbungen nicht angewendet. Für CTLA4 und LAG3 wurde die Auswertung nach der Tumorzellzahlermittlung manuell durchgeführt. Es erfolgte eine Einteilung in negativ „0“, falls keine CTLA4⁺ Zellen nachweisbar waren und positiv „> 0“, falls wenige Zellen angefärbt wurden. Falls die Zellzahl nicht ermittelt werden konnte, wurde der Wert auf „NA“ für nicht auswertbar gesetzt. Für LAG3 wurde die Zellzahl ebenfalls mit Tissue Studio® ermittelt. Hierbei wurden negative Tumorstanzen als „0“ gruppiert. Tumorstanzen, die n = 1-50 angefärbte Zellen enthielten wurden als schwach positiv „1“, n = 51-100 Zellen als mittel stark positiv „2“ und n ≥ 101 Zellen als stark positiv „3“ gruppiert. Falls die Gesamtzellzahl für den Tumor nicht zu ermitteln war, wurde diese analog auf „NA“ gesetzt. Zunächst wurde für die Auswertung der auf LAG3 gefärbten TMAs versucht, die Klasse „Lymphozyten“ (hellgelb) zu trainieren. Die Ergebnisse waren jedoch nicht hinreichend genau, sodass die Auswertung manuell durchgeführt wurde. Für den Tumor-Metastasen Vergleich wurde bei mehreren Metastasen jeweils diejenige ausgewählt, deren Wert am nächsten zur Einteilung der Tumorexpression lag.

Die untenstehende Abb. 2 zeigt einen eingescannten TMA (hTIM3), der dann mit Tissue Studio® ausgewertet wurde.

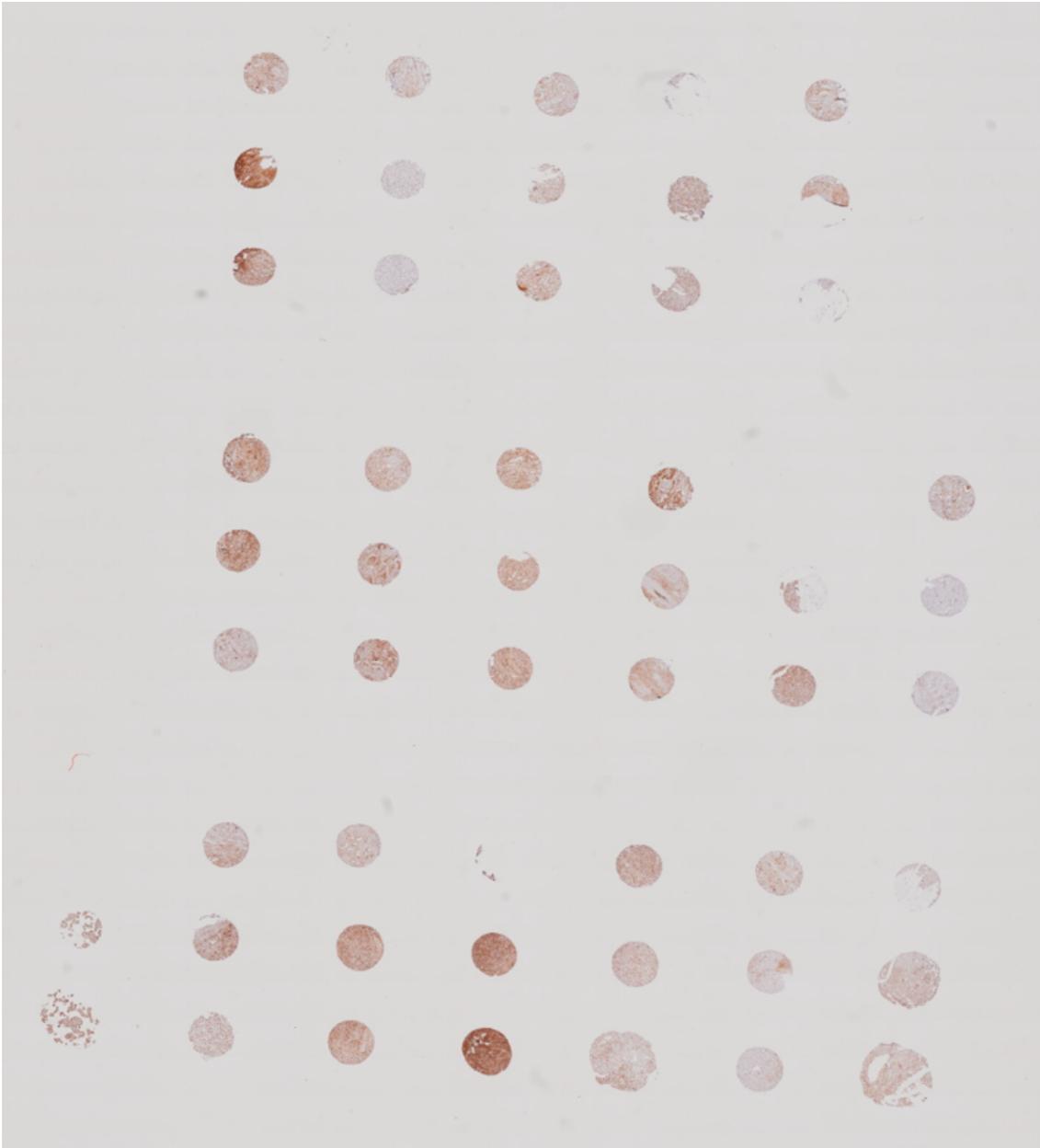


Abbildung 2: TMA (hTIM3) für die Auswertung mit Tissue Studio® (Definiens AG). Abgebildet ist beispielhaft ein TMA, der für die Auswertung herangezogen wurde. Der TMA wurde mit einem Antikörper gefärbt, der an hTIM3 bindet. Die Tumorstanzen sind unterschiedlich stark angefärbt. Anschließend wurde der TMA wie im Material- und Methodikteil beschrieben eingescannt und in die Software eingepflegt. Links unten sind zwei Plazentagewebebestanden zur Unterscheidung des Layouts aufgebracht.

2.10 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden nach Einweisung in einem S1 Labor an einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Kautelen durchgeführt. Die Versuche wurden mit Primärmaterial von Patienten, die an der Klinik für Urologie in Tübingen operiert wurden, durchgeführt. Ein Ethikvotum lag vor.

2.10.1 Generierung und Kultivierung von Patientenabgeleiteten Air-Liquid-Interface Tumormodellen

Um die Bedingungen des Tumorgewebes in-vivo möglichst adäquat nachempfinden zu können, wurden ALI in-vitro Modelle gezüchtet. Ziel der Zellkulturversuche war es, die Auswirkungen der verschiedenen Systemtherapeutika auf die Tumorzellen zu untersuchen. Die Generierung der Patientenabgeleiteten ALI Tumormodelle erfolgte aus Primärmaterial. Es handelt sich um Gewebekulturen, die in einem Air-Liquid-System kultiviert werden (daher im Folgenden engl.: tissue cultures = TC) [200]. Das ermöglicht eine in-vitro Kultivierung von Tumormodellen, die von ihrer Biologie und ihres TME von Patienten abgeleitet sind. Das Primärgewebe wurde in Tissue Storage Solution gelagert und spätestens 24 h nach der Entnahme weiterverarbeitet. Nachdem das Gewebe in 1 x Primocin PBS gewaschen wurde, wurde es in 1 mm große Stücke zerteilt und weitere zweimal mit 1 x Primocin gewaschen. Die Gewebestücke wurden in 60 µL Collagen-I aufgenommen und auf ein mit 60 µL Collagen-I beschichteten Zellkultureinsatz in einer 24-Well-Platte verteilt. Nach 20-30 Min. Inkubation bei 37 °C wurde das Zellkulturmedium vorsichtig unter dem Einsatz hinzugegeben.

Alle TC wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Der Mediumwechsel für alle TC wurde zweimal wöchentlich (alle drei bis vier Tage) durchgeführt. Hierfür wurde das alte Medium abpipettiert und neues in die Wells gegeben. Die Modelle wurden auf Mycoplasmenkontamination mittels PCR untersucht. Das abgenommene Medium wird dafür in einem Probenröhrchen gesammelt, 5 Min. bei 95 °C inkubiert und anschließend bis zur Analyse bei -80 °C eingefroren. Die PCR wurde durch einen Mitarbeiter des Instituts durchgeführt.

2.10.2 Passagieren und Einfrieren der Tumormodelle

Für das Passagieren wurde das Medium abgenommen und 300 µL Collagenase IV Lösung (200 units/mL) wurde auf den Einsatz gegeben und für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Gewebestücke wurden mittels einer mit Rinderalbumin (engl.: Bovine Serum Albumin = BSA) beschichteten Weithalsspitze durch Hoch- und Runterpipettieren gelöst, in PBS aufgenommen und in ein 15 mL-Röhrchen überführt. BSA verhindert, dass die Gewebestücke in der Spitze anhaften. Die Gewebestücke wurden dreimal mit EDTA in PBS für 5 Min. gewaschen und jeweils für 3 Min. bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Gewebestücke wie oben beschrieben in Collagen-I in einem neuen Collagen-I beschichteten Einsatz eingebettet und weiter kultiviert.

Um die Modelle haltbar zu machen und für spätere Versuche zu lagern wurden sie meist eingefroren. Das Lösen der TC erfolgte analog dem Passagierschritt.

Für die DNA/RNA-Analysen der Tumormodelle wurde der Überstand möglichst komplett entfernt und das Pellet im Kryoröhrchen eingefroren. Für die Zellkultur wurde der Überstand mit Kollagen-I entfernt und das Pellet mit 500 µL Medium (adv. DMEM/F12) resuspendiert. In einem Kryoröhrchen wurden 100 µL Dimethylsulfoxid (DMSO) und 1 mL Fetales Kälberserum (engl.: Fetal Bovine Serum) vorgelegt und anschließend die Gewebesuspension zugegeben. Die Zusätze verhindern, dass sich während des Einfriervorgangs Eiskristalle in den Zellen bilden, die zu Schädigungen derselben führen würden. Die Kryoröhrchen wurden in einem Behälter (Nalgene Cryo 1° Freezing Container) über 24 h zellschonend auf -80 °C heruntergekühlt und für einen längeren Lagerzeitraum in Flüssigstickstoff umgelagert.

2.10.3 Charakterisierung der Tumormodelle

Für die Charakterisierung der Modelle mittels IHC wurden der gesamte Einsatz mit dem eingebetteten Gewebe über Nacht in PFA fixiert. Das Netz wurde samt dem Kollagen und Gewebe vom restlichen Einsatz entfernt und in der Pathologie des RBK dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die Herstellung der Gewebeschnitte und die Färbemethode (EnVision) ist unter 2.3 und 2.8 genauer

beschrieben. Die Färbung erfolgte unter anderem mit den zuvor bereits verwendeten validierten Antikörpern gegen PD-L1, BTLA, hTIM3, CTLA4 und LAG3 durch einen medizinisch-technischen Mitarbeiter des IKP.

2.10.4 Zelltoxizitätsassay

Für die Untersuchung der Zelltoxizität von Nivolumab auf die TC wurde der CellTox Green Assay (Promega) benutzt [201]. Hierfür wurden die TC für eine Woche mit 10.2 mg/mL Nivolumab (PD-1) behandelt. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Die Zytotoxizität wurde mit dem CellTox™ Green Cytotoxicity Assay Kit gemessen. Es wird ein Cyanin-Farbstoff verwendet, der von lebensfähigen Zellen ausgeschlossen wird, aber bevorzugt die DNA der toten Zellen anfärbt, da das Enzym nur bei gestörter Membranintegrität nach intrazellulär gelangt. Wenn der Farbstoff die DNA in geschädigten Zellen bindet, werden die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs erheblich verstärkt. Lebensfähige Zellen erzeugen keinen nennenswerten Anstieg der Fluoreszenz. Daher ist das Fluoreszenzsignal, das durch die Bindung des Farbstoffs an die DNA der toten Zellen entsteht, proportional zur Zytotoxizität. Für den Assay wurden 200 µL des Mediums aus dem Well abgenommen und durch 200 µL Assay Medium mit 2 x konzentrierter Cell Tox Green Dye ersetzt. Nach 15 Min. Inkubation wurde mittels dem Cytation 1 Cell Imaging Multi-Mode Reader das gesamte Inlet im Brightfield- und Grün fluoreszierenden Protein (GFP)-Channel aufgenommen. Hierfür wurden die gesamten Vertiefungen abgebildet und anschließend vier Bilder alle 100 µm übereinander projiziert, da die Gewebestücke in unterschiedlichen Ebenen liegen. Mit der unbehandelten Kontrollgruppe wurde analog verfahren. Die GFP-Intensität wurde nach einer Hintergrundkorrektur auf die mit ImageJ, einem Bildverarbeitungsprogramm, bestimmte Fläche der Gewebestücke normalisiert. Daraufhin wurden die relativen Werte zur Kontrolle berechnet.

2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte anhand uni- und multivariater Analysen und multiplem Testen auf statistische Signifikanz und wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Winter, Biostatistiker am IKP Stuttgart, durchgeführt.

Eine Assoziation zwischen PD-L1-, BTLA- bzw. hTIM3-Expression im Tumorgewebe und klinisch-pathologischen Faktoren wurden mittels Kruskal-Wallis-Tests analysiert. Ebenso wurde der Zusammenhang zwischen PD-L1-, BTLA- bzw. hTIM3-Expression im Metastasengewebe und der Metastasenlokalisierung mit Kruskal-Wallis-Tests untersucht. Hierbei wurden Lokalisationen mit weniger als zehn Fällen als „Others“ zusammengefasst.

Chi-Quadrat-Tests wurden verwendet, um zu prüfen, ob Unterschiede in eingeteilten CTLA4- bzw. LAG3-Expressionsleveln zwischen den unterschiedlichen Metastasenlokalisierungen vorliegen. Für Tumor-Metastasen-Vergleiche wurde im Fall, dass Expressionswerte zu mehreren Metastasen eines Patienten vorlagen, jeweils diejenige Metastase ausgewählt, deren Expressionslevel am nächsten zum Expressionslevel des zugehörigen Tumors lag. Die Auswahl erfolgte dabei getrennt für PD-L1, BTLA, hTIM3, CTLA4 und LAG3, das heißt pro Protein wurden ggf. unterschiedliche Metastasen für den Vergleich ausgewählt und somit pro Protein und Patienten immer die minimale Expressions-Differenz zwischen Tumor und zugehörigen Metastasen betrachtet. Für PD-L1, BTLA und hTIM3 wurden diese Expressionsdifferenzen mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests analysiert.

Das Coxsche Regressionsmodell wurde verwendet, um den Zusammenhang zwischen Protein-Expression und Überlebenszeit-Endpunkten im Tumor- bzw. Metastasengewebe zu untersuchen. PD-L1-, BTLA- und hTIM3-Expressionslevel wurden dabei mittels kubischer Splines (= stückweise Polynome dritten Grades) modelliert und korrelierte Datenpunkte – für einen Teil der Patienten lagen Expressionswerte zu mehreren Metastasen vor – mit Hilfe eines sogenannten „generalised estimating equations“-Ansatzes berücksichtigt [202]. Als Endpunkt für Überlebenszeitanalysen wurde das tumorabhängige Überleben der Patienten gewählt. Als Anfangspunkt für die Berechnung des CSS wurde der OP-Zeitpunkt

festgelegt. Als statistischer Endpunkt wurde der zeitlich vermerkte Tod oder der Zeitpunkt des letzten FUP gewählt.

Für Fälle mit dokumentierter Systemtherapie vor der OP einer Metastase wurde mit einem gemischten linearen Modell untersucht, ob eine Assoziation zwischen der PD-L1-, BTLA- bzw. hTIM3-Expression im Metastasengewebe und der Wirkstoffklasse der systemischen Therapie bestand. Wirkstoffklassen bzw. -Kombinationen mit weniger als drei Fällen wurden dabei zusammengefasst. Weiterhin wurden im Hinblick auf die Normalverteilungsannahme des linearen Modells vorher eine sogenannten „normal score“- oder „rankit“-Transformation auf die Expressionslevels angewendet [203]. Dazu werden die Level zunächst in Ränge überführt, anschließend durch die Anzahl der Datenpunkte geteilt. Die Zeit zwischen Beginn der Therapie und OP-Datum wurde dabei in einem Ansatz als zusätzliche Variable im gemischten Modell berücksichtigt und ebenso der Interaktionsterm zwischen dieser Zeit und den Wirkstoffklassen. Der Zusammenhang zwischen Protein-Expression im Metastasengewebe und Anzahl genetischer Mutationen wurde mit Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests untersucht. Da hierbei nicht berücksichtigt wurde, dass Metastasen teilweise vom selben Patienten stammten, wurde zusätzlich eine Sensitivitätsanalyse per gemischtem linearen Modell unter Verwendung der „normal score“-Transformation durchgeführt.

Alle Tests waren zweiseitig und das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt. Wo angegeben wurden p-Werte mit der Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiples Testen korrigiert [204]. Zur statistischen Analyse wurde die Software R-4.0.0 [205] mit den zusätzlichen Paketen `beanplot_1.2` [206], `coin_1.4.-1` [207], and `rms_6.1.1` [208] verwendet.

2.12 Tabellarische Auflistung von verwendetem Material und Geräten

2.12.1 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete validierte Antikörper für Immunhistochemie (EN Vision Methode) und Verdünnungen.

Antikörper mit Chargenbezeichnung	Verdünnung mit PBS [μ L]	Ursprung	Target Retrieval Solution und Inkubation	Hersteller
PD-L1 Mouse mAB (405.9A11) #29122	1 : 50	Maus IgG α Mensch	pH 9 über Nacht bei 4 °C	Cell Signaling Technology, Inc., 3 Trask Lane, Danvers, MA, 01923, USA
CD272 (BTLA) Mouse Monoclonal Antibody (OT14C2) #TA505547	1 : 200	Maus IgG α Mensch	pH 6 30 Min. bei RT	OriGene Technologies Inc., 9620 Medical Center Drive, Suite 200 I Rockville, MD, 20850, USA
Human TIM-3 Antibody (polyklonal) (in lyophilisierter Form, zunächst mit 0,2 mg/mL in sterilem PBS angesetzt) #AF2365	1 : 200	Ziege IgG α Mensch	pH 6 30 Min. bei RT	R&D Systems, Inc., 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA
Pierce® Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) (polyklonaler Brückenantikörper #31105)	1 : 500	Hase IgG α Ziege	30 Min. bei RT	Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6 63303 Dreieich
PE anti-human CD152 (CTLA-4) Antibody (L3D10) #349902	1 : 100	Maus IgG α Mensch	pH 6 30 Min. bei RT	BioLegend®, 8999 BioLegend Way, San Diego, CA 92121, USA
IHC-plus™ Monoclonal Mouse anti-Human LAG3 (CD223) Antibody (17B4) #LS-B2237-50	1 : 100	Maus IgG α Mensch	pH 9 über Nacht bei 4 °C	LifeSpan BioSciences, Inc., 2401 4 th Ave Suite 900, Seattle, USA
CD8 alpha Monoclonal Antibody (C8/144B) #MA5-13473	1 : 500	Maus IgG α Mensch	pH 6 30 Min. bei RT	Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6 63303 Dreieich

2.12.2 Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits mit Inhalt.

Versuch	Kit	Inhalt	Hersteller
En Vision Methode	Dako REAL EnVision Detection System #K5007	<ul style="list-style-type: none"> • Dako REAL EnVision/HRP, Rabbit/Mouse (ENV) • Dako REAL Substrate Buffer • Dako REAL DAB+ Chromogen 	Agilent Technologies, Inc. Headquarters, 5301 Stevens Creek Blvd., Santa Clara, CA 95051, USA
DNA Isolierung	AllPrep DNA/RNA FFPE Kit #80234	<ul style="list-style-type: none"> • RNeasy® MinElute® Spin Columns (pink) 50 Stück (St.) • QIAamp® MinElute Spin Columns 50 St. • Collection Tubes (1.5 mL) 100 St. • Collection Tubes (2 mL) 200 St. • Buffer PKD 15 mL • Proteinase K 2 x 1.4 ml • Buffer RLT* 45 mL • Buffer FRN* (concentrate) 14 mL • Buffer RPE (concentrate) 11 mL • RNase-Free DNase I (lyophilized) 1500 units • Buffer RDD 2 x 2 mL • RNase-Free Water (for use with RNase-Free DNase I) 1.9 mL • Buffer ATL 14 mL • Buffer AL* 12 mL • Buffer AW1* (concentrate) 19 mL • Buffer AW2 (concentrate) 13 mL • Buffer ATE 20 mL • RNase-Free Water 10 mL Quick-Start Protocol 	Qiagen GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden
DNA Konzentrationsbestimmung	Qubit™ dsDNA BR Assay Kit # Q32853	<ul style="list-style-type: none"> • konzentriertes Assay-Reagenz • Verdünnungspuffer • vorverdünnte DNA-Standards 	Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6, 63303 Dreieich
	Qubit™ dsDNA HS Assay Kit #Q32854	<ul style="list-style-type: none"> • konzentriertes Assay-Reagenz • Verdünnungspuffer • vorverdünnte DNA-Standards 	
Next Generation Sequencing	Agilent NGS FFPE QC Kit	<ul style="list-style-type: none"> • 2x Brilliant III SYBR® Green QPCR Master Mix • Reference Dye, 1 mM • Primer Set A, 42 bp • Primer Set B, 123 bp • DNA Standard 1 (2500 pg/μL) • DNA Standard 2 (625 pg/μL) • DNA Standard 3 (156.25 pg/μL) • DNA Standard 4 (39.06 pg/μL) • DNA Standard 5 (9.77 pg/μL) Reference DNA 	Agilent Technologies, Inc. Headquarters, 5301 Stevens Creek Blvd., Santa Clara, CA 95051, USA

Versuch	Kit	Inhalt	Hersteller
Zytotoxizitätsassay	CellTox™ Green Dye, 1,000X #G8731	<ul style="list-style-type: none"> • Lysis Solution • Assay Buffer • CellTox™ Green Dye, 1,000 X 	Promega GmbH, Gutenbergring 10, 69190 Walldorf

2.12.3 Zellkulturmedium

Tabelle 7: Zellkulturmedium Patientenabgeleitete Air-Liquid-Interface Tumormodelle und Zusätze.

Inhaltsstoff	Hersteller	Initiale Konzentration	Finale Konzentration	Volumen (µL) für 10 mL
Adv. DMEM/F12 (#12634028)	Life Technologies GmbH / Gibco (#12634028)			9258
GlutaMAX™ Supplement (#35050038)		100 x	1 x	100
HEPES solution, 1 M, pH 7.0-7.6, sterilefiltered (#H0887-100ML)	SIGMA-ALDRICH®, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt	1 M	10 mM	100
Nicotinamide (#N0636-100G)		1 M	10 mM	100
N-acetyl cysteine*(NAC) (#A7250-5G)		1 M	1 mM	10
B-27™ Supplement (50 X), minus vitamin A (#12587010)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6 63303 Dreieich	50 x	1 x	200
Penicillin-Streptomycin (11548876)		10000 U/mL (100 x)	100 U/mL (1 x)	100
A83-01 (#2939)	Bio-Techne GmbH, Tocris, Borsigstraße 7a, 65205 Wiesbaden-Nordenstadt	1 mM	0.5 µM	5
Gastrin I (#1003377)	PeproTech GmbH, Forum Winterhude Winterhuder Marktplatz 6-7a, 22299 Hamburg	25 mM -> 1 : 1000 pre-dilution 25 µM	10 nM	4
SB202190 (#1523072)		10 mM in DMSO	10 µM	10
EGF (#AF-100-15)		1 mg/mL	50 ng/mL	0,5
Recombinant Human Noggin (#120-10C)		100 µg/mL	25 ng/mL	2,5
Recombinant Human IL-2 (#200-302)		30000 U/mL	600 units/mL	200
Recombinant Human R-Spondin-1 (#120-38)		100 µg/mL	100 ng/mL	10

Herstellung der Zusätze					
Material	Menge	Lösungs- mittel	Menge2	Finale Konzentration	Volumen Aliquots
R-Spondin-1	20 µg	Wasser	200 µL	100 µg/mL	25 µL
A 83-01	10 mg	DMSO	4,215 mL	1 mM	3 x 1 mL, 40 x 25 µL
FGF-10	50 µg	Wasser	50 µL	1 mg/mL	5 µL
EGF	1 mg	Wasser	10 mL	100 µg/mL	9 x 1 mL, 10 x 100 µL
NAC*	0,16319 g	Wasser	1 mL	1 M	
Noggin**	5 µg	H ₂ O, 0.1 % BSA in PBS	5 µL, 45 µL	100 µg/mL	5 µL
N-Acetyl-Cystein lösen*	0,16319 g Pulver einwiegen, in 1 ml H ₂ O lösen → 1 M Lösung				
Noggin lösen**	Vial zentrifugieren, 5 µg in 5 µL H ₂ O lösen, mit 45 µL 0,1 % BSA in PBS verdünnen, nicht vortexen!				

2.12.4 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 8: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.

Versuch	Reagenzien	Ggf. Zusammensetzung	Hersteller
HE- Schnitte herstellen	Neo-Clear #1.098.43.5000		Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
	Alkohol 70 % #2202.1000		CHEMSOLUTE®, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Dornierstr. 4 – 6, 71272 Renningen
	Alkohol 96 % #ETO-1000-96-1		SAV Liquid Production GmbH, Hochriesstraße 2, 83126 Flintsbach am Inn, Austria
	Alkohol 99 % #ETO-1000-99-1		SAV Liquid Production GmbH, Hochriesstraße 2, 83126 Flintsbach am Inn, Austria
	Papanicolaou's solution 1a Harris' hematoxylin solution #1.09253.0500		Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
	Shandon Eosin Y Alcoholic		Thermo Fisher Scientific GmbH Im Steingrund 4-6, 63303 Dreieich
	Neo-Mount® #1.09016.0500		Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
	RNAse AWAY #7000		Molecular bio products, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
	Ethanol 100 % #BP2818-500		Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6 63303 Dreieich
	AllPrep DNA/RNA FFPE Kit #80234	s. Tab. 6	Qiagen GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden
EN Vision Methode	Neo-Clear #1.098.43.5000		Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt

Versuch	Reagenzien	Ggf. Zusammensetzung	Hersteller
EN Vision Methode	Alkohol 70 % #2202.1000		CHEMSOLUTE®, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Dornierstr. 4-6, 71272 Renningen
	Alkohol 96 % #ETO-1000-96-1		SAV Liquid Production GmbH, Hochriesstraße 2, 83126 Flintsbach am Inn, Austria
	Alkohol 99 % #ETO-1000-99-1		SAV Liquid Production GmbH, Hochriesstraße 2, 83126 Flintsbach am Inn, Austria
	Tris Buffered Saline + 0,1 % Tween (TBS-T-Puffer)	NaCl 160 g [1,369 M]	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
		KCl 4 g [0,027 M]	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
		Tris-Base 6,772 g	Carl-Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe
		Tris-HCL 70 g [0,25 M]	Carl-Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe, Germany
		H2O-milliQ ad. 2000 mL	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
	Target Retrieval Solution, Concentrate pH 6 #S169984-2, pH 9 #S236784-2		Agilent Technologies, Inc. Headquarters, 5301 Stevens Creek Blvd., Santa Clara, CA 95051, USA
	Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution #S2023		Agilent Technologies, Inc. Headquarters, 5301 Stevens Creek Blvd., Santa Clara, CA 95051, USA
	Dako REAL EnVision Detection System	s. Tab. 6	
Papanicolaou's solution 1a Harris' hematoxylin solution #1.09253.0500		Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt	
Neo-Mount® #1.09016.0500		Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt	
Zellkultur	Isopropanol 70 % BIOCIDÉ #1150-1L		CHEMSOLUTE®, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Dornierstr.4-6, 71272 Renningen
	PBS Bio Whittaker® # 17516F		Lonza Group Ltd, Muenchensteinerstraße 38, 4002 Basel, Switzerland
	Übergangsmedium Advanced DMEM/F12 #12634028		Gibco, Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6 63303 Dreieich
ALI TC	ALI TC Medium	s. Tab. 7	
	Albuminlösung (Coating) #A8412		SIGMA-ALDRICH®, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt

Versuch	Reagenzien	Ggf. Zusammensetzung	Hersteller
ALI TC	Formalin (Roti®-Histofix 4 %)		Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe
	Kollagen-I	- Kollagen I, 10 x Ham's F12 und Rekonstitutionspuffer auf Eis im Verhältnis 8 : 1 : 1 - Rekonstitutionspuffer: 0,55 g NaHCO ₃ in 25 mL 0,05 N NaOH und 200 mM HEPES (steril filtriert)	Kollagen: Bio-Techne, 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA 10x Ham's F12: SIGMA-ALDRICH®, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
	Primocin	Stammlösung 1 : 5000 in ADMEM	Cayla Invivogen, 5, rue Jean Rodier F-31400 Toulouse, France
	EDTA		Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe
	Kollagenase-IV		SIGMA-ALDRICH®, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt

2.12.5 Arbeitsgeräte

Tabelle 9: Verwendete Arbeitsgeräte.

Versuch	Gerät	Hersteller
Herstellung HE-Schnitte	Mikrotom RM2255	Leica Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Straße 17-37, 35578 Wetzlar
	Wasserbad WB1000	pfm medical ag, Wankelstraße 60, 50996 Köln
	Kühlschrank -20 °C	Robert Bosch GmbH, Robert-Bosch-Platz 1, 70839 Gerlingen-Schillerhöhe
	Wärmeschrank 56 °C HERATHERM Incubator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6, 63303 Dreieich
	Slide Scanner Olympus VS120-S5 V2.9 (BX61VS)	OLYMPUS EUROPA SE & CO. KG, Amsinckstraße 63, 20097 Hamburg
EN Vision Methode	Mikrotom RM2255	Leica Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Straße 17-37, 35578 Wetzlar
	Wärmeschrank 56 °C HERATHERM Incubator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6, 63303 Dreieich
	Dampfgarer DGS855	ROMMELSBACHER, Elektro Hausgeräte GmbH, Rudolf-Schmidt-Str. 18, 91550 Dinkelbühl
	Swip Laborschüttler	Edmund Bühler GmbH Schindächerstraße 8, 72411 Bodelshausen
DNA Isolierung	Mikrotom RM2255	Leica Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Straße 17-37, 35578 Wetzlar
	Wasserbad WB1000	pfm medical ag, Wankelstraße 60, 50996 Köln
	Kühlschrank -20 °C	Robert Bosch GmbH, Robert-Bosch-Platz 1, 70839 Gerlingen-Schillerhöhe

Versuch	Gerät	Hersteller
DNA Isolierung	Thermomixer compact	Eppendorf, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., 80 Orville Drive, Suite 102 Bohemia, New York, 11716, USA
	Centrifuge 5424R	Eppendorf, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
	Eisschrank -80 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Hans-Liebherr-Straße 45, 88400 Biberach an der Riß
	Pipet-Lite XLS RAININ	Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, 35396 Gießen
	R906 Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	peQlab Biotechnologie GmbH, Carl-Thiersch-Str. 2b, 91052 Erlangen, Bayern
DNA Konzentrationsmessung	Qubit Fluorometric Quantification	Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6, 63303 Dreieich
Zellkultur	Sicherheitswerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Pfullinger Str. 57, 72820 Sonnenbühl
	Pipet-Lite XLS RAININ	Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, 35396 Gießen
	PIPETBOY2	INTEGRA Biosciences GmbH, An der Amtmannsmühle 1, 35444 Biebertal
	Wasserbad 13A	JULABO GmbH, Gerhard-Juchheim-Straße 1, 77960 Seelbach
	HERAEUS MEGAFUGE 16R centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Thermo Electron LED GmbH, Im Steingrund 4-6 63303 Dreieich
	Centrifuge 5424	Eppendorf, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
	Wärmeschrank Galaxy 170S	New Brunswick, Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6, 63303 Dreieich
	Eisschrank -20 °C	Robert Bosch GmbH, Robert-Bosch-Platz 1, 70839 Gerlingen-Schillerhöhe
	Kühlschrank 4 °C	Labstar Sanguis, National Lab GmbH, Kälte- und Temperiertechnik, Grambeker Weg 157, 23879 Mölln
	Corning® Coolcell® Containers	Corning Incorporated, 1 Riverfront Plaza Corning, NY 14831, USA
Cell Imaging	Cytation1 Cell Imaging Multi-Mode Reader	BioTek, part of Agilent, 100 Tigan Street Winooski, VT 05404, USA

2.12.6 Einwegmaterial

Tabelle 10: Verwendetes Einwegmaterial.

Versuch	Material	Hersteller
Herstellung HE-Schnitte	Objektträger Superfrost #10149870	R. Langenbrinck GmbH, Im Hausgrün13, 79312 Emmendingen
	FEATHER® Microtome Blades Type A35 # 207500011	pfm medical ag, Wankelstraße 60 50996 Köln
	Färbewannen Chem Mate™ Incubation Container	Dako Deutschland GmbH, Stresemannstraße 161, 22769 Hamburg
	Filterpapiere MN 615 ¼, Ø 185 mm # 531018	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Neumann-Neander-Str. 6–8, 52355 Düren
	Deckgläser 24 x 60 mm # 630-2864	VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, 64295 Darmstadt
EN Vision Methode	Objektträger Superfrost	R. Langenbrinck GmbH, Im Hausgrün13, 79312 Emmendingen
	FEATHER® Microtome Blades Type A35	pfm medical ag, Wankelstraße 60 50996 Köln
	Deckgläser 24 x 60 mm	VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, 64295 Darmstadt
	Filterpapiere MN 615 ¼, Ø 185 mm	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Neumann-Neander-Str. 6-8, 52355 Düren
	Transferpipetten 3,5 mL für Eindeckmedium #86.1171.001	SARSTEDT AG & Co. KG, Sarstedtstraße 1, 51588 Nürnberg
RNA/DNA Isolierung	Objektträger Superfrost #10149870	R. Langenbrinck GmbH, Im Hausgrün13, 79312 Emmendingen
	FEATHER® Microtome Blades Type A35 # 207500011	pfm medical ag, Wankelstraße 60 50996 Köln
	DNA LoBind® Tube 0,5 mL #0030108035, 1,5 mL #0030108051 und 2 mL #0030108078	Eppendorf, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
	Safe Lock Tubes 2.0 mL PCR clean	Eppendorf, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
	RAININ Pipettenspitzen 10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL Bio Clean Ultra™ Filter Sterilized	Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, 35396 Gießen
	AllPrep DNA/RNA FFPE Kit #80234	Qiagen GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden
	Qubit™ Assay Tubes 500 µL #Q32856	Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6, 63303 Dreieich
Zellkultur	Petrischale TC-Schale100, Standard #83.3902	SARSTEDT AG & Co. KG, Sarstedtstraße 1, 51588 Nürnberg
	B Braun™ Cutoff™ Skalpelle aus Edelstahl #10180381	B. Braun Melsungen KGaA, Carl-Braun Straße 1, 34212 Melsungen
	Safe Lock Tubes 1.5 mL #0030120086	Eppendorf, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
	Falcon mit und ohne Standrand 15 mL #Greiner Bio-One™ 188271 und	Greiner Bio-One GmbH, Maybachstraße 2, 72636 Frickenhausen

Versuch	Material	Hersteller
Zellkultur	50 mL #Greiner Bio-One™ 210261 Cellstar® tubes	
	RAININ Pipettenspitzen Filter Sterilized 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, 35396 Gießen
	Serologische Pipettenspitzen Stripette® 5 mL #4051, 10 mL #4101, 25 mL #4251	costar® Corning Incorporated, 1 Riverfront Plaza, Corning, NY 14831, USA
	Corning™ Costar™ Zellkulturplatten mit flachen Böden, 24-Wellplatten #10377841	costar® Corning Incorporated, 1 Riverfront Plaza, Corning, NY 14831, USA
	Millicell-Zellkultureinsatz, 12 mm, hydrophiles PTFE, 0,4 µm (Insert) #PICM01250	Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6, 63303 Dreieich
	RAININ Pipettenspitzen BioClean Ultra™, Wide-O, LR, Filter Sterilized 200 µL, 1000 µL	Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, 35396 Gießen

2.12.7 Software

Tabelle 11: Verwendete Software.

Verwendete Software	Hersteller
Microsoft Office	Microsoft Corporation, One Microsoft Way, Redmond, WA 98052-6399, USA
Olympus VS-ASW 2.9	OLYMPUS EUROPA SE & CO. KG, Wendenstraße 20, 20097 Hamburg
OlyVIA Image Viewer 2.9	
Tissue Studio® v.4.4.3	Definiens AG, Bernhard-Wicki-Straße 5, 80636 München
ImageJ	Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Statisik	s. 2.11

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkohorte

Die klinisch-pathologischen Merkmale des Patientenkollektivs wurden in Tab. 12 zusammengestellt und werden im Folgenden zu Übersichtszwecken nicht alle nochmals detailliert aufgeführt. Die n = 230 untersuchten Metastasen wurden nach Organsystemen eingruppiert (Knochen n = 26, Lokalrezidiv n = 19, Lunge n = 54, Lymphknoten n = 34, Nebenniere n = 18, Weichgewebe n = 16, andere seltene zusammengefasst n = 63; hierunter zählen bspw. Blase, Hoden, Vagina, Dünndarm, Magen, Pankreas, Leber, Milz, Mesenterium, Peritoneum, Bauchwand, Parotis, Larynx, Trachea, Pleura, Zwerchfell, Thoraxwand, Haut, Hirn, Schilddrüse, Vena cava, Muskulatur, Nerven).

Tabelle 12: Patientenkohorte mit detaillierten klinisch-pathologischen Charakteristika.

Erklärungen zu Tabelle 12: T = Primärtumor, N = regionale Lymphknotenmetastasen, M = Fernmetastasen G = Grading, na = keine Angabe/unbekannt.

Merkmale der Patienten und Primärtumoren (n = 111)	Niveaus/ zusammenfassende Statistik	Anzahl	Prozent (%)
Geschlecht	männlich	85	77
	weiblich	26	23
Alter (Jahre) bei der Diagnose des primären RCC	Median (Range)	61.3 (29.3-79.0)	
T	1	32	29
	2	14	13
	3	51	46
	4	5	4
	na	9	8
N	0	89	80
	1	14	13
	na	8	7
M	0	73	66
	1	31	28
	na	7	6
G	1	10	9
	1 oder 2	1	1
	2	55	49
	3	32	29
	3 oder 4	1	1
na	12	11	
Follow-up Zeitraum (Jahre) ab dem Datum der Erstdiagnose eines ccRCC	Median (Range)	7.2 (0.3-30.4)	
Krebsbedingter Tod	nein	35	32
	ja	70	63
	na	6	5

Merkmale der Patienten und Primärtumoren (n = 111)	Niveaus/ zusammenfassende Statistik	Anzahl	Prozent (%)
Gesamtüberleben	lebend	36	32
	verstorben	73	66
	na	2	2
Metastasierung	metachron	77	69
	synchron	34	31
Subtyp	ccRCC	101	91
	ccRCC/papRCC	1	1
	papRCC	6	5
	chrRCC	2	2
	na	1	1
Merkmale der Probe von Metastasen/Lokalrezidiven (n = 230)	Niveaus/ zusammenfassende Statistik	Anzahl	Prozent %
Metastasierungsort	Organ		
	Knochen	26	11
	Lokalrezidiv (Niere)	19	8
	Lunge	54	24
	Lymphknoten	34	15
	Nebenniere	18	8
	Seltene Lokalisation/ andere	63	27
	Weichgewebe	16	7
Alter (Jahre) bei Metastasenresektion	Median (Range)	66.0 (31.7-85.4)	
Jahre ab Diagnose des primären RCC bis zur Metastasenresektion	Median (Range)	2.9 (0-26.3)	
Follow-up Zeitraum (Jahre) ab dem Datum der Metastasenresektion	Median (Range)	3.52 (0.03-13.86)	
Systemtherapie vor Metastasenresektion	nein	121	45
	ja	49	28
	unbekannt	60	27

Die Histologie der Primärtumoren (n = 111) sowie deren Zuordnung zur Histologie des Metastasengewebes lässt sich Tab. 13 entnehmen.

Tabelle 13: Zuordnung Histologie Primärtumor vs. Histologie Metastasen.

Links ist die Histologie der Primärtumoren vs. rechts die Anzahl der Metastasen zur Histologie zu den entsprechenden Primärtumoren aufgetragen. (keine Angabe = na).

		Histologie Metastase					
		ccRCC	ccRCC/ papRCC	ccRCC+ sarkomatoid	papRCC	chrRCC	na
Histologie Tumor	ccRCC	183	1	1	0	0	25
	ccRCC/ papRCC	5	0	0	0	0	0
	papRCC	1	0	0	9	0	0
	chrRCC	0	0	0	0	4	0
	na	1	0	0	0	0	0

3.2 Proteinexpression

Es wurden n = 111 Primärtumoren (n = 101 ccRCC, n = 6 papRCC, n = 2 chrRCC, n = 1 Mischtyp, n = 1 nicht klassifizierbar) sowie n = 230 Metastasen (FFPE) von n = 111 Patienten untersucht. Bei n = 59 Patienten lag Primärtumor- und korrespondierendes Metastasengewebe, bei n = 51 Patienten lag Material aus mehreren Metastasen unterschiedlicher Lokalisation für die Analysen vor.

3.3 Resultate der standardisierten Software-Auswertung

Die Proteinexpression für die untersuchten Proteine PD-L1, BTLA und hTIM3 im Nierentumorgewebe wurde mit der Bildanalyse-Software Tissue Studio® v.4.4.3 (Definiens AG) bewertet. Das genaue Vorgehen wurde im Material- und Methodikteil dargestellt. Für die Quantifizierung der Proteinexpression wurde der ScoreTS berechnet.

3.3.1 Evaluation der Proteinexpression von PD-L1

PD-L1 war membranös entweder schwach, mittel oder stark in den Tumorstanzen angefärbt (s. Abb. 3).

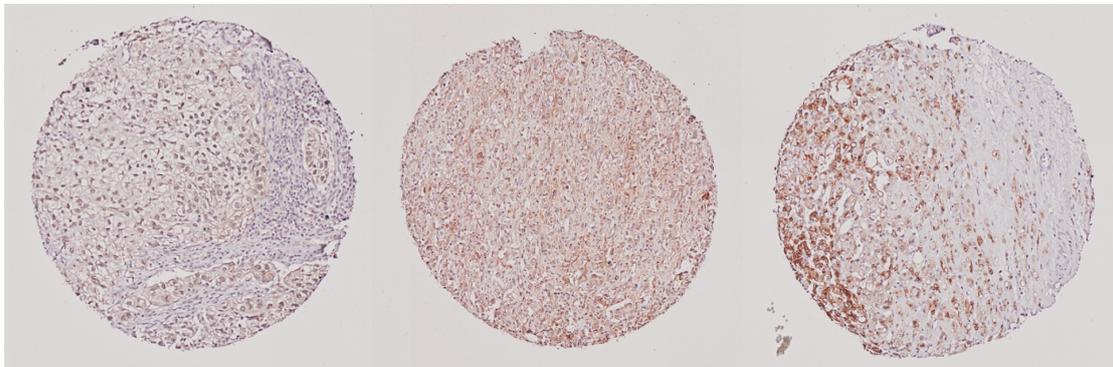


Abbildung 3: Gewebestanzten mit unterschiedlich starker PD-L1 Färbung.

Von links nach rechts je eine beispielhafte Gewebestanze für schwache, mittlere und starke Proteinexpression von PD-L1.

Die folgende Darstellung zeigt beispielhafte Auswertungen der Proteinexpression von PD-L1 (s. Abb. 4). Den Zellen wurde abhängig von der Färbestärke eine unterschiedliche Farbe zugeteilt, die sich der untenstehenden Grafik entnehmen lässt.

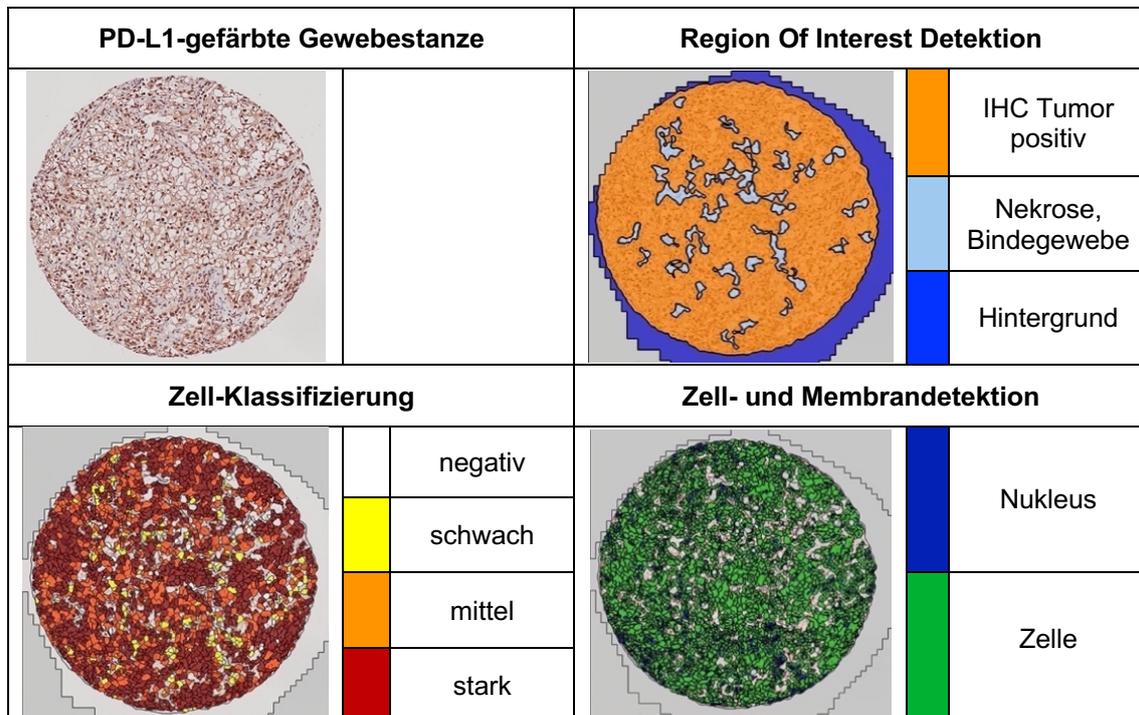


Abbildung 4: Auswertung der Proteinexpression von PD-L1 mit der Software Tissue Studio® (Definiens AG).

Screenshots der ausgeführten Analysen "Nuclei, Membranes and Cells" mit den Funktionen "ROI detection, nucleus and membrane detection, and cell classification" bei einer beispielhaften Tumorstanze. Das immunhistochemisch gefärbte Ausgangsbild für die Analyse steht in der oberen Reihe und kann mit der Softwareanalyse verglichen werden.

PD-L1 war laut Wilcoxon-Test im Metastasengewebe (Mittelwert: 0,6; Median: 0,34; Range: 0-2,68) unabhängig von der Lokalisation signifikant höher exprimiert als im Primärtumorgewebe (Mittelwert: 0,25; Median: 0,17; Range: 0-0,97; $p = 0,0011$). Primärtumoren und Metastasen wurden direkt gepaart (Mittelwert: (-) 0,35; Median: (-) 0,09; Range: (-) 2,61-0,77). Für $n = 1$ Patienten lagen $n = 2$ Gewebeproben aus unterschiedlichen Tumorregionen vor, deren Expressionswerte für die Berechnungen gemittelt wurden, was in der Folge $n = 58$ Patienten für die Analyse ergibt. Der zugehörige Beanplot lässt sich der nachfolgenden Abb. 5 entnehmen.

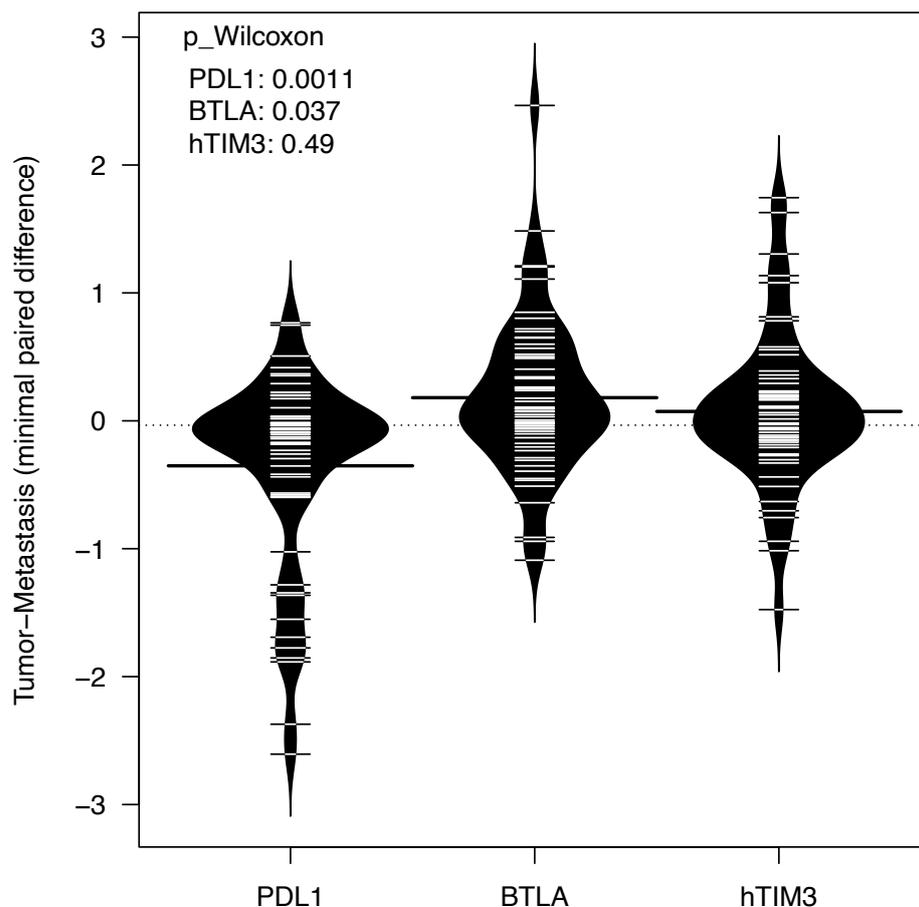


Abbildung 5: Expression von PD-L1, BTLA und hTIM3 im Metastasen- vs. Primärtumorgewebe (n = 59).

Die Proteinexpressionen von PD-L1, BTLA und hTIM3 im Metastasen- vs. Primärtumorgewebe sind auf der x-Achse aufgetragen. Dargestellt ist die minimale Differenz zwischen Tumor und zugeordneten Metastasen. Bei Patienten mit mehreren Metastasen ging jeweils diejenige Metastase in die Berechnung ein, deren Wert am nächsten zum Wert im Tumorgewebe lag. Die Auswahl der Metastasen unterschied sich somit je nach betrachteter Variablen (PD-L1, BTLA, hTIM3). Der Expressionswert wurde jeweils mit dem ScoreTS berechnet. Die Ausdehnung der Beanplots entspricht der Range. Die gestrichelte Linie entspricht dem Mittelwert über alle Gruppen. Die durchgezogene schwarze Linie markiert den Mittelwert des Unterschieds zwischen den beiden mit dem Wilcoxon-Test verglichenen Gruppen. Je weiter dieser Wert von 0 entfernt ist, desto größer ist der Unterschied in der Proteinexpression zwischen den beiden Gruppen. Ein positiver Wert bedeutet, dass die Expression in der ersten Gruppe (Primärtumoren) höher war als in der zweiten Gruppe (Metastasen). Dies gilt für BTLA und hTIM3. Die Proteine waren im Primärtumor höher exprimiert als im Metastasengewebe. BTLA war signifikant höher im Primärtumor vs. Metastasengewebe exprimiert. Der Unterschied für hTIM3 war nicht statistisch signifikant. Umgekehrt bedeutet ein negativer Wert, dass die Proteinexpression in der zweiten Gruppe (Metastasen) höher war als in der ersten Gruppe (Primärtumor). PD-L1 war in Metastasen statistisch signifikant höher exprimiert als in korrespondierendem Primärtumorgewebe ($p = 0,0011$).

Die Kruskal-Wallis-Tests für die Proteinexpression im Metastasengewebe (n = 224) je nach Organ haben für PD-L1 keinen statistisch signifikanten Unterschied gezeigt ($p = 0,22$). Die Analysen bezogen sich auf alle häufigen

Lokalisationen. Eingeflossen sind hier Metastasen aus Knochen (n = 26; Mittelwert: 0,74; Median: 0,68; Range: 0,02-2,06) , Lokalrezidive (n = 19; Mittelwert: 0,79; Median: 0,41; Range: 0,08-2,58), Lungenmetastasen (n = 54; Mittelwert: 0,86; Median: 0,57; Range: 0,04-2,76), Lymphknotenmetastasen (n = 32; Mittelwert: 0,85; Median: 0,48; Range: 0,06-2,92), Nebennierenmetastasen (n = 16; Mittelwert: 0,95; Median: 0,60; Range: 0,03-2,51) und Metastasen des Weichgewebes (n = 16; Mittelwert: 0,88; Median: 0,58; Range: 0,03-2,77). Seltene Lokalisationen, die in der Analyse als „other“ (n = 61; Mittelwert: 0,89; Median: 0,53; Range: 0-2,68) zusammengefasst wurden, wurden in der Berechnung nicht berücksichtigt. Die zugehörigen Beanplots lassen sich der untenstehenden Abb. 6 entnehmen.

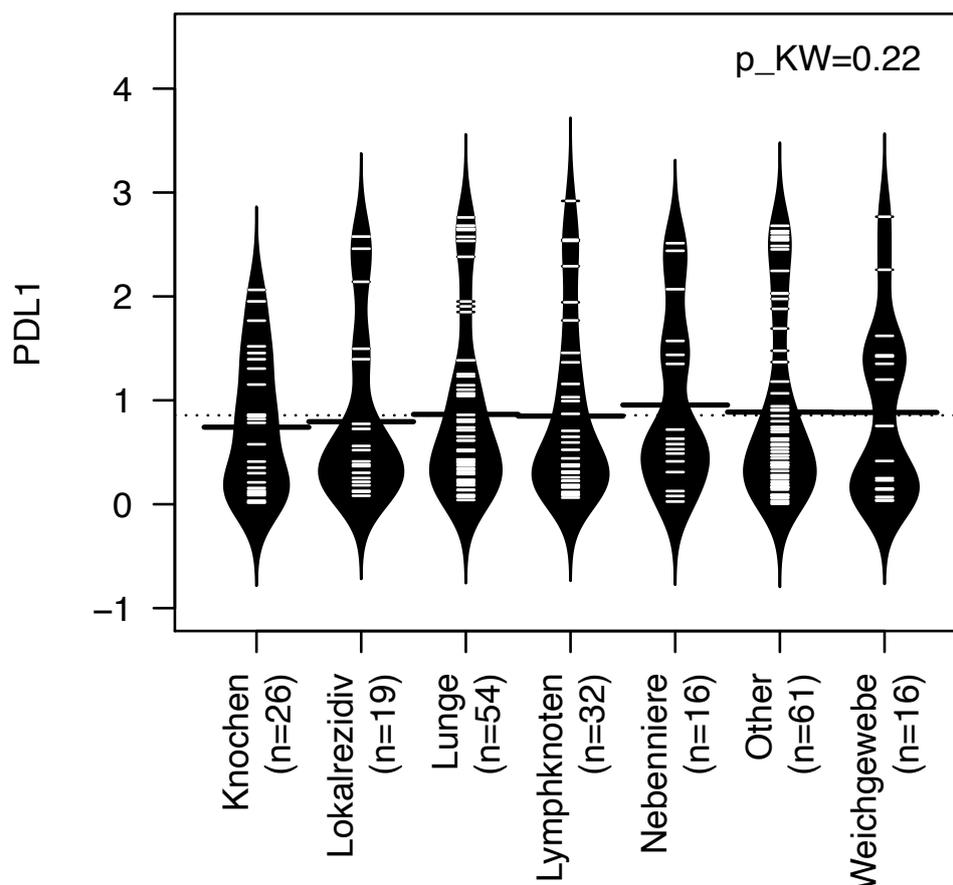


Abbildung 6: PD-L1-Expression im Metastasengewebe je nach Lokalisation.

Die Proteinexpression von PD-L1 wurde nach Organsystemen gegliedert, die auf der x-Achse aufgetragen sind. Der Expressionswert wurde mit dem ScoreTS berechnet. Der Wert lässt sich der y-Achse des Diagrammes entnehmen. Die Ausdehnung des jeweiligen Beanplots entspricht der Range. Die gestrichelte Linie entspricht dem Mittelwert der Expression über alle Gruppen. Die durchgezogene Linie entspricht dem Mittelwert je Gruppe.

3.3.2 Evaluation der Proteinexpression von BTLA

BTLA war in den Tumorstanzen entweder schwach, mittel oder stark membranös angefärbt (s. Abb. 7). Den Zellen wurde abhängig von der Färbestärke eine Farbe zugeteilt, die sich der nachfolgenden Abb. 8 entnehmen lässt.

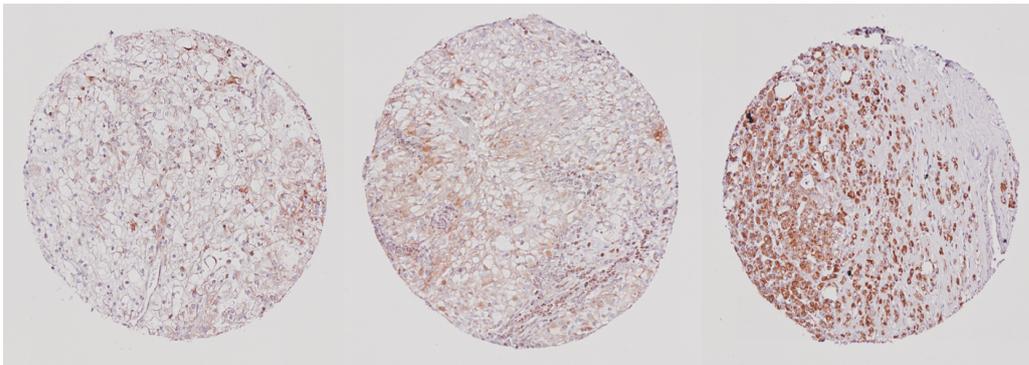


Abbildung 7: Gewebestanzes mit unterschiedlich starker BTLA Färbung.

Von links nach rechts je eine beispielhafte Gewebestanze für schwache, mittlere und starke Proteinexpression von BTLA mit entsprechender Färbeintensität.

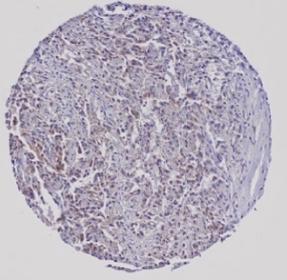
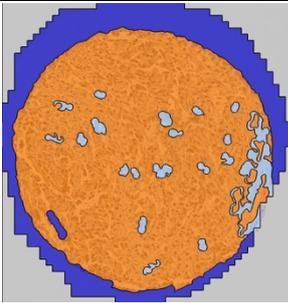
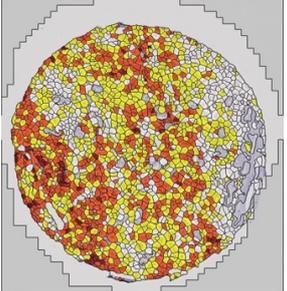
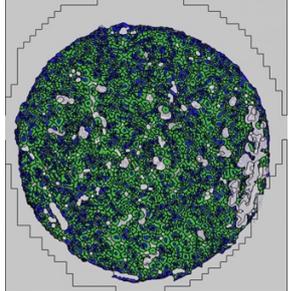
BTLA-gefärbte Gewebestanze		Region Of Interest Detektion													
			<table border="1"> <tr> <td></td> <td>IHC Tumor positiv</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Nekrose, Bindegewebe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Hintergrund</td> </tr> </table>		IHC Tumor positiv		Nekrose, Bindegewebe		Hintergrund						
	IHC Tumor positiv														
	Nekrose, Bindegewebe														
	Hintergrund														
Zell-Klassifizierung		Zell- und Membrandetektion													
	<table border="1"> <tr> <td></td> <td>negativ</td> </tr> <tr> <td></td> <td>schwach</td> </tr> <tr> <td></td> <td>mittel</td> </tr> <tr> <td></td> <td>stark</td> </tr> </table>		negativ		schwach		mittel		stark		<table border="1"> <tr> <td></td> <td>Nukleus</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Zelle</td> </tr> </table>		Nukleus		Zelle
	negativ														
	schwach														
	mittel														
	stark														
	Nukleus														
	Zelle														

Abbildung 8: Auswertung der Proteinexpression von BTLA mit der Software Tissue Studio® (Definiens AG).

Screenshots der ausgeführten Analysen "Nuclei, Membranes and Cells" mit den Funktionen "ROI detection, nucleus and membrane detection, and cell classification" bei einer beispielhaften Tumorstanze. Das immunhistochemisch gefärbte Ausgangsbild für die Analyse steht in der oberen Reihe und kann mit der Softwareanalyse verglichen werden.

Der Vergleich der Proteinexpression zwischen Primärtumor und zugehörigem Metastasengewebe (n = 59) hat für BTLA eine höhere Expression im Primärtumor (Mittelwert: 0,96; Median: 0,7; Range: 0,11-2,86) als im Metastasengewebe (Mittelwert: 0,78; Median: 0,64; Range: 0,02-2,26) gezeigt. Primärtumor und Metastase wurden direkt gepaart. Für n = 1 Patienten lagen n = 2 Gewebeproben aus unterschiedlichen Tumorregionen vor, deren Expressionswerte für die Berechnungen gemittelt wurden, was in der Folge n = 58 Patienten für die Analyse ergibt. Der Unterschied (Mittelwert: 0,18; Median: 0,09; Range: (-) 1,09-2,47) war nach dem Wilcoxon-Test statistisch signifikant ($p = 0,037$). Der zugehörige Beanplot lässt sich obenstehender Abb. 5 entnehmen.

Die Kruskal-Wallis-Tests für die unterschiedlich starke Proteinexpression im Metastasengewebe (n = 217) je nach Organ ergaben, dass BTLA am höchsten in Lokalrezidiven (n = 18; Mittelwert: 1,29; Median: 1,54; Range: 0,09-2,26), Lymphknoten (n = 32; Mittelwert: 1,02; Median: 0,85; Range: 0,02-2,84) und der Nebenniere (n = 17; Mittelwert: 0,93; Median: 0,70; Range: 0,18-1,91) exprimiert war. In Lunge (n = 53; Mittelwert: 0,54; Median: 0,37; Range: 0,05-2,11) und Knochen (n = 24; Mittelwert: 0,53; Median: 0,45; Range: 0,18-1,12) zeigte sich im Vergleich hierzu eine signifikant niedrigere Expression ($p = 0,028$). Für Metastasen des Weichgewebes (n = 14; Mittelwert: 0,54; Median: 0,46; Range: 0,13-2,03) ergab sich kein signifikanter Unterschied für die BTLA-Expression. Die Analysen bezogen sich auf alle häufigen Lokalisationen. Seltene Lokalisationen, die in der Analyse als „other“ (n = 59; Mittelwert: 0,59; Median: 0,42; Range: 0,02-2,22) zusammengefasst wurden, wurden in der Berechnung nicht berücksichtigt. Die zugehörigen Beanplots lassen sich der untenstehenden Abb. 9 entnehmen.

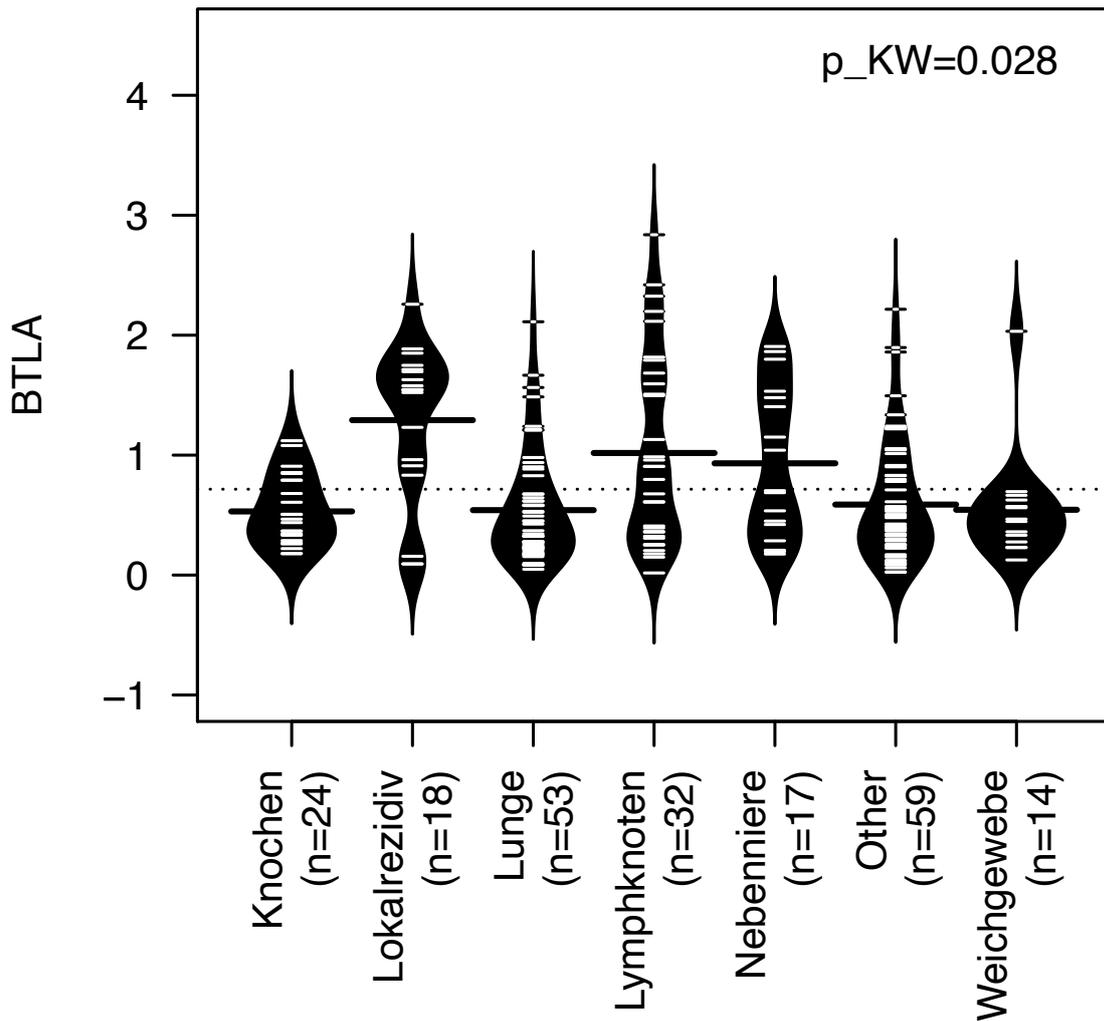


Abbildung 9: BTLA-Expression im Metastasengewebe je nach Lokalisation.

Die Proteinexpression von BTLA wurde nach Organsystemen gegliedert, die auf der x-Achse aufgetragen sind. Der Expressionswert wurde mit dem ScoreTS berechnet. Der Wert lässt sich der y-Achse des Diagrammes entnehmen. Die Ausdehnung des jeweiligen Beanplots entspricht der Range. Die gestrichelte Linie entspricht dem Mittelwert der Expression über alle Gruppen. Die durchgezogene Linie entspricht dem Mittelwert je Gruppe.

3.3.3 Evaluation der Proteinexpression von hTIM3

hTIM3 war analog in den Tumorstanzen membranös entweder schwach, mittel oder stark angefärbt (s. Abb. 10). Den Zellen wurde abhängig von der Färbestärke eine unterschiedliche Farbe zugeteilt, die sich der nachfolgenden Abb. 11 entnehmen lässt.

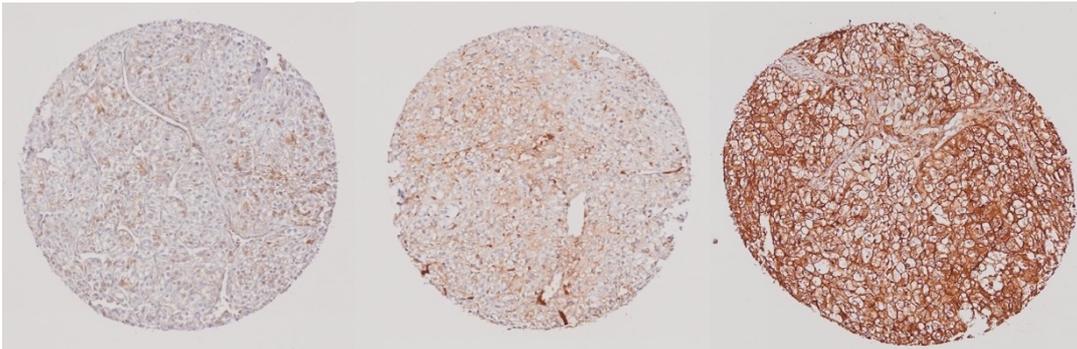


Abbildung 10: Gewebestansen mit unterschiedlich starker hTIM3 Färbung. Von links nach rechts je eine beispielhafte Gewebestanze für schwache, mittlere und starke Proteinexpression von hTIM3 mit entsprechender Färbeintensität.

hTIM3-gefärbte Gewebestanze		Region Of Interest Detektion	
			<ul style="list-style-type: none"> IHC Tumor positiv Nekrose, Bindegewebe Hintergrund
Zell-Klassifizierung		Zell- und Membrandetektion	
	<ul style="list-style-type: none"> negativ schwach mittel stark 		<ul style="list-style-type: none"> Nukleus Zelle

Abbildung 11: Auswertung der Proteinexpression von hTIM3 mit der Software Tissue Studio® (Definiens AG).

Screenshots der ausgeführten Analysen "Nuclei, Membranes and Cells" mit den Funktionen "ROI detection, nucleus and membrane detection, and cell classification" bei einer beispielhaften Tumorstanze. Das immunhistochemisch gefärbte Ausgangsbild für die Analyse steht in der oberen Reihe und kann mit der Softwareanalyse verglichen werden.

Der Vergleich der Proteinexpression zwischen Primärtumor und zugehörigem Metastasengewebe (n = 59) hat für hTIM3 mit dem Wilcoxon-Test keinen signifikanten Unterschied (Mittelwert: 0,07; Median: 0,01; Range: (-) 1,48-1,74) ergeben (p = 0,49). HTIM3 war in den Primärtumoren höher exprimiert (Mittelwert: 1,29; Median: 1,29; Range: 0,4-2,85) als in den Metastasen (Mittelwert: 1,22; Median: 1,14; Range: 0,4-2,85). Primärtumoren und Metastasen wurden wieder direkt gepaart. Für n = 1 Patienten lagen n = 2 Gewebeproben aus unterschiedlichen Tumorregionen vor, deren Expressionswerte für die Berechnungen gemittelt wurden, was in der Folge n = 58 Patienten für die Analyse ergibt. Der zugehörige Beanplot lässt sich obenstehender Abb. 5 entnehmen.

Die Kruskal-Wallis-Tests für die Proteinexpression im Metastasengewebe (n = 201) je nach Organ haben für hTIM3 keinen signifikanten Unterschied gezeigt (p = 0,14). Die Analysen bezogen sich auf alle häufigen Lokalisationen. Eingeflossen sind Metastasen aus Knochen (n = 21; Mittelwert: 0,82; Median: 0,74; Range: 0,34-1,86), Lokalrezidive (n = 15; Mittelwert: 1,41; Median: 1,50; Range: 0,47-2,39), Lungenmetastasen (n = 49; Mittelwert: 1,11; Median: 0,97; Range: 0,42-2,52), Lymphknotenmetastasen (n = 31; Mittelwert: 1,13; Median: 1,07; Range: 0,28-2,08), Nebennierenmetastasen (n = 16; Mittelwert: 0,98; Median: 0,96; Range: 0,44-1,59) und Metastasen des Weichgewebes (n = 12; Mittelwert: 1,04; Median: 1,02; Range: 0,40-2,47). Seltene Lokalisationen, die in der Analyse als „other“ (n = 57; Mittelwert: 1,14; Median: 1,15; Range: 0,29-2,57) zusammengefasst wurden, wurden in der Berechnung nicht berücksichtigt. Die zugehörigen Beanplots lassen sich der untenstehenden Abb. 12 entnehmen.

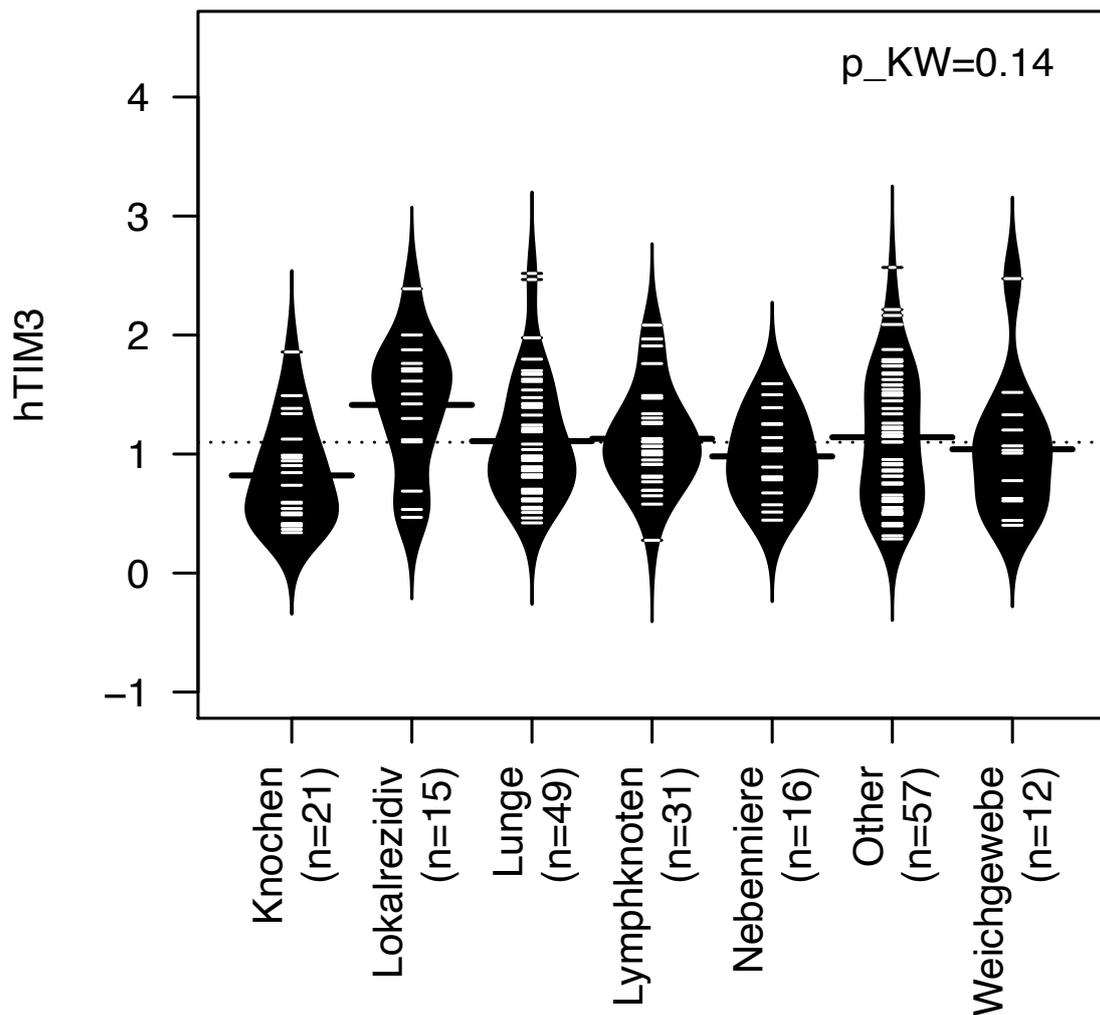


Abbildung 12: hTIM3-Expression im Metastasengewebe je nach Lokalisation.

Die Proteinexpression von hTIM3 wurde nach Organsystemen gegliedert, die auf der x-Achse aufgetragen sind. Der Expressionswert wurde mit dem Score_{TS} berechnet. Der Wert lässt sich der y-Achse des Diagrammes entnehmen. Die Ausdehnung des jeweiligen Beanplots entspricht der Range. Die gestrichelte Linie entspricht dem Mittelwert der Expression über alle Gruppen. Die durchgezogene Linie entspricht dem Mittelwert je Gruppe.

3.3.4 Evaluation der Proteinexpression von CTLA4

CTLA4 war auf Lymphozyten exprimiert. Die untenstehenden Abb. 13 zeigen je eine negative und eine positive Tumorstanze, in Abb. 14 ist das Ergebnis der Zellzahlermittlung mit Tissue Studio® abgebildet.

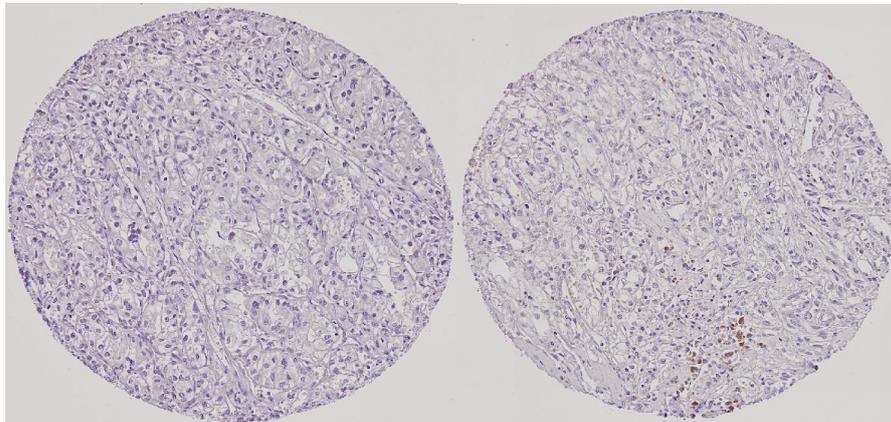


Abbildung 13: Gewebestanzen mit negativer und positiver CTLA4 Färbung.

Beispielhaft je eine negative (links) und eine positive Gewebestanze für die CTLA4 Färbung.

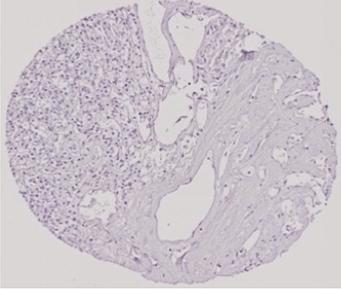
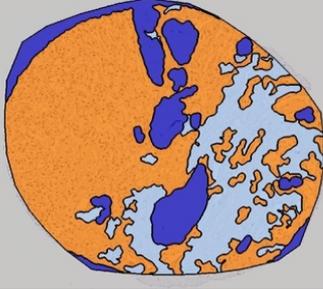
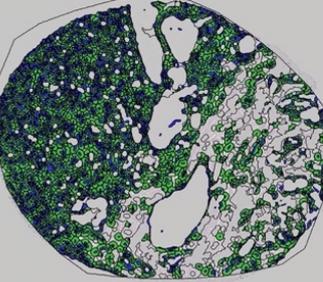
CTLA4-gefärbte Gewebestanze	Region Of Interest Detektion	
		Tumor positiv
		Nekrose, Bindegewebe
		Hintergrund
	Zell- und Membrandetektion	
		Nukleus
Zelle		

Abbildung 14: Auswertung der Gesamtzellzahl bei CTLA4 Färbung mit der Software Tissue Studio® (Definiens AG).

Screenshots der ausgeführten Analysen "Nuclei, Membranes and Cells" mit den Funktionen "ROI detection and nucleus and membrane detection" bei einer beispielhaften Tumorstanze. Das immunhistochemisch gefärbte Ausgangsbild für die Analyse steht in der oberen Reihe und kann mit der Softwareanalyse verglichen werden.

Für die eingeteilten Expressionswerte für den Vergleich der Metastasen- mit der Tumorexpression (n = 59) wurden Barplots generiert; einmal mit den absoluten Anzahlen und einmal als Prozentangaben. Die Legende lässt sich der untenstehenden Grafik entnehmen, die Einteilung ist im Material- und Methodikteil beschrieben. Für n = 1 Patienten lagen n = 2 Gewebeproben aus unterschiedlichen Tumorregionen vor, deren Expressionswerte für die Berechnungen gemittelt wurden, was in der Folge n = 58 Patienten für die Analyse ergibt. Für die Tumoren, die keine CTLA4-angefärbten Zellen enthielten („0“) waren n = 48 (90,6 %) Metastasen ebenfalls negativ, n = 3 (5,7 %) waren positiv („> 0“) und n = 2 (3,8 %) konnten nicht bestimmt werden („NA“). Für Tumoren, die CTLA4⁺ Zellen aufwiesen waren n = 3 (60 %) ebenfalls negativ und jeweils n = 1 (20 %) positiv oder nicht auswertbar (20 %). Für Tumoren, die nicht auswertbar waren, waren n = 0 (0 %) Metastasen negativ für CTLA4, n = 1 (100 %) positiv und n = 0 (0 %) konnten nicht ausgewertet werden („NA“). Da hier insgesamt nur wenige Werte > 0 auftreten, wurde kein statistischer Test durchgeführt (s. Abb. 15).

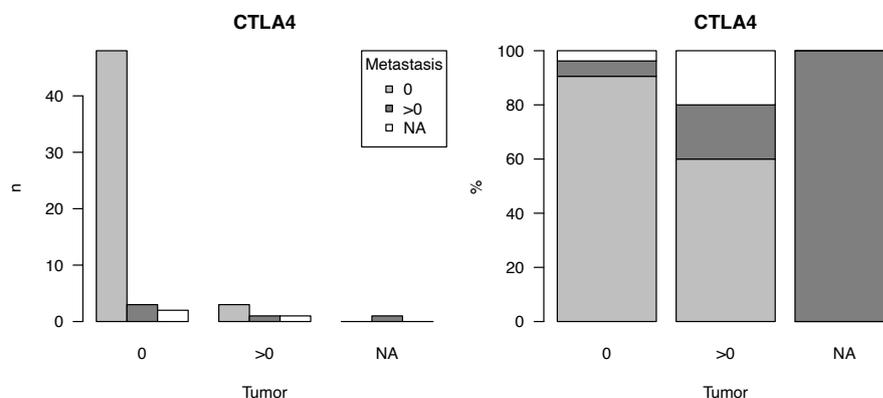


Abbildung 15: CTLA4-Expression in Metastasen vs. Primärtumor.

Links sind die Expressionswerte für CTLA4 im Metastasengewebe im Vergleich zu der Proteinexpression im Primärtumorgewebe in absoluten Zahlen (n) aufgetragen. Rechts sind die Expressionswerte im Vergleich in Prozent (%) angegeben. Die genauen Zahlenwerte lassen sich dem Fließtext entnehmen (s. o.).

Die Proteinexpression von CTLA4 in den unterschiedlichen Metastasengeweben (n = 230) waren bei einem alpha Niveau von 5 % mit dem Chi Square Test nicht signifikant unterschiedlich (p = 0,32). Für die Ergebnisse wurden Barplots mit absoluten Zahlen und Prozentangaben erstellt, die sich der nachfolgenden

Abb. 16 entnehmen lassen. Die Legende und Einteilung der Proteinexpression ist analog zum Vergleich der Expression im Metastasen- vs. Primärtumorgewebe. In Knochenmetastasen (n = 26) waren n = 19 (73,1 %) negativ („0“) für CTLA4, n = 4 (15,4 %) waren positiv („> 0“) und n = 3 (11,5 %) konnten nicht ausgewertet werden („NA“). Für Lokalrezidive (n = 19) waren n = 16 (84,2 %) Tumoren negativ, n = 2 (10,5 %) positiv und n = 1 (5,3 %) konnte nicht ausgewertet werden. Bei der Analyse der Lungenmetastasen (n = 54) waren n = 52 (96,3 %) negativ, n = 2 (3,7 %) positiv und n = 0 (0 %) konnten nicht ausgewertet werden. N = 29 (85,3 %) der Lymphknotenmetastasen (n = 34) wiesen keine Zellen auf, die CTLA4 exprimieren, n = 2 (5,9 %) Tumorstanzen wiesen positive Zellen auf und n = 3 (8,8 %) konnten nicht ausgewertet werden. Von den Nebennierenmetastasen (n = 18) waren n = 15 (83,3 %) negativ, n = 2 (11,1 %) positiv und n = 1 (5,6 %) konnten nicht ausgewertet werden. Seltene Metastasenlokalisationen wurden zusammengefasst als „other“ (n = 63). Hierbei waren n = 55 (87,3 %) Metastasen negativ für CTLA4, n = 4 (6,3 %) positiv und n = 4 (6,3 %) konnten nicht analysiert werden. Bei den Weichgewebemetastasen (n = 16) waren n = 13 (81,2 %) negativ für CTLA4, n = 3 (18,8 %) positiv für CTLA4 und n = 0 (0 %) konnten hierbei nicht ausgewertet werden. Da hier insgesamt nur wenige Werte > 0 auftreten, wurde kein statistischer Test durchgeführt.

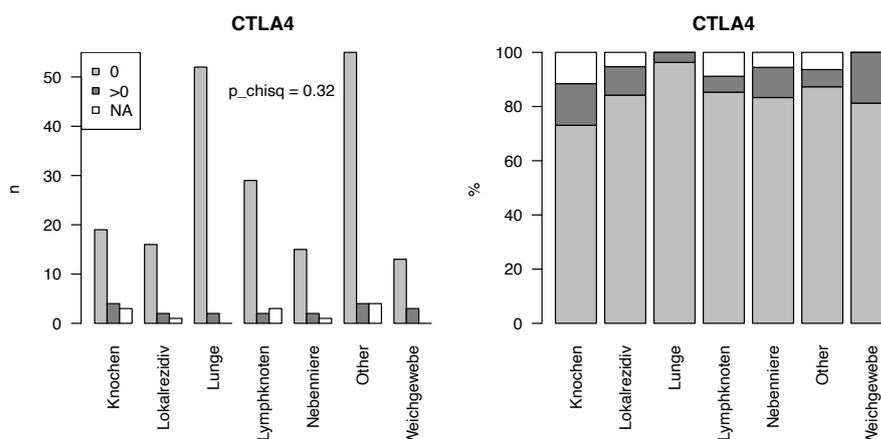


Abbildung 16: CTLA4-Expression im Metastasengewebe je nach Lokalisation. Links sind die Expressionswerte für CTLA4 im Vergleich zu der Lokalisation der Metastasen (n = 230) in absoluten Zahlen (n) aufgetragen. Rechts sind die Expressionswerte im Vergleich in Prozent (%) angegeben. Die genauen Zahlenwerte lassen sich dem Fließtext entnehmen (s. o.).

3.3.5 Evaluation der Proteinexpression von LAG3

LAG3 war ebenfalls auf Lymphozyten exprimiert. Die untenstehenden Abbildungen (s. Abb. 17) zeigen die Färbeergebnisse. Abb. 18 zeigt außerdem das Ergebnis der Zellzahlermittlung mit Tissue Studio®.

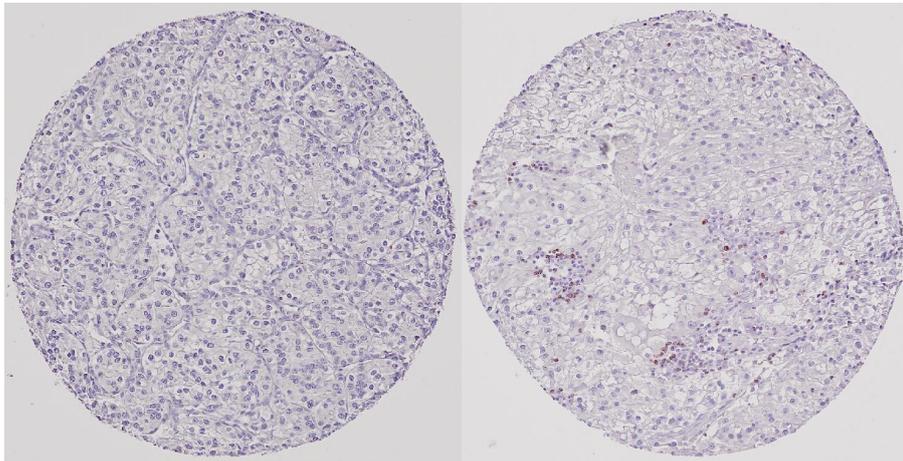


Abbildung 17: Gewebestanzten mit negativer und positiver LAG3 Färbung.

Beispielhaft je eine negative (links) und eine positive Gewebestanze für die LAG3 Färbung.

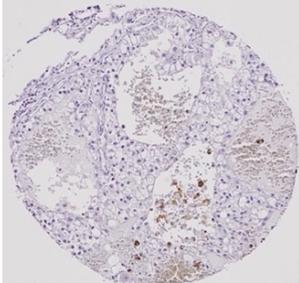
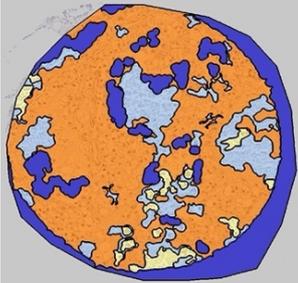
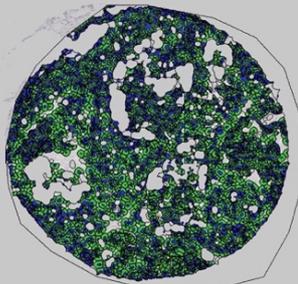
LAG3-gefärbte Gewebestanze	Region Of Interest Detektion	
		<ul style="list-style-type: none"> Tumor positiv Nekrose, Bindegewebe Hintergrund Lymphozyten
Zell- und Membrandetektion		
		<ul style="list-style-type: none"> Nukleus Zelle

Abbildung 18: Auswertung der Gesamtzellzahl bei LAG3 Färbung mit der Software Tissue Studio® (Definiens AG).

Screenshots der ausgeführten Analysen "Nuclei, Membranes and Cells" mit den Funktionen "ROI detection and nucleus and membrane detection" bei einer beispielhaften Tumorstanze. Das immunhistochemisch gefärbte Ausgangsbild für die Analyse steht in der oberen Reihe und kann mit der Softwareanalyse verglichen werden.

Für die eingeteilten Expressionswerte für den Vergleich der Metastasen- mit der Tumorexpression (n = 59) wurden analog Barplots generiert; einmal mit den absoluten Anzahlen und einmal als Prozentangaben. Die Legende lässt sich der untenstehenden Grafik entnehmen, die Einteilung ist im Material- und Methodikteil beschrieben. Für n = 1 Patienten lagen n = 2 Gewebeproben aus unterschiedlichen Tumorregionen vor, deren Expressionswerte für die Berechnungen gemittelt wurden, was in der Folge n = 58 Patienten für die Analyse ergibt. Für die Tumoren, die keine LAG3⁺ Zellen enthielten („0“) waren n = 38 (86,4 %) Metastasen ebenfalls negativ, n = 4 (9,1 %) waren schwach positiv („1“), n = 0 (0 %) mittel stark positiv, n = 0 (0 %) stark positiv und n = 2 (4,5 %) konnten nicht bestimmt werden. Für Tumoren, die schwach LAG⁺ gewertet wurden („1“) waren n = 6 (60 %) negativ, n = 2 (20 %) schwach positiv, n = 0 (0 %) mittel stark positiv, n = 0 (0 %) stark positiv und n = 2 (20 %) nicht auswertbar. Mittelstark positive Tumoren („2“) wiesen n = 0 (0 %) negative, n = 1 (50 %) schwach positive, n = 0 (0 %) mittel stark positive, n = 1 stark positive (50 %) und n = 0 (0 %) nicht auswertbare Metastasen auf. Für Tumoren, die nicht auswertbar („NA“) gewertet wurden, konnten n = 1 (33,3 %) negativ, n = 0 (0 %) schwach positiv, n = 1 (33,3 %) mittel stark positiv, n = 0 (0 %) stark positiv und n = 1 (33,3 %) nicht auswertbar gewertet werden. Da hier insgesamt nur wenige positive Werte auftreten, wurde kein statistischer Test durchgeführt (s. Abb. 19).

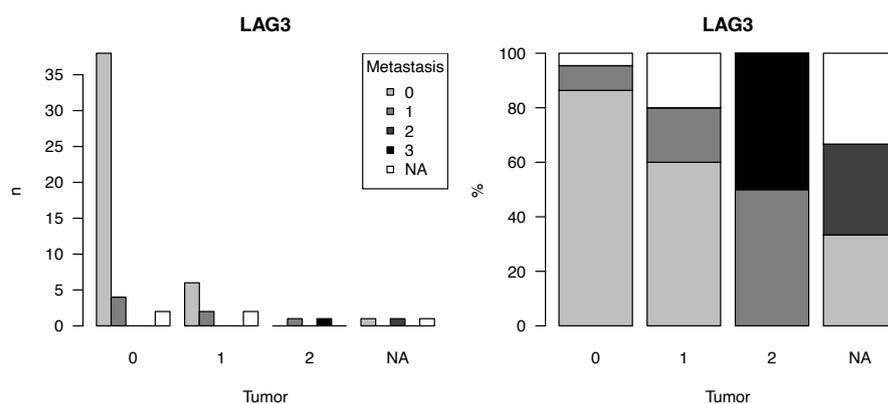


Abbildung 19: LAG3-Expression in Metastasen vs. Primärtumor.

Links sind die Expressionswerte für LAG3 im Metastasengewebe im Vergleich zu der Proteinexpression im Primärtumorgewebe in absoluten Zahlen (n) aufgetragen. Rechts sind die Expressionswerte im Vergleich in Prozent (%) angegeben. Die genauen Zahlenwerte lassen sich dem Fließtext entnehmen (s. o.).

Die Proteinexpression von LAG3 in den unterschiedlichen Metastasengeweben (n = 230) war bei einem Alphaniveau von 5 % mit dem Chi Square Test ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich (p = 0,44). Für die Ergebnisse wurden analog Barplots mit absoluten Zahlen und Prozentangaben erstellt, die sich der untenstehenden Abb. 20 entnehmen lassen. Die Legende und Einteilung der Proteinexpression ist analog zum Vergleich der Expression im Metastasen- vs. Primärtumorgewebe. In Knochenmetastasen (n = 26) waren n = 20 (76,9 %) negativ („0“) für LAG3, n = 3 (11,5 %) waren schwach positiv („1“), n = 0 (0 %) waren mittel stark positiv („2“), n = 0 (0 %) stark positiv („3“) und n = 3 (11,5 %) konnten nicht ausgewertet werden („NA“). Für Lokalrezidive (n = 19) waren n = 11 (57,9 %) Tumoren negativ, n = 4 (21,1 %) schwach positiv, n = 1 (5,3 %) mittel stark positiv, n = 0 (0 %) stark positiv und n = 3 (15,8 %) konnten nicht ausgewertet werden. Bei der Analyse der Lungenmetastasen (n = 54) waren n = 44 (81,5 %) negativ, n = 6 (11,1 %) schwach positiv, n = 2 (3,7 %) mittel stark positiv, n = 0 (0 %) stark positiv und n = 2 (3,7 %) konnten nicht ausgewertet werden. N = 20 (58,8 %) der Lymphknotenmetastasen (n = 34) wiesen keine Zellen auf, die LAG3 exprimieren, n = 7 (20,6 %) Tumorstanzen wiesen schwach positive Zellen auf, n = 2 (5,9 %) mittel stark positive, n = 1 (2,9 %) stark positive und n = 4 (11,8 %) konnten nicht ausgewertet werden. Von den Nebennierenmetastasen (n = 18) waren n = 14 (77,8 %) negativ, n = 3 (16,7 %) schwach positiv, n = 0 (0 %) mittel stark positiv, n = 1 (5,6 %) stark positiv und n = 0 (0 %) konnten nicht ausgewertet werden. Seltene Metastasenlokalisationen wurden zusammengefasst als „other“ (n = 63). Hierbei waren n = 50 (79,4 %) Metastasen negativ für LAG3, n = 7 (11,1 %) schwach positiv, n = 0 (0 %) mittel stark positiv, n = 3 (4,8 %) stark positiv und n = 3 (4,8 %) konnten nicht analysiert werden. Bei den Weichgewebemetastasen (n = 16) waren n = 14 (87,5 %) negativ für LAG3, n = 1 (6,2 %) schwach positiv für LAG3, n = 0 (0 %) mittel stark positiv, n = 0 (0 %) stark positiv und n = 1 (6,2 %) konnten hierbei nicht ausgewertet werden.

Da hier insgesamt nur wenige positive Werte auftreten, wurde kein statistischer Test durchgeführt.

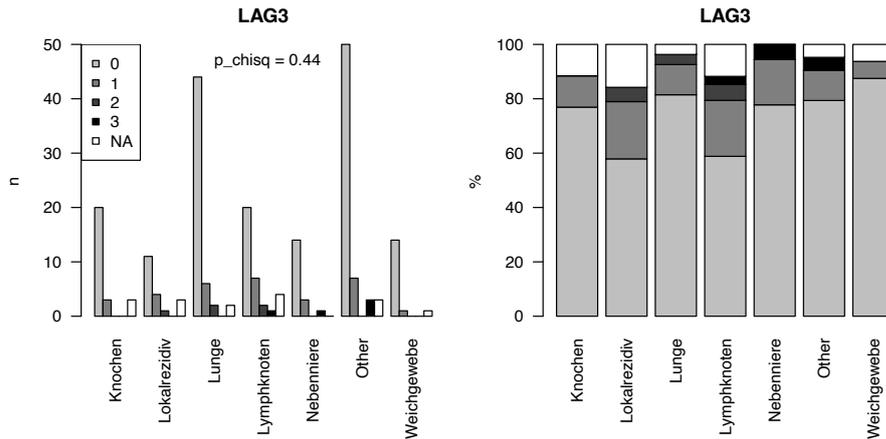


Abbildung 20: LAG3-Expression im Metastasengewebe je nach Lokalisation. Links sind die Expressionswerte für LAG3 im Vergleich zu der Lokalisation der Metastasen ($n = 230$) in absoluten Zahlen (n) aufgetragen. Rechts sind die Expressionswerte im Vergleich in Prozent (%) angegeben. Die genauen Zahlenwerte lassen sich dem Fließtext entnehmen (s. o.).

3.3.6 Exemplarische Gegenfärbung auf CD8

Um zu zeigen, dass die ausgewählten Tumorstanzen CD8⁺ Lymphozyten enthalten, wurde eine Gegenfärbung mit einem Antikörper gemacht, der an CD8⁺ Zellen bindet. Ein Exempel der gefärbten Tumorstanzen lässt sich der untenstehenden Abb. 21 entnehmen.

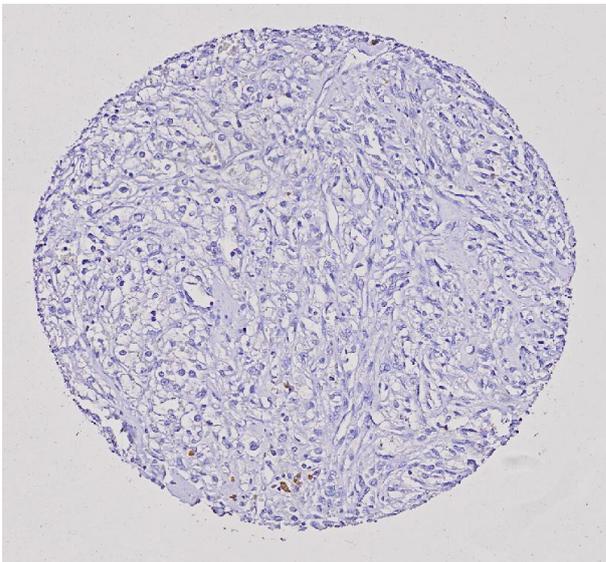


Abbildung 21: Positive Gewebestanze der Gegenfärbung auf CD8.

3.4 Korrelation der Proteinexpression im Primärtumorgewebe zu klinisch-pathologischen Merkmalen

Ausgewertet wurden die Primärtumoren, zu denen korrespondierendes Metastasengewebe vorhanden war (n = 59). Die Proteinexpression im Primärtumor wurde mit klinisch-pathologischen Daten korreliert. Es wurden entsprechend Boxplots erstellt, die im Folgenden der Übersicht wegen nicht alle abgebildet sind, da die Ergebnisse statistisch nicht signifikant waren. Für die Korrelation wurden die Proteinexpressionen von PD-L1, BTLA und hTIM3 herangezogen. Eine Übersicht der Korrelationen zu den Merkmalen für die ausgewerteten Proteinexpressionen lässt sich Tab. 14 entnehmen. Die Ergebnisse sind unter den jeweiligen Unterkapiteln beschrieben und erklärt .

Tabelle 14: Übersicht der Korrelationen der Proteinexpression im Primärtumorgewebe mit den klinisch-pathologischen Merkmalen.

Aufgeführt sind unadjustierte p-Werte für n = 59 Fälle mit verfügbaren Daten zur Proteinexpression von PD-L1, BTLA und hTIM3 in Primärtumoren und entsprechendem metastatischem Gewebe. Korreliert wurde zu den Parametern Histologie, Geschlecht, T, N, M, Rezidiv, Stage, und Grading. Fettgedruckt sind Trends, die jedoch nach multiplem Testen nicht mehr signifikant waren.

	PD-L1			BTLA			hTIM3		
	N	Median (Range)	p-Wert	N	Median (Range)	p-Wert	N	Median (Range)	p-Wert
Histologie									
ccRCC	54	0.16 (0.0-0.91)	0.53	54	0.68 (0.11-2.26)	0.2	55	1.26 (0.4-2.85)	0.25
cc/papRCC	1	0.17 (0.17-0.17)		1	0.56 (0.56-0.56)		1	1.48 (1.48-1.48)	
chrRCC	3	0.22 (0,15-0.97)		3	1.54 (1.02-2.86)		3	1.75 (1.63-1.87)	
Geschlecht									
männlich	44	0.17 (0.0-0.97)	0.84	44	1.02 (0.15-2.86)	0.019	45	1.31 (0.4-2.57)	0.75
weiblich	14	0.16 (0.01-0.78)		14	0.43 (0.11-1.67)		14	1.01 (0.5-2.85)	
T Stadium									
1	23	0.17 (0.01-0.53)	0.38	23	0.69 (0.11-2.86)	0.94	23	1.15 (0.5-2.85)	1.00
2	5	0.15 (0.14-0.97)		5	0.7 (0.56-1.54)		5	1.29 (0.6-1.63)	
3	28	0.16 (0.0-0.78)		28	0.8 (0.15-2.26)		29	1.31 (0.4-2.57)	
4	2	0.54 (0.17-0.91)		2	1.04 (0.56-1.51)		2	1.17 (0.87-1.48)	
N-Stadium									
N0	51	0.15 (0.0-0.97)	0.04	50	0.69 (0.15-2.86)	0.86	51	1.28 (0.4-2.46)	0.32
N1	7	0.34 (0.05-0.91)		8	1.02 (0.11-1.89)		8	1.56 (0.48-2.85)	
M-Stadium									
M0	36	0.16 (0.0-0.97)	0.27	37	0.7 (0.16-2.86)	0.92	37	1.31 (0.4-2.57)	0.78
M1	22	0.18 (0.02-0.91)		21	0.67 (0.11-2.21)		22	1.28 (0.54-2.85)	
Metastasierung									
synchron	23	0.17 (0.01-0.91)	0.62	23	0.65 (0.11-1.89)	0.56	24	1.28 (0.48-2.85)	0.98
metachron	35	0.17 (0.0-0.97)		35	0.93 (0.16-2.86)		35	1.31 (0.4-2.41)	
UICC Stadium									
1	17	0.17 (0.01-0.44)	0.23	17	0.69 (0.17-2.86)	0.81	17	1.35 (0.5-2.03)	0.85
2	1	0.97 (0.97-0.97)		1	1.54 (1.54-1.54)		1	1.63 (1.63-1.63)	
3	17	0.14 (0.0-0.62)		18	0.8 (0.16-2.26)		18	1.29 (0.4-2.57)	
4	21	0.17 (0.02-0.91)		20	0.66 (0.11-2-21)		21	1.29 (0.54-2.85)	
Grading									
G1	5	0.12 (0.04-0.43)	0.91	6	0.98 (0.31-1.36)	0.85	5	0.96 (0.7-1.49)	0.51
G1/2	1	0.13 (0.13-0.13)		1	1.65 (1.65-1.65)		1	2.03 (2.03-2.03)	
G2	31	0.21 (0.01-0.78)		32	0.8 (0.11-2.21)		32	1.28 (0.48-2.85)	
G3	20	0.16 (0.0-0.97)		19	0.69 (0.15-2.11)		20	1.33 (0.4-2.41)	
G3/4	1	0.17 (0.17-0.17)		1	0.56 (0.56-0.56)		1	1.48 (1.48-1.48)	

3.4.1 Evaluation der Proteinexpression von PD-L1 im Primärtumor in Korrelation zu klinisch-pathologischen Merkmalen

Für n = 1 Patienten konnten die Ergebnisse nicht ausgewertet werden. Für die Analyse standen somit n = 58 Patienten zur Verfügung.

Hinsichtlich der Korrelation der PD-L1-Expression im Primärtumorgewebe und der Histologie ($p = 0,53$), des Geschlechts ($p = 0,84$), des T-Stadiums ($p = 0,38$), des N-Stadiums ($p = 0,04$), des M-Stadiums ($p = 0,27$), des Stadiums nach UICC ($p = 0,23$), des Kerngradings ($p = 0,91$) und des Auftretens eines Rezidivs ($p = 0,62$) konnten keine signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden. Für den Nodalstatus zeigte sich ein Trend, der in der multivariaten Analyse nicht signifikant war. Die genauen Analyseergebnisse lassen sich Tab. 14 entnehmen.

3.4.2 Evaluation der Proteinexpression von BTLA im Primärtumor in Korrelation zu klinisch-pathologischen Merkmalen

Für n = 1 Patienten konnten die Ergebnisse nicht ausgewertet werden. Für die Analyse standen somit n = 58 Patienten zur Verfügung.

Für die BTLA-Expression im Primärtumorgewebe zeigten sich nach Kruskal-Wallis Analysen keine signifikanten Zusammenhänge in Abhängigkeit der Histologie ($p = 0,2$), des T-Stadiums ($p = 0,94$), N-Stadiums ($p = 0,86$), M-Stadiums ($p = 0,92$), Tumorstadiums nach UICC ($p = 0,81$), Kerngradings ($p = 0,85$) und des Auftretens eines Rezidivs ($p = 0,56$). Männer hatten eine höhere BTLA Proteinexpression als Frauen ($p = 0,019$), die jedoch nach multiplen Testen nicht mehr statistisch signifikant war, die nachfolgende Abb. 22 zeigt exemplarisch einen Boxplot für die Auswertung der klinisch-pathologischen Merkmale in Korrelation zur Proteinexpression für die drei ausgewerteten Proteine. Die genauen Daten der Korrelation der BTLA Proteinexpression zu klinisch-pathologischen Parametern sind Tab. 14 zu entnehmen.

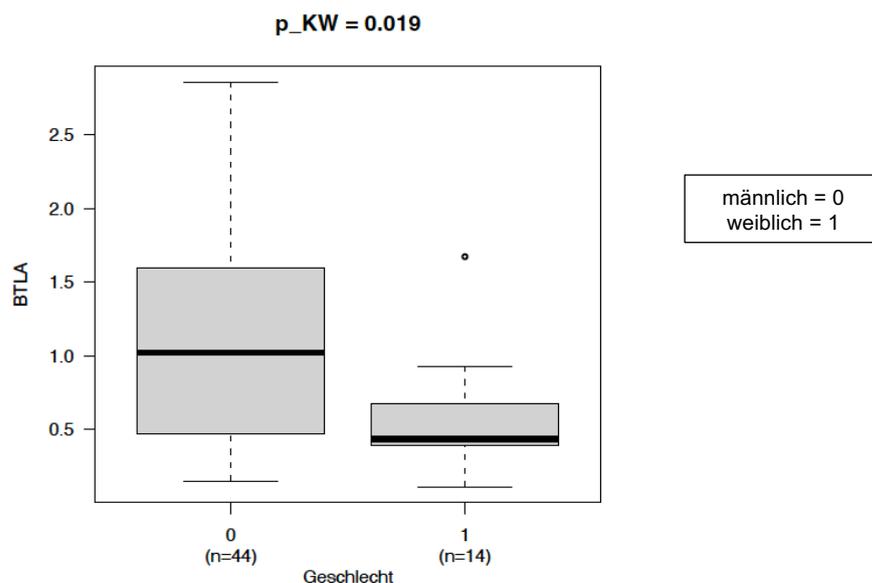


Abbildung 22: BTLA-Expression vs. Geschlecht.

Die Abbildung zeigt Turkey-Boxplots für die Korrelation der BTLA-Expression im Primärtumor vs. des Patientengeschlechts. Eine Legende findet sich rechtsstehend neben der Abbildung. Die Expression wurde mit dem ScoreTS berechnet. Die schwarze Linie markiert den Median der jeweiligen Gruppe. Die obere bzw. untere Grenze der Box sind das 25 %- bzw. das 75 %-Quantil. Die Länge der Boxen definiert den Interquartilsabstand. N = 44 der Patienten waren männlich (Mittelwert: 1,08; Median: 1,02; Range: 0,15-2,86) und n = 14 der ausgewerteten Patienten (n = 58) waren weiblich (Mittelwert: 0,55; Median: 0,43; Range: 0,11-1,67). In Primärtumoren von männlichen Patienten war die BTLA-Expression tendenziell höher als bei weiblichen Patienten. Für die Korrelation der BTLA-Expression mit dem Geschlecht (n = 58 Patienten) zeigt sich ein Trend im Kruskal-Wallis-Test, der jedoch nach multiplem Testen nicht mehr statistisch signifikant war (p = 0,019).

3.4.3 Evaluation der Proteinexpression von hTIM3 im Primärtumor in Korrelation zu klinisch-pathologischen Merkmalen

Es zeigten sich in den Kruskal-Wallis Analysen keine signifikanten Korrelationen zwischen der Proteinexpression von hTIM3 im Primärtumor (n = 59) und der Histologie (p = 0,25), dem Geschlecht (p = 0,75), dem T-Stadium (p = 1), dem N-Stadium (p = 0,32), dem M-Stadium (p = 0,78), dem Tumorstadium nach UICC (p = 0,85), dem Kerngrading (p = 0,51) und dem Auftreten eines Rezidivs (p = 0,98). Die genauen Analysedaten der hTIM3-Expression in Korrelation zu klinisch-pathologischen Daten lassen sich der Tab. 14 entnehmen.

3.5 Korrelation der Proteinexpression im Metastasen- und Primärtumorgewebe mit dem Überleben (OS/CSS)

Eine Übersicht der Ergebnisse der Überlebensanalysen ist Tab. 15 zu entnehmen. Die Ergebnisse wurden teilweise zur Lokalisation der Metastasen adjustiert (adj.). Adjustierungen auf T, N und M wurden durchgeführt. Die Gruppen wurden dann allerdings sehr klein, sodass die Ergebnisse aufgrund der geringen Aussagekraft im Folgenden nicht graphisch detailliert dargestellt sind.

Table 15: Übersicht der Korrelationen (p-Werte) der Proteinexpression mit dem Überleben (OS/CSS).

Links aufgeführt eine kurze Erläuterung der Gruppen. Die p-Werte sind teilweise adjustiert. Die genauen Beschreibungen lassen sich zudem den Erklärungen in den Unterkapiteln entnehmen. Mit Stern (*) markiert sind statistisch signifikante Korrelationen. Fett gedruckt sind Trends.

	PD-L1	BTLA	hTIM3	CTLA4	LAG3
OS n = 230 (alle Metastasen)	0,2	0,583	0,597	0,981	0,058
CSS n = 230 (alle Metastasen)	0,131	0,45	0,787	0,95	0,181
OS n = 230 (alle Metastasen; Adjustierung für Metastasenlokalisation)	0,315	0,188	0,582		
CSS n = 230 (alle Metastasen; Adjustierung für Metastasenlokalisation)	0,189	0,107	0,785		
OS n = 210 (Metastasen zu Primarius ccRCC)	0,083	0,504	0,7		
CSS n = 210 (Metastasen zu Primarius ccRCC)	0,056	0,433	0,831		
OS n = 210 (Metastasen zu Primarius ccRCC; Adjustierung für Metastasenlokalisation)	0,081	0,136	0,604		
CSS n = 210 (Metastasen zu Primarius ccRCC; Adjustierung für Metastasenlokalisation)	0,044*	0,095	0,753		
OS n = 183 (Primarius plus Metastasen ccRCC)	0,019*	0,662	0,753		
CSS n = 183 (Primarius plus Metastasen ccRCC)	0,011*	0,61	0,921		
OS n = 59 (Primärtumoren mit korrespondierenden Metastasendaten)	0,021*	0,721	0,241		
CSS n = 59 (Primärtumoren mit korrespondierenden Metastasendaten)	0,073	0,669	0,318		
OS n = 55 (ccRCC Fälle von n = 59 / Primärtumoren mit korrespondierenden Metastasendaten)	0,077	0,957	0,144		
CSS n = 55 (ccRCC Fälle von n = 59 / Primärtumoren mit korrespondierenden Metastasendaten)	0,064	0,925	0,288		

3.5.1 Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von PD-L1 im Metastasengewebe mit dem Überleben

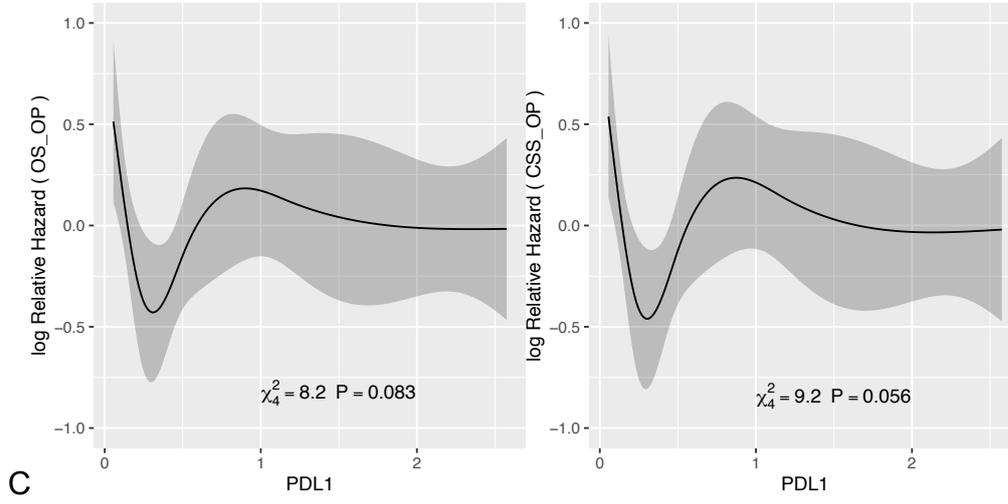
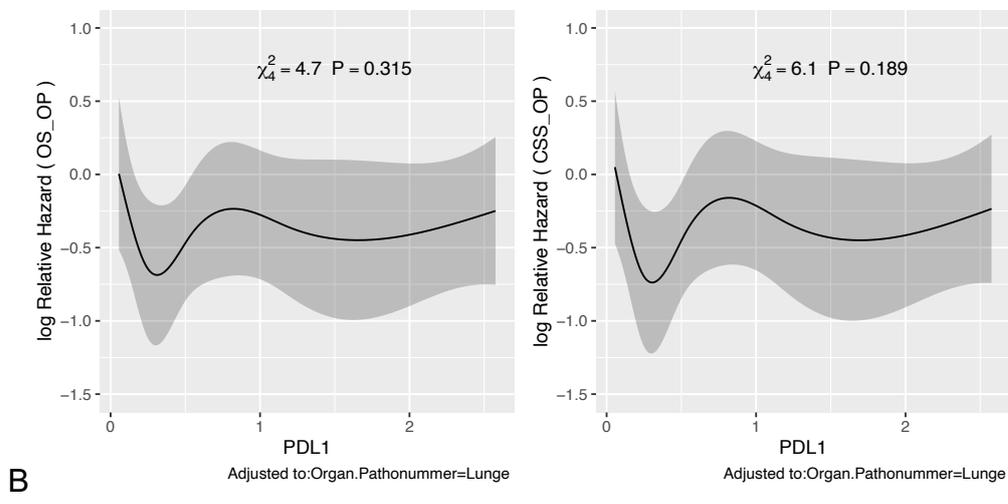
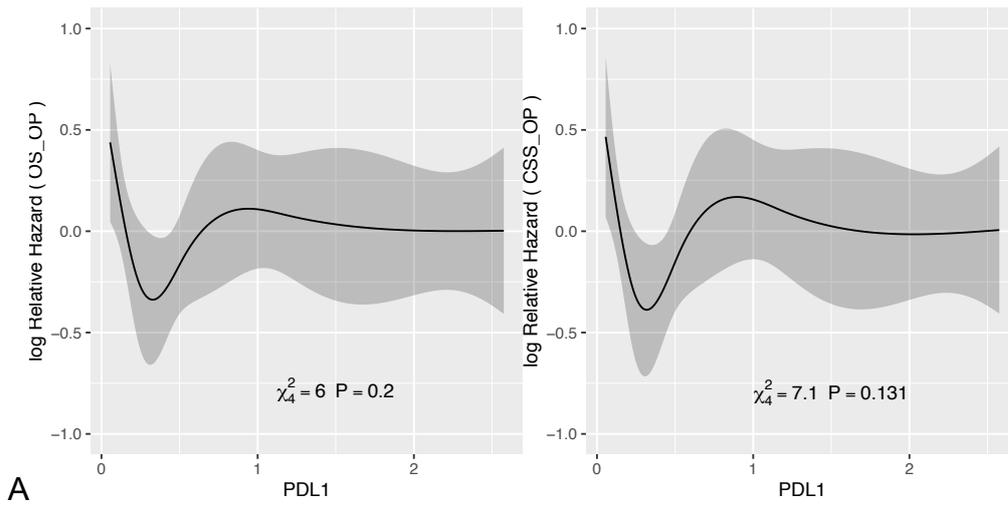
Zunächst wurden alle Metastasendaten (n = 230) ohne Adjustierung auf die Lokalisation betrachtet (s. Abb. 23, A). Für PD-L1 ergaben sich hierbei keine signifikanten Unterschiede für das OS ($p = 0,2$) und CSS ($p = 0,131$).

In weiteren Analysen wurden die Berechnungen für alle Metastasen (n = 230) auf die Lokalisation der Metastasen adjustiert. Für PD-L1 hat sich auf den Ort adjustiert ebenfalls kein signifikanter Unterschied im OS ($p = 0,315$) und CSS ($p = 0,189$) gezeigt (s. Abb. 23, B).

Die Effekte der PD-L1-Expression in den Metastasen auf das Überleben wurde außerdem gesondert für die Gruppe der ccRCCs (n = 210) untersucht, wobei die Zuteilung nach der Histologie des Primärtumors definiert wurde. Der Unterschied im OS ($p = 0,083$) und CSS ($p = 0,056$) war nicht statistisch signifikant, für das CSS zeigt sich jedoch ein Trend (s. Abb. 23, C).

Die PD-L1-Expression in den Metastasen der ccRCC Fälle (n = 210) wurde ebenfalls für die Metastasenlokalisierung adjustiert. Der Unterschied im OS ($p = 0,081$) war nicht signifikant. Der Unterschied für das CSS ($p = 0,044$) war statistisch signifikant (s. Abb. 23, D).

Es erfolgte zusätzliche eine Analyse des OS und CSS für alle Fälle, bei denen sowohl Primarius als auch Metastase histologische ccRCCs (n = 183) waren. Die Unterschiede für die PD-L1-Expression in den Metastasen waren für das OS ($p = 0,019$) und CSS ($p = 0,011$) statistisch signifikant (s. Abb. 23, E). Die Analysen zeigen eine nicht-monotone Assoziation von PD-L1-Expression und Überleben in ccRCC Metastasen. Patienten mit einer niedrigen und einer hohen PD-L1-Expression hatten ein hohes Risiko für ein OS- oder CSS-Event. In einem kleinen Bereich dazwischen hatten die Patienten ein niedrigeres Risiko zu versterben. Adjustierungen für klinische Variablen haben die Kurvenkonfiguration nicht verändert.



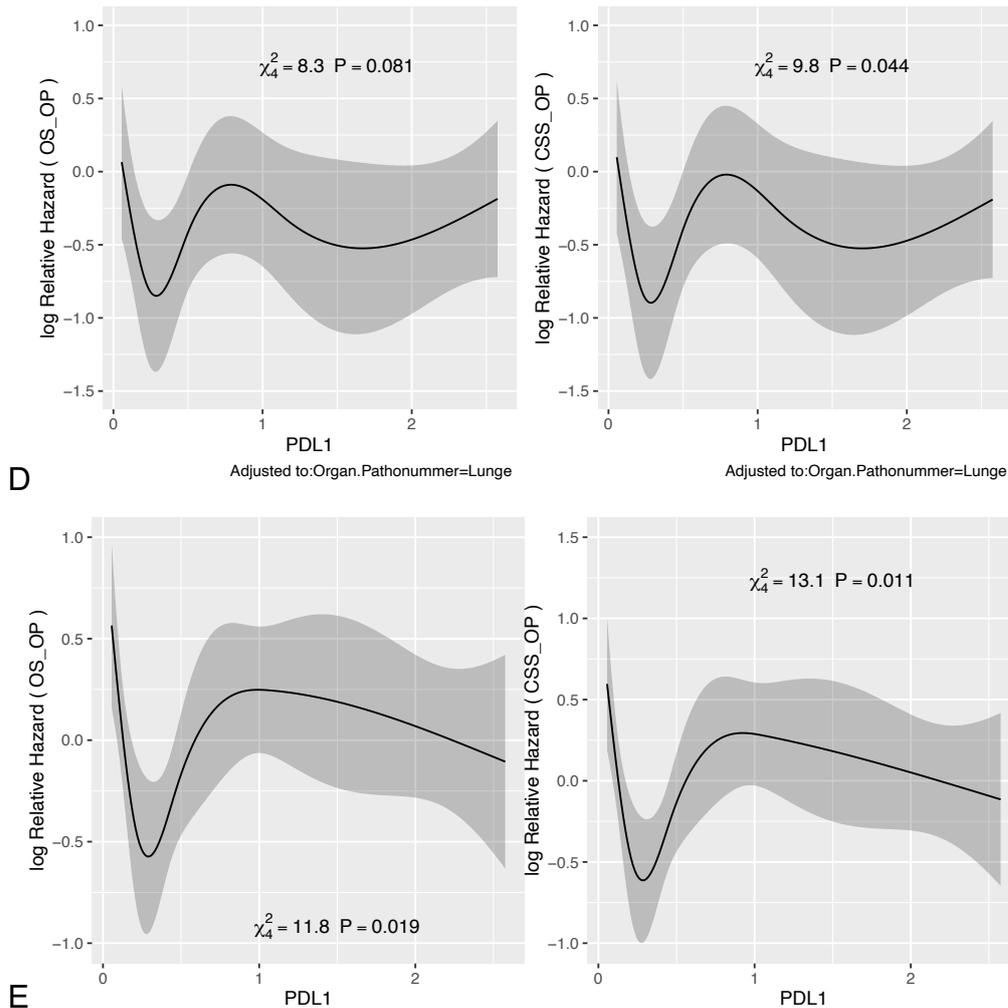


Abbildung 23: PD-L1-Expression in den Metastasen vs. Überleben.

Abgebildet sind (log) Relative Hazard Ratio Plots (OS/CSS) vs. PD-L1-Expression in den Metastasen. Auf der y-Achse sind die (log) Relative Hazard Ratios und auf der x-Achse die Proteinexpressionswerte aufgetragen. Die Proteinexpression wurde mit dem ScoreTS berechnet. Betrachtet wurde der Unterschied der Kurven zwischen 75 %- und 25 %-Quantil der unabhängigen Variablen; die y-Werte der log relative Hazard-Kurve für an den zugehörigen x-Werten wurden ermittelt und die Differenz bestimmt. Die Differenz ist der logHR zwischen 75 %- und 25 %-Quantil; der HR ist somit $\exp(\log HR)$. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der (log) HR und der graue Balken dem 95 % Konfidenzintervall. Links ist das Gesamtüberleben (OS) und rechts das Krebspezifische Überleben (CSS) in einem Scatterplot aufgezeigt.

A: OS/CSS vs. PD-L1-Expression für alle Metastasen (n = 230).

OS beispielhaft: Low: 0,22; High: 1,36; Difference: 1,13; HR = 1,3: 95 % CI 0,79-2,14 und CSS beispielhaft: Low: 0,22; High: 1,36; Difference: 1,13; HR = 1,37: 95 % CI 0,82-2,28.

B: OS/CSS vs. PD-L1-Expression für alle Metastasen (n = 230); Adjustierung für Metastasenlokalisierung.

C: OS/CSS vs. PD-L1-Expression in den Metastasen für ccRCC Fälle (definiert nach Histologie Primarius; n = 210).

D: OS/CSS vs. PD-L1-Expression in den Metastasen für ccRCC Fälle (definiert nach Histologie Primarius; n = 210); Adjustierung für Metastasenlokalisierung.

E: OS/CSS vs. PD-L1-Expression in den Metastasen für ccRCC Fälle (definiert nach Histologie Primarius und Metastase; n = 183).

3.5.2 Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von PD-L1 im Primärtumorgewebe mit dem Überleben

Überlebensanalysen wurden auch gesondert für jene Primärtumoren durchgeführt, zu denen korrespondierendes Metastasengewebe vorlag. Die Primärtumorgewebe waren dabei unterschiedlichen histologischen Subtyps (n = 59).

Für PD-L1 war der Unterschied der Expression im Primärtumor im OS ($p_{\text{unadj.}} = 0,021$) jedoch nicht im CSS ($p_{\text{unadj.}} = 0,073$) statistisch signifikant (s. Abb. 24, A). Für PD-L1 zeigt sich hier für höhere Expressionswerte ein höheres Risiko für ein OS-Event. Allerdings ist dieser Zusammenhang nach Korrektur für multiples Testen nicht mehr signifikant. Auch eine Adjustierung für Tumorstage und Alter hat daran nichts geändert.

Daten zu Primärtumoren waren insgesamt für n = 82 vorhanden. In der Betrachtung der n = 72 ccRCCs nach Adjustierung für Stage und Alter, ist die Assoziation zwischen PD-L1-Expression und OS/CSS nicht signifikant, es zeigte sich jedoch in Trend.

Für die Fälle, zu denen Primärtumorgewebe und korrespondierende Metastasendaten vorlagen wurden analog Überlebensanalysen für die ccRCC Fälle (n = 55) durchgeführt. Das OS ($p = 0,077$) und CSS ($p = 0,064$) für PD-L1 im Primärtumor war statistisch nicht signifikant unterschiedlich (s. Abb. 24, B).

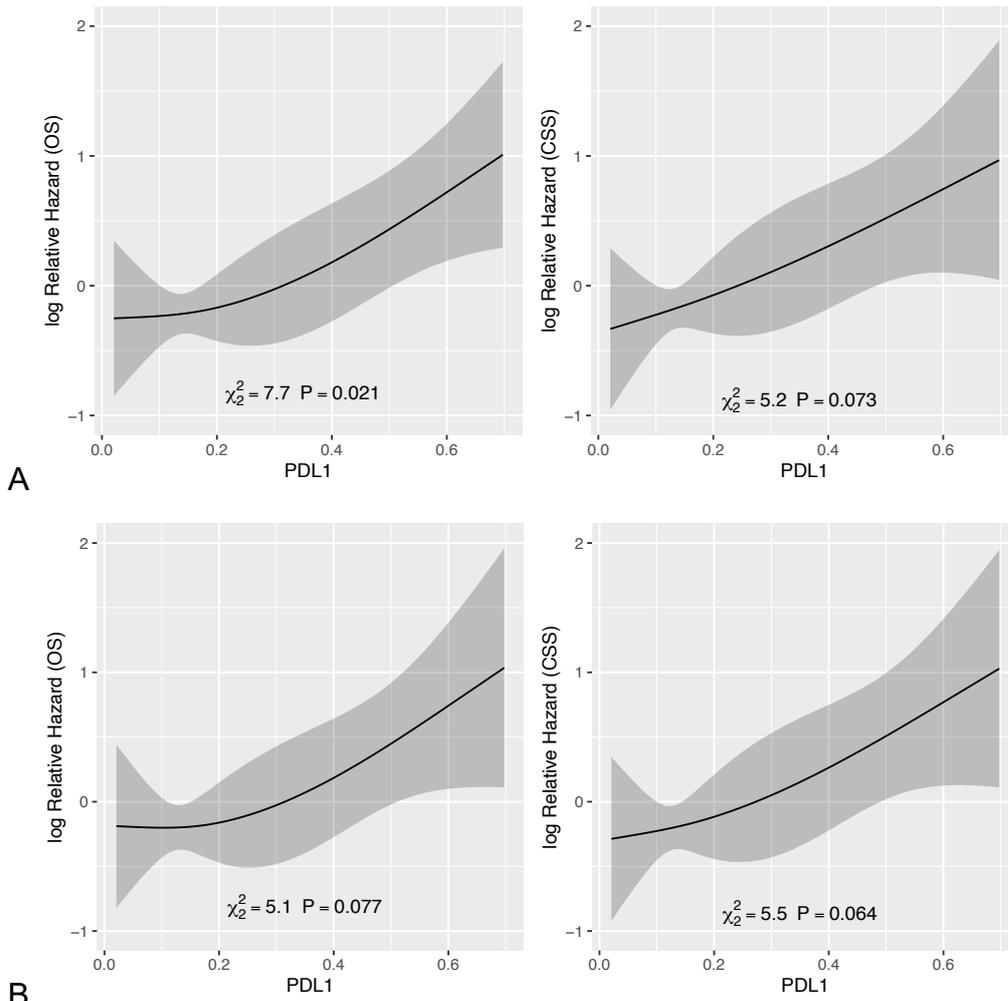


Abbildung 24: PD-L1-Expression im Primärtumor vs. Überleben.

Abgebildet sind (log) Relative Hazard Ratio Plots (OS/CSS) vs. PD-L1-Expression im Primärtumor. Auf der y-Achse sind die (log) Relative Hazard Ratios und auf der x-Achse die Proteinexpressionswerte aufgetragen. Die Proteinexpression wurde mit dem ScoreTS berechnet. Betrachtet wurde der Unterschied der Kurven zwischen 75 %- und 25 %-Quantil der unabhängigen Variablen; die y-Werte der log relative Hazard-Kurve für an den zugehörigen x-Werten wurden ermittelt und die Differenz bestimmt. Die Differenz ist der logHR zwischen 75 %- und 25 %-Quantil; der HR ist somit $\exp(\log HR)$. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der (log) HR und der graue Balken dem 95 % Konfidenzintervall. Links ist das Gesamtüberleben (OS) und rechts das Krebspezifische Überleben (CSS) in einem Scatterplot aufgezeigt.

A: OS/CSS vs. PD-L1-Expression im Primärtumor für Fälle mit Primarius und korrespondierenden Metastasen (n = 59).

OS beispielhaft: Low: 0,1; High: 0,32; Difference: 0,22; HR = 1,27; 95 % CI 0,69-2,35 und CSS beispielhaft: Low: 0,1; High: 0,32; Difference: 0,22; HR = 1,44; 95 % CI 0,76-2,73.

B: OS/CSS vs. PD-L1-Expression im Primärtumor für ccRCC Fälle mit Primarius und korrespondierenden Metastasen (n = 55).

3.5.3 Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von BTLA im Metastasengewebe mit dem Überleben

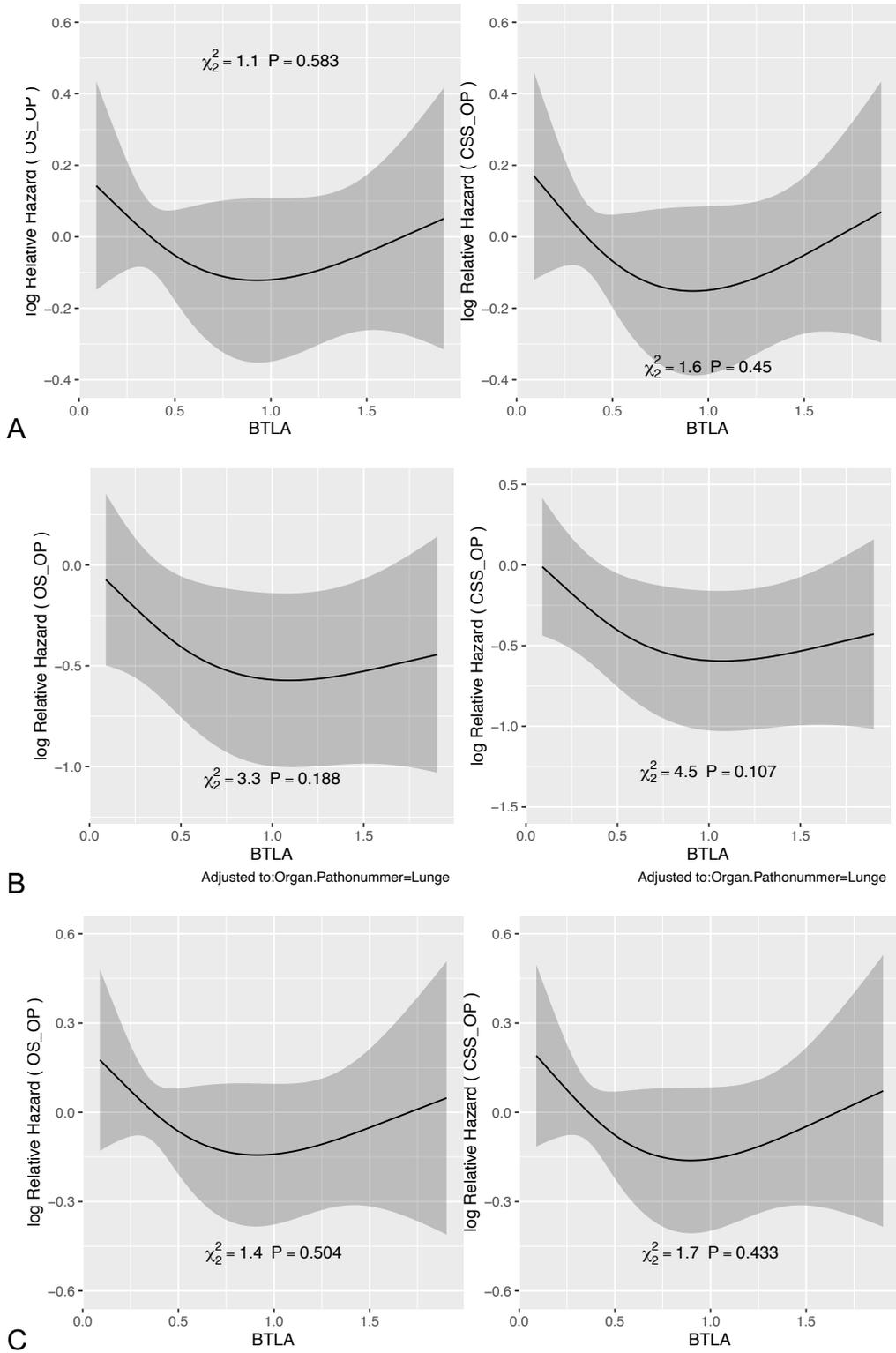
Zunächst wurden alle Metastasendaten ($n = 230$) ohne Adjustierung auf die Lokalisation betrachtet (s. Abb. 25, A). Für BTLA ergaben sich hierbei keine signifikanten Unterschiede für das OS ($p = 0,583$) und CSS ($p = 0,45$).

In weiteren Analysen wurden die Berechnungen für alle Metastasen ($n = 230$) auf die Lokalisation der Metastasen adjustiert. Für BTLA hat sich auf den Ort adjustiert ebenfalls kein signifikanter Unterschied im OS ($p = 0,188$) und CSS ($p = 0,107$) gezeigt (s. Abb. 25, B).

Die Effekte der BTLA-Expression auf das Überleben wurde außerdem gesondert für die Gruppe der ccRCC Metastasen ($n = 210$) untersucht, wobei die Zuteilung nach der Histologie des Primärtumors definiert wurde. Der Unterschied im OS ($p = 0,504$) und CSS ($p = 0,433$) war nicht statistisch signifikant (s. Abb. 25, C).

Die BTLA-Expression in den Metastasen der ccRCC Fälle ($n = 210$) wurde ebenfalls für die Metastasenlokalisierung adjustiert. Der Unterschied im OS ($p = 0,136$) und CSS ($p = 0,095$) war nicht signifikant (s. Abb. 25, D).

Es erfolgte zusätzliche eine Analyse des OS und CSS für alle Fälle, bei denen sowohl Primarius als auch Metastase histologische ccRCCs ($n = 183$) waren (s. Abb. 25, E). Die Unterschiede für die BTLA-Expression in den Metastasen waren für das OS ($p = 0,662$) und CSS ($p = 0,61$) nicht statistisch signifikant.



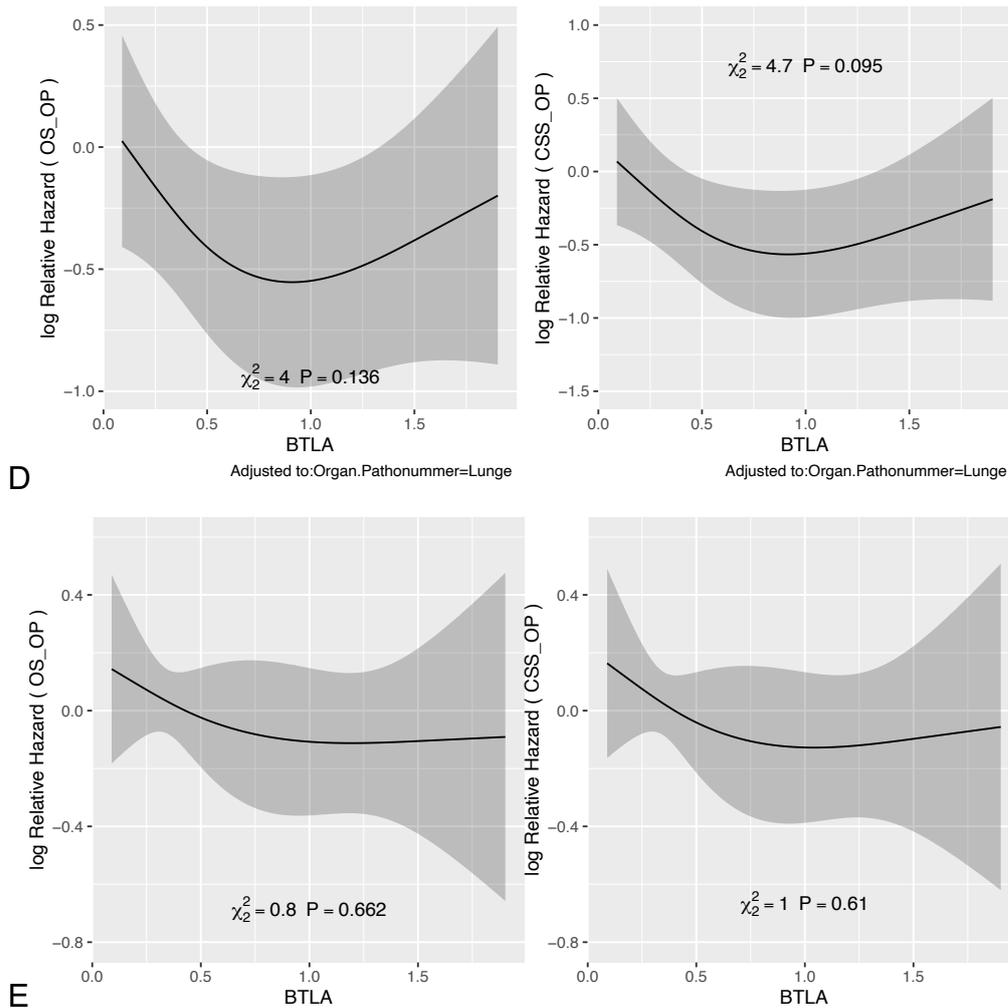


Abbildung 25: BTLA-Expression in den Metastasen vs. Überleben.

Abgebildet sind (log) Relative Hazard Ratio Plots (OS/CSS) vs. BTLA-Expression. Auf der y-Achse sind die (log) Relative Hazard Ratios und auf der x-Achse die Proteinexpressionswerte aufgetragen. Die Proteinexpression wurde mit dem ScoreTS berechnet. Betrachtet wurde der Unterschied der Kurven zwischen 75 %- und 25 %-Quantil der unabhängigen Variablen; die y-Werte der log relative Hazard-Kurve für an den zugehörigen x-Werten wurden ermittelt und die Differenz bestimmt. Die Differenz ist der logHR zwischen 75 %- und 25 %-Quantil; der HR ist somit $\exp(\log HR)$. HRs und 95 % CI sind Werte, die nicht über die gesamte Kurve einheitlich sind, diese sind somit im Folgenden zu Verständniszwecken lediglich beispielhaft bei ausgewählten Analysen angegeben. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der (log) HR und der graue Balken dem 95 % Konfidenzintervall. Links ist das Gesamtüberleben (OS) und rechts das Krebspezifische Überleben (CSS) in einem Scatterplot aufgezeigt.

A: OS/CSS vs. BTLA-Expression für alle Metastasen (n = 230).

OS beispielhaft: Low: 0,25; High: 0,99; Difference: 0,73; HR = 0,84; 95 % CI 0,59-1,2 und CSS beispielhaft: Low: 0,25; High: 0,99; Difference: 0,73; HR = 0,81; 95 % CI 0,56-1,16.

B: OS/CSS vs. BTLA-Expression für alle Metastasen (n = 230); Adjustierung für Metastasenlokalisierung.

C: OS/CSS vs. BTLA-Expression in den Metastasen für ccRCC Fälle (definiert nach Histologie Primarius; n = 210).

D: OS/CSS vs. BTLA-Expression in den Metastasen für ccRCC Fälle (definiert nach Histologie Primarius; n = 210); Adjustierung für Metastasenlokalisierung.

E: OS/CSS vs. BTLA-Expression in den Metastasen für ccRCC Fälle (definiert nach Histologie Primarius und Metastase; n = 183).

3.5.4 Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von BTLA im Primärtumorgewebe mit dem Überleben

Überlebensanalysen wurden auch gesondert für jene Primärtumoren durchgeführt, zu denen korrespondierendes Metastasengewebe vorlag. Die Primärtumorgewebe waren dabei unterschiedlichen histologischen Subtyps (n = 59).

Für BTLA war der Unterschied der Expressionswerte im Primärtumor für das OS (p = 0,721) und CSS (p = 0,669) nicht signifikant (s. Abb. 26, A).

Für die Fälle, zu denen Primärtumorgewebe und korrespondierende Metastasendaten vorlagen wurden analog Überlebensanalysen für die ccRCC Fälle (n = 55) durchgeführt. Das OS (p = 0,957) und CSS (p = 0,925) für BTLA im Primärtumor war statistisch nicht signifikant unterschiedlich (s. Abb. 26, B).

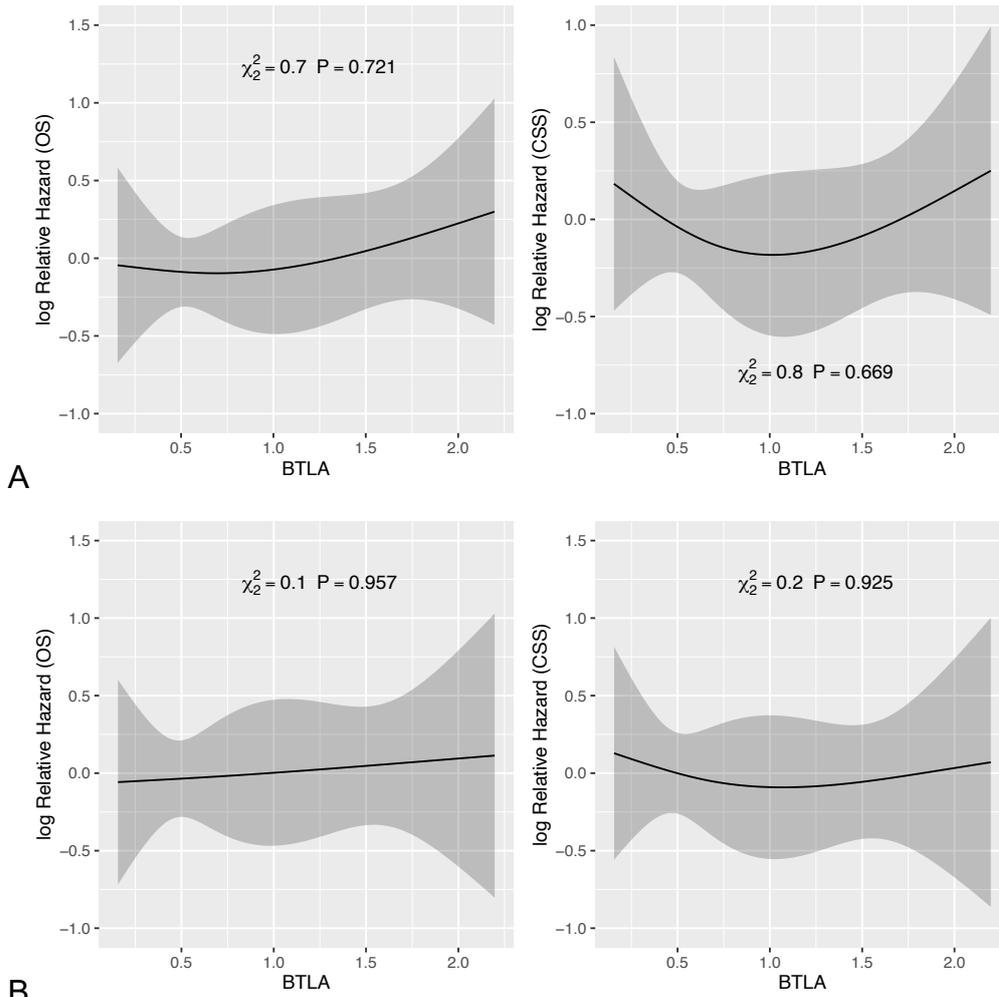


Abbildung 26: BTLA-Expression im Primärtumor vs. Überleben.

Abgebildet sind (log) Relative Hazard Ratio Plots (OS/CSS) vs. BTLA-Expression im Primärtumor. Auf der y-Achse sind die (log) Relative Hazard Ratios und auf der x-Achse die Proteinexpressionswerte aufgetragen. Die Proteinexpression wurde mit dem ScoreTS berechnet. Betrachtet wurde der Unterschied der Kurven zwischen 75 %- und 25 %-Quantil der unabhängigen Variablen; die y-Werte der log relative Hazard-Kurve für an den zugehörigen x-Werten wurden ermittelt und die Differenz bestimmt. Die Differenz ist der logHR zwischen 75 %- und 25 %-Quantil; der HR ist somit $\exp(\log HR)$. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der (log) HR und der graue Balken dem 95 % Konfidenzintervall. Links ist das Gesamtüberleben (OS) und rechts das Krebspezifische Überleben (CSS) in einem Scatterplot aufgezeigt.

A: OS/CSS vs. BTLA-Expression im Primärtumor für Fälle mit Primarius und korrespondierenden Metastasen (n = 59).

OS beispielhaft: Low: 0,4; High: 1,5; Difference: 1,1; HR = 1,13; 95 % CI 0,59-2,17 und CSS beispielhaft: Low: 0,4; High: 1,5; Difference: 1,1; HR = 0,9; 95 % CI 0,46-1,75.

B: OS/CSS vs. BTLA-Expression im Primärtumor für ccRCC Fälle mit Primarius und korrespondierenden Metastasen (n = 55).

3.5.5 Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von hTIM3 im Metastasengewebe mit dem Überleben

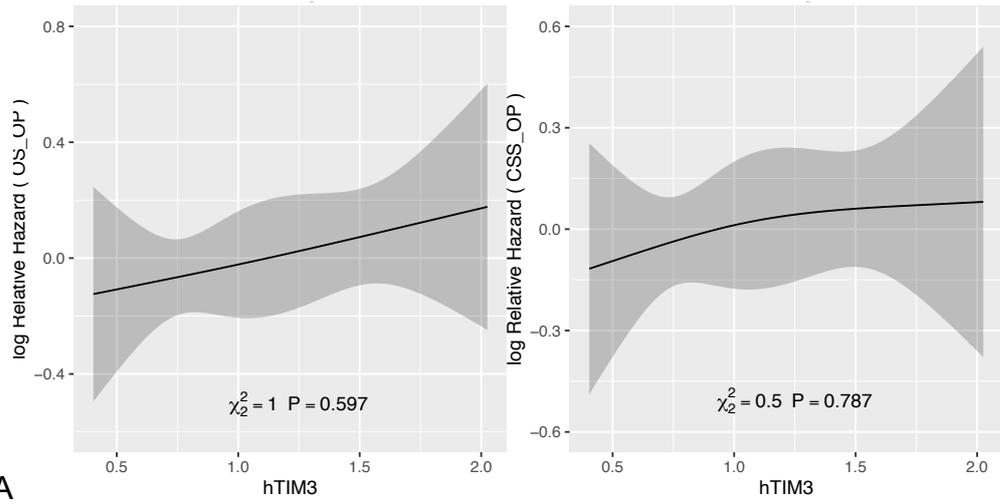
Zunächst wurden alle Metastasendaten (n = 230) ohne Adjustierung auf die Lokalisation betrachtet (s. Abb. 27, A). Für hTIM3 ergaben sich hierbei keine signifikanten Unterschiede für das OS ($p = 0,597$) und CSS ($p = 0,787$).

In weiteren Analysen wurden die Berechnungen für alle Metastasen (n = 230) auf die Lokalisation der Metastasen adjustiert. Für hTIM3 hat sich auf den Ort adjustiert ebenfalls kein signifikanter Unterschied im OS ($p = 0,582$) und CSS ($p = 0,785$) gezeigt (s. Abb. 27, B).

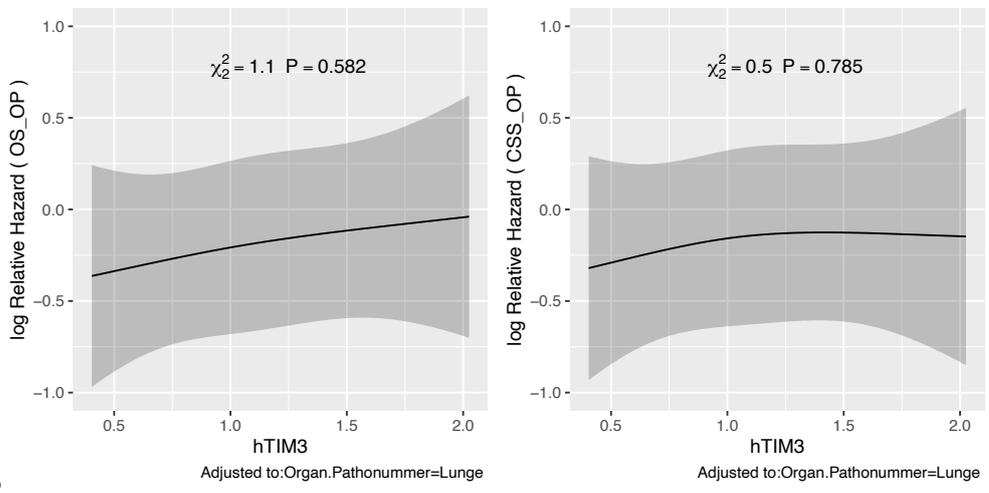
Die Effekte der hTIM3-Expression auf das Überleben wurde außerdem gesondert für die Gruppe der ccRCCs (n = 210) untersucht, wobei die Zuteilung nach der Histologie des Primärtumors definiert wurde. Der Unterschied im OS ($p = 0,7$) und CSS ($p = 0,831$) in den Metastasen war nicht statistisch signifikant (s. Abb. 27, C).

Die hTIM3-Expression in den Metastasen der ccRCC Fälle (n = 210) wurde ebenfalls für die Metastasenlokalisierung adjustiert. Der Unterschied im OS ($p = 0,604$) und CSS ($p = 0,753$) war nicht signifikant (s. Abb. 27, D).

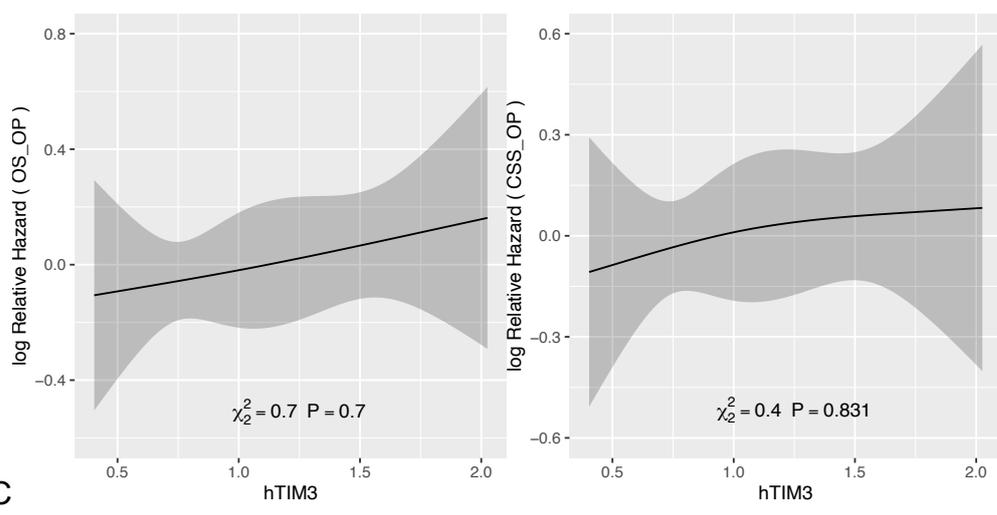
Es erfolgte zusätzliche eine Analyse des OS und CSS für alle Fälle, bei denen sowohl Primarius als auch Metastase histologische ccRCCs (n = 183) waren (s. Abb. 27, E). Die Unterschiede für hTIM3 in den Metastasen waren für das OS ($p = 0,753$) und CSS ($p = 0,921$) nicht statistisch signifikant.



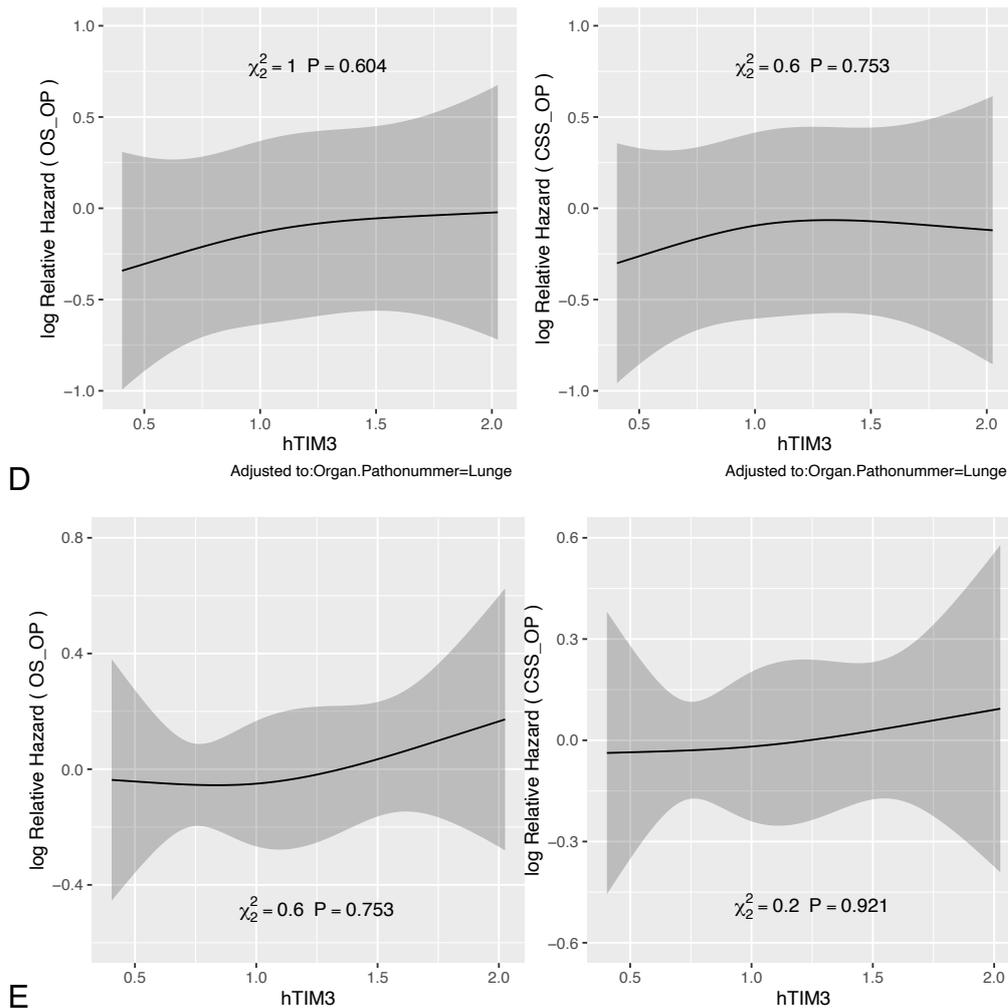
A



B



C



E

Abbildung 27: hTIM3-Expression in den Metastasen vs. Überleben.

Abgebildet sind (log) Relative Hazard Ratio Plots (OS/CSS) vs. hTIM3-Expression in den Metastasen. Auf der y-Achse sind die (log) Relative Hazard Ratios und auf der x-Achse die Proteinexpressionswerte aufgetragen. Die Proteinexpression wurde mit dem ScoreTS berechnet. Betrachtet wurde der Unterschied der Kurven zwischen 75 %- und 25 %-Quantil der unabhängigen Variablen; die y-Werte der log relative Hazard-Kurve für an den zugehörigen x-Werten wurden ermittelt und die Differenz bestimmt. Die Differenz ist der logHR zwischen 75 %- und 25 %-Quantil; der HR ist somit $\exp(\log HR)$. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der (log) HR und der graue Balken dem 95 % Konfidenzintervall. Links ist das Gesamtüberleben (OS) und rechts das Krebspezifische Überleben (CSS) in einem Scatterplot aufgezeigt.

A: OS/CSS vs. hTIM3-Expression für alle Metastasen (n = 230).

OS beispielhaft: Low: 0,69; High: 1,47; Difference: 0,77; HR = 1,15; 95 % CI 0,85-1,55
 CSS beispielhaft: Low: 0,69; High: 1,47; Difference: 0,77; HR = 1,11; 95 % CI 0,82-1,51.

B: OS/CSS vs. hTIM3-Expression für alle Metastasen (n = 230); Adjustierung für Metastasenlokalisierung.

C: OS/CSS vs. hTIM3-Expression in den Metastasen für ccRCC Fälle (definiert nach Histologie Primarius; n = 210).

D: OS/CSS vs. hTIM3-Expression in den Metastasen für ccRCC Fälle (definiert nach Histologie Primarius; n = 210); Adjustierung für Metastasenlokalisierung.

E: OS/CSS vs. hTIM3-Expression in den Metastasen für ccRCC Fälle (definiert nach Histologie Primarius und Metastase; n = 183).

3.5.6 Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von hTIM3 im Primärtumorgewebe mit dem Überleben

Überlebensanalysen wurden auch gesondert für jene Primärtumoren durchgeführt, zu denen korrespondierendes Metastasengewebe vorlag. Die Primärtumorgewebe waren dabei unterschiedlichen histologischen Subtyps (n = 59).

Für hTIM3 war der Unterschied der Expressionswerte im Primärtumor im OS (p = 0,241) und CSS (p = 0,318) nicht signifikant (s. Abb. 28, A).

Für die Fälle, zu denen Primärtumorgewebe und korrespondierende Metastasendaten vorlagen wurden analog Überlebensanalysen für die ccRCC Fälle (n = 55) durchgeführt. Das OS (p = 0,144) und CSS (p = 0,268) für hTIM3 im Primärtumor war statistisch nicht signifikant unterschiedlich (s. Abb. 28, B).

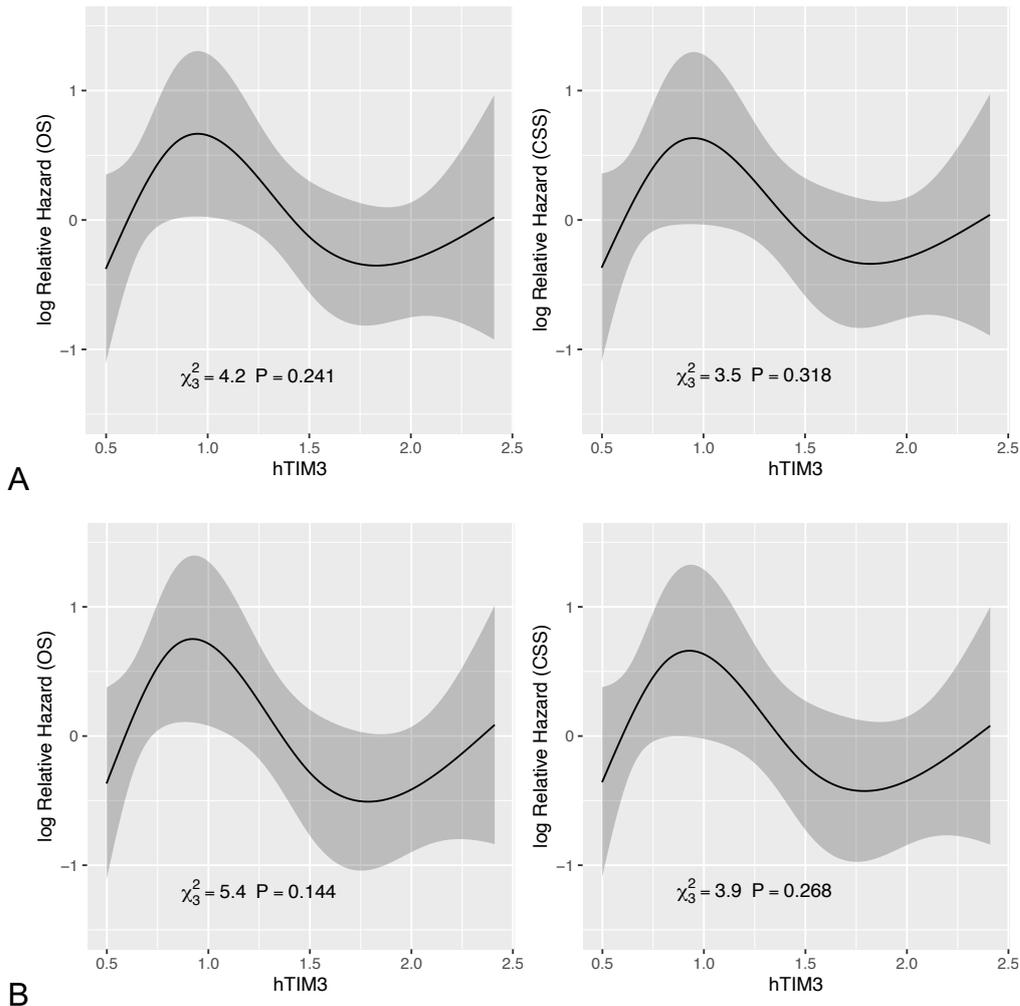


Abbildung 28: hTIM3-Expression im Primärtumor vs. Überleben.

Abgebildet sind (log) Relative Hazard Ratio Plots (OS/CSS) vs. hTIM3-Expression im Primärtumor. Auf der y-Achse sind die (log) Relative Hazard Ratios und auf der x-Achse die Proteinexpressionswerte aufgetragen. Die Proteinexpression wurde mit dem Score_{TS} berechnet. Betrachtet wurde der Unterschied der Kurven zwischen 75 %- und 25 %-Quantil der unabhängigen Variablen; die y-Werte der log relative Hazard-Kurve für an den zugehörigen x-Werten wurden ermittelt und die Differenz bestimmt. Die Differenz ist der logHR zwischen 75 %- und 25 %-Quantil; der HR ist somit $\exp(\log HR)$. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der (log) HR und der graue Balken dem 95 % Konfidenzintervall. Links ist das Gesamtüberleben (OS) und rechts das Krebspezifische Überleben (CSS) in einem Scatterplot aufgezeigt.

A: OS/CSS vs. hTIM3-Expression im Primärtumor für Fälle mit Primarius und korrespondierenden Metastasen (n = 59).

OS beispielhaft: Low: 0,71; High: 1,73; Difference: 1,02; HR = 0,52; 95 % CI 0,21-1,27 und CSS; beispielhaft: Low: 0,71; High: 1,73; Difference: 1,02; HR = 0,53; 95 % CI 0,21-1,35.

B: OS/CSS vs. hTIM3-Expression im Primärtumor für ccRCC Fälle mit Primarius und korrespondierenden Metastasen (n = 55).

3.5.7 Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von CTLA4 im Metastasengewebe mit dem Überleben

Für CTLA4 wurde untersucht, ob die Höhe der Proteinexpression im Metastasengewebe (n = 230) eine Auswirkung auf das Überleben hat. Alle Werte > 0 wurden in einer Kategorie zusammengefasst und mit der Referenzgruppe „0“ verglichen. Für den Fall, dass die Tumorzellzahl oder das Verhältnis der T-Zellen zu Tumorzellen nicht ermittelt werden konnte, wurden die Werte auf „NA“ für keine vorhandene Angabe gesetzt.

Für CTLA4 im Metastasengewebe hat sich für das OS ($p = 0,981$; HR = 1,01; 95 % CI 0,55-1,82) und das CSS ($p = 0,95$; HR = 0,98; 95 % CI 0,53-1,82) kein signifikanter Unterschied gezeigt (s. Abb. 29).

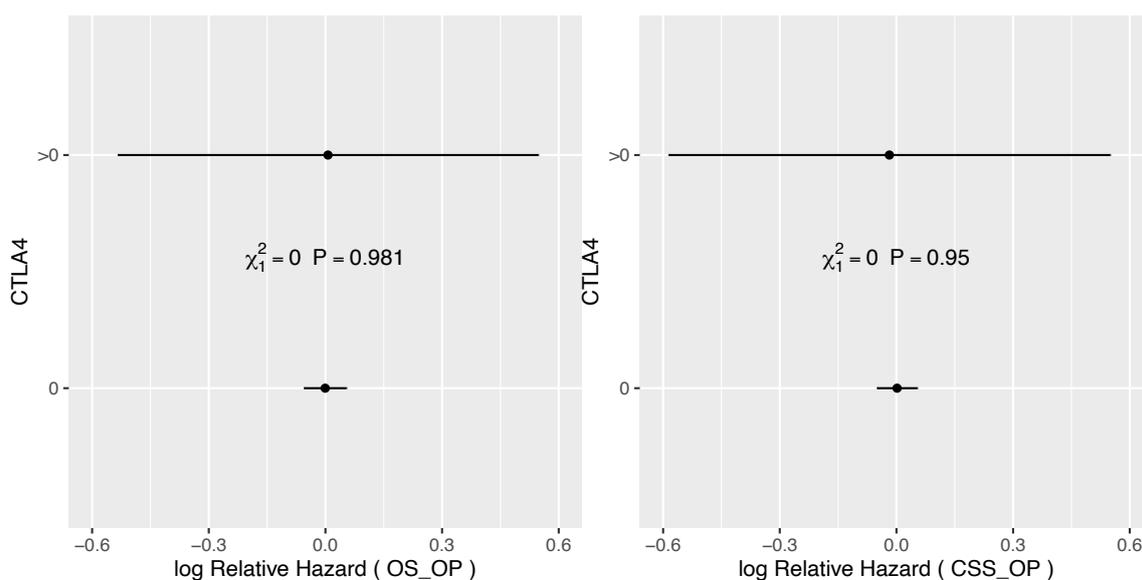


Abbildung 29: CTLA4-Expression für alle Metastasen (n = 230) vs. Überleben.

Abgebildet sind (log) Relative Hazard Ratio Plots (OS/CSS) vs. CTLA4-Expression im Metastasengewebe (n = 230). Auf der x-Achse sind die (log) Relative Hazard Ratios und auf der y-Achse die Proteinexpressionswerte aufgetragen. Die Proteinexpression wurde manuell berechnet. Links ist das Gesamtüberleben (OS) und rechts das Krebspezifische Überleben (CSS) aufgezeigt.

3.5.8 Evaluation der Korrelation der Proteinexpression von LAG3 im Metastasengewebe mit dem Überleben

Für LAG3 wurde ebenfalls untersucht, ob die Höhe der Proteinexpression im Metastasengewebe (n = 230) eine Auswirkung auf das Überleben hat. Für den Fall, dass die Tumorzellzahl oder das Verhältnis der T-Zellen zu Tumorzellen nicht ermittelt werden konnte, wurden die Werte auf „NA“ für keine vorhandene Angabe gesetzt. Verglichen wurden die Gruppen „1“ (OS: HR = 1,3; 95 % CI 0,83-2,01; CSS: HR = 1,25; 95 % CI 0,79-1,97), „2“ (OS: HR = 0,22; 95 % CI 0,03-1,55; CSS: HR = 0,24; 95 % CI 0,03-1,68) und „3“ (OS: HR = 2,8; 95 % CI 1,02-7,77; CSS: HR = 2,27; 95 % CI 0,71-7,24) mit der Referenzgruppe „0“.

Für LAG3 im Metastasengewebe hat sich für das CSS (p = 0,181) kein signifikanter Unterschied gezeigt. Für das OS (p = 0,058) hat sich im Test eine nicht-monotone borderline-Assoziation vs. LAG3-Expression gezeigt, mit dem größten Unterschied zwischen den Stufen „2“ und „3“ mit jeweils n = 5 Fällen (s. Abb. 30).

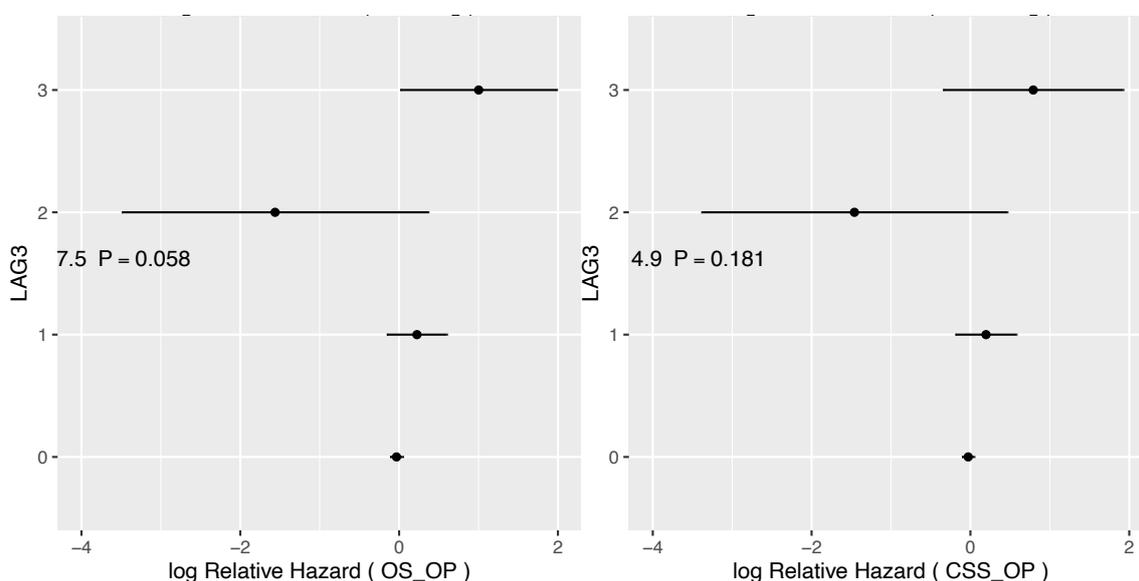


Abbildung 30: LAG3-Expression für alle Metastasen (n = 230) vs. Überleben.

Abgebildet sind (log) Relative Hazard Ratio Plots (OS/CSS) vs. LAG3-Expression im Metastasengewebe (n = 230). Auf der x-Achse sind die (log) Relative Hazard Ratios und auf der y-Achse die Proteinexpressionswerte aufgetragen. Die Proteinexpression wurde manuell berechnet. Links ist das Gesamtüberleben (OS) und rechts das Krebspezifische Überleben (CSS) aufgezeigt.

3.6 Evaluation der Proteinexpression im zeitlichen Verlauf

Zu den vorhandenen Primärtumordaten (n = 111) wurden graphisch zeitliche Verläufe erstellt. Betrachtet wurde das Auftreten von Metastasen im zeitlichen Verlauf sowie die Höhe der Proteinexpression von PD-L1, BTLA und hTIM3 in den Metastasen im Vergleich zum Primärtumor. Im Folgenden sind beispielhaft für zwei Fälle die zeitlichen Verläufe dargestellt (s. Abb. 31). Die Ergebnisse von Onkostar ID 527 demonstrieren graphisch nochmals das Ergebnis unter 3.6.1, welches die Proteinexpression in den Metastasen im zeitlichen Verlauf beleuchtet (s. Abb. 32).

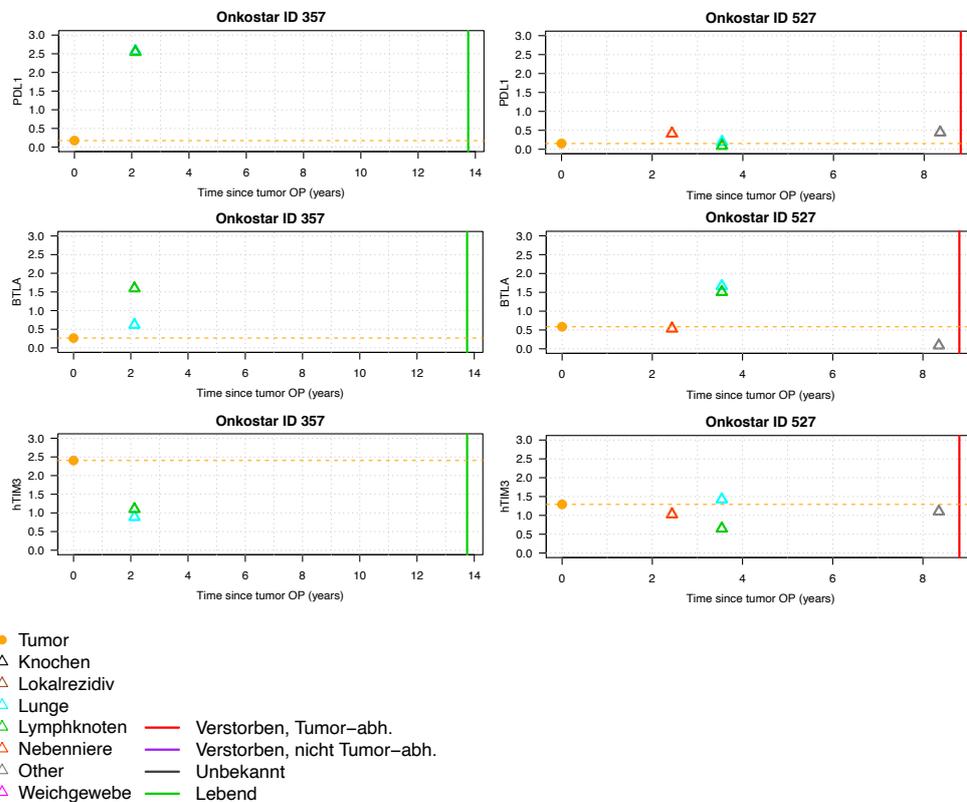


Abbildung 31: Zeitliche Verläufe von Metastasen und Proteinexpression.

Die x-Achse stellt den zeitlichen Verlauf in Jahren dar. Auf der y-Achse ist die Proteinexpression für PD-L1 (oben), BTLA (mittig) und hTIM3 (unten) aufgetragen, die mit dem Score_{TS} berechnet wurde. Eine Legende ist unter den Fallbeispielen aufgeführt. Abgebildet sind zwei Fallbeispiele für zeitliche Verläufe der Metastasen und der Proteinexpression. Die Onkostar ID ist anonymisiert. Für den linken Patienten betrug das FUP ca. 14 Jahre nach Tumoroperation. Es wurde je eine Lungen- und eine Lymphknotenmetastase im zeitlichen Verlauf diagnostiziert. Der Patient war zum Zeitpunkt des FUP noch am Leben. Bei dem rechten Patienten wurden im Verlauf vier Metastasen diagnostiziert, die Lokalisation lässt sich mittels Legende nachvollziehen. Das FUP betrug ca. neun Jahre. Endpunkt für das FUP des zweiten Patienten war tumorabhängiges Versterben. Die BTLA-Expression steigt zunächst tendenziell an und sinkt dann wieder ab, hTIM3 steigt bzw. sinkt zunächst und nimmt im Verlauf ähnliche Werte wie zu Anfang an und PD-L1 sinkt zunächst leicht ab, um dann wieder anzusteigen.

3.6.1 Evaluation der Proteinexpression im Metastasengewebe im zeitlichen Verlauf

Zeitliche Expressionsverläufe wurden zusätzlich solitär in den Metastasen (n = 230) untersucht. Da die Expressionswerte für PD-L1, BTLA und hTIM3 nicht normalverteilt sind wurde die Normalverteilungstransformation aus dem R-coin-package verwendet und der Zusammenhang mit der Zeit anschließend in einem linearen mixed model mit Modellierung der Zeit durch eine spline-Funktion untersucht. Der zugehörige F-Test ergibt hier einen unadj. p-Wert von 0,02 für die Assoziation mit BTLA.

Danach haben Metastasen nach zehn Jahren im Mittel einen ca. 1,6-fach niedrigere BTLA-Expression als Metastasen, die nach ein bis zwei Jahren auftreten (Tief- vs. Hochpunkt der Kurve). Allerdings ist der Zusammenhang nach multiplem Testen nicht mehr signifikant und die Werte steigen nach zehn Jahren im Mittel wieder nicht-signifikant an.

Vergleichend kann im zeitlichen Verlauf in Abb. 31 für Onkostar ID 527 nachvollzogen werden, dass sich die Ergebnisse in den vorhandenen Metastasen decken. Die BTLA-Expression steigt in den ersten Jahren tendenziell an und sinkt anschließend bei ca. acht Jahren wieder ab.

Für PD-L1 ($p = 0,335$) und hTIM3 ($p = 0,139$) ergeben sich in den Tests nicht-lineare sowie nicht-signifikante Assoziationen (s. Abb. 32).

Analog kann hier jedoch vergleichend festgestellt werden, dass die hTIM3-Expression nach ca. vier Jahren im Vergleich zu ca. zweieinhalb Jahren zumindest in einer Metastase sinkend ist und nach ca. acht Jahren wieder erhöht ist (s. Abb. 32).

Für PD-L1 sieht man für Onkostar ID 527 (s. Abb. 32) zunächst nach ca. vier Jahren vs. ca. zwei Jahren eine sinkende Expression und schließlich wieder steigende Werte, was sich ebenfalls mit den untenstehenden Ergebnissen deckt.

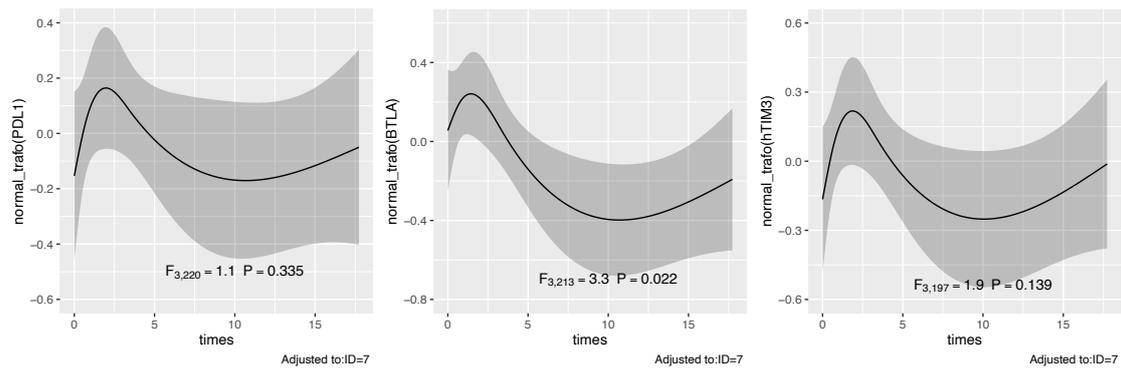


Abbildung 32: Proteinexpression in den Metastasen (n = 230) im zeitlichen Verlauf. Abgebildet sind zeitliche Expressionsverläufe von PD-L1 (links), BTLA (mittig) und hTIM3 (rechts). Es wurde die Normalverteilungstransformation aus dem R-coin-package verwendet und der Zusammenhang mit der Zeit anschließend in einem linearen mixed model mit Modellierung der Zeit durch eine spline-Funktion untersucht. Der zeitliche Verlauf in Jahren ist auf der x-Achse gegen die Proteinexpression auf der y-Achse aufgetragen. Die Proteinexpression wurde mit dem ScoreTS berechnet.

3.6.2 Evaluation der Proteinexpression in Metastasen vs. Primärtumor im zeitlichen Verlauf

Für die Metastasen wurden Korrelationen zwischen zeitlichem Abstand zur Primärtumor-OP und Differenz zur Tumor-Expression in einem mixed model über alle $n = 59$ Patienten mit Tumor und Metastasen-Daten analysiert. Die Zeitvariable wurde dabei jeweils mittels eines Splines modelliert. Die Tests der zeitlichen Trends weisen alle p-Werte zwischen 2 % und 10 % auf, allerdings sind die Zusammenhänge nicht-linear. Die Effekte entstehen v. a. aufgrund der Veränderungen in den ersten fünf bis zehn Jahren nach Primärtumor-OP.

Für PD-L1 ($p = 0,022$) erhöht sich die Expression in den Metastasen nach ca. zwei Jahren im Mittel um ca. 0.9, ist nach ca. sieben Jahren aber wieder auf Niveau des Tumors.

Für BTLA ($p = 0,096$) und hTIM3 ($p = 0,099$) war die Korrelation zwischen zeitlichem Verlauf und Differenz zur Tumor-Expression nicht signifikant (s. Abb. 33).

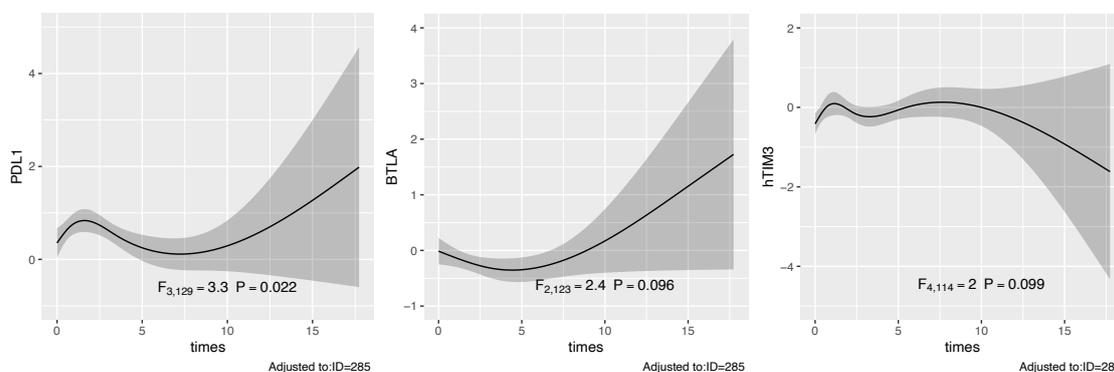


Abbildung 33: Proteinexpression in Metastasen vs. Primärtumor im zeitlichen Verlauf.

Korrelation zwischen zeitlichem Abstand zur Tumor-OP in Jahren (x-Achse) und Differenz zur Tumor-Expression (y-Achse) von PD-L1 (links), BTLA (mittig) und hTIM3 (rechts) in einem mixed model über alle $n = 59$ Patienten mit Tumor und Metastasen-Daten analysiert. Die Zeitvariable wurde dabei jeweils mittels eines Splines modelliert.

3.7 Evaluation der Proteinexpression in Zusammenhang mit somatischen Mutationen

In der Arbeit von *Sauter-Meyerhoff et al.* wurden zu vorhandenen Metastasen aus dem Kollektiv (n = 82) Mutationsanalysen mittels eines neu etablierten Genpanels durchgeführt. Das verwendete Genpanel enthält n = 32 für das RCC bekannt wichtige Kandidatengene u. a. VHL, PBRM1 und MTOR [192].

Die Daten zu somatischen Mutationen in den Metastasen wurden zur Proteinexpression von PD-L1 im Gewebe korreliert. Ausgewertet wurden nur die Gene mit > 5 Fällen mit Mutationen (n = 26). Die ausgewerteten Gene sowie die Fallzahlen lassen sich untenstehenden Tab. 16 entnehmen. Für BTLA und hTIM3 konnten in den Analysen keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden, weswegen diese hier nicht explizit dargestellt werden.

Tabelle 16: Übersicht ausgewertete Gene vs. PD-L1-Expression in Metastasen. Aufgelistet (oben) sind die ausgewerteten Gene sowie untenstehend die Anzahl der Fälle mit Mutationen. **Fett unterstrichen gedruckt sind Gene mit signifikanten Ergebnissen.**

Gene	ABL1	ARID1A	ATM	BAP1	CTNNB1	FH	FLT3	GNA11	HRAS	KDM5C	MET	MTOR	NF2	PBRM1	PIK3CA	PTEN	PTPN11	RB1	SETD2	STAG2	STK11	TERT	TP53	TSC1	TSC2	VHL
Fälle mit Mutationen	2	21	17	18	2	3	2	1	2	25	1	18	10	32	12	7	2	1	22	16	2	12	9	12	12	38

Für die Analysen der Genvarianten vs. Proteinexpression wurde nicht beachtet, dass einige Metastasen vom selben Patienten stammen. Für die somatische Mutationsanalyse wurden zwei Instrumente verwendet. Zum einen das „Sortieren von intoleranten und toleranten Varianten“ (engl.: Sorting Intolerant From Tolerant = SIFT) und die Polymorphismus-Phänotypisierung (engl.: Polymorphism Phenotyping = PolyPhen). Korreliert wurden zunächst alle Varianten („all variants“) sowie speziell Mutationen, die von SIFT oder bzw. und PolyPhen als „deleterious“ (engl. für „schädlich“) bzw. „possibly/probably damaging“ (engl. für „möglicherweise/wahrscheinlich schädlich“) eingeteilt wurden. Nach Adjustierung waren mTOR (BH-adj. p = 0,03) und VHL (BH-adj. p = 0,03) vs. PD-L1-Expression signifikant für alle Varianten. Die unadjustierten und Benjamini-Hochberg adjustierten p-Werte für mTOR und VHL lassen sich nachfolgend Tab. 17 entnehmen.

Tabelle 17: Tumormutationslast (mTOR, VHL) vs. Proteinexpression (PD-L1).

Die Tabelle enthält sowohl unadjustierte als auch adjustierte (Benjamini-Hochberg) p-Werte für die Korrelation zwischen PD-L1-Expression auf Proteinebene vs. allen Mutationsvarianten, SIFT oder PolyPhen schädlichen/möglicherweise schädlichen Mutationen sowie SIFT und PolyPhen schädlichen/möglicherweise schädlichen Mutationen von mTOR und VHL.

	All variants		SIFT OR PolyPhen del/dam		SIFT AND PolyPhen del/dam	
	Unadj. p	BH-adj. p	Unadj. p	BH-adj. p	Unadj. p	BH-adj. p
MTOR	0.0026	0.03	0.0015	0.015	0.016	0.069
VHL	0.0037	0.03	0.95	0.96	0.42	0.56

Die PD-L1-Expression auf Proteinebene ist positiv assoziiert mit einer hohen Mutationslast von mTOR. Zunächst wurden alle Varianten miteinbezogen. Je mehr mTOR-Varianten („all variants“) nachgewiesen wurden, desto höher wurde PD-L1 in den Metastasen exprimiert ($p = 0,0026$; BH-adj. $p = 0,03$). Damit hatten Tumoren mit der im Median höchsten PD-L1-Expression auch die meisten Mutationen im mTOR-Gen. Ausgewertet wurden $n = 54$ Tumoren mit keiner Variation in mTOR (Mittelwert: 0,8; Median: 0,49; Range: 0,03-2,61), $n = 11$ mit einer Variante (Mittelwert: 1,12; Median: 0,72; Range: 0,09-2,63) und $n = 6$ mit zwei Varianten (Mittelwert: 2,56; Median: 2,59; Range: 2,25-2,77) (s. Abb. 34, A).

Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen PD-L1-Expression und Tumormutationslast wurden außerdem für SIFT oder PolyPhen schädliche/möglicherweise schädliche Mutationen durchgeführt. Der Zusammenhang war ebenfalls signifikant ($p = 0,0015$; BH-adj. $p = 0,015$). Untersucht wurden $n = 63$ Tumoren, die keine derartige Variante aufwiesen (Mittelwert: 0,86; Median: 0,56; Range: 0,03-2,77), $n = 7$ mit einer Variante (Mittelwert: 2,03; Median: 2,53; Range: 0,5-2,68) für mTOR und $n = 1$ mit zwei Varianten (Mittelwert: 2,25; Median: 2,25; Range: 2,25-2,25). Im Median wiesen die Tumoren mit einer Variante für mTOR die höchste PD-L1-Expression auf Proteinebene auf (s. Abb. 34, B).

Zusätzlich wurde untersucht, ob es eine Assoziation mit der PD-L1-Expression im Tumor und Mutationen im mTOR-Gen gibt, die in SIFT und Polyphen schädliche/möglicherweise schädliche Varianten aufweisen.

Der Zusammenhang war zwar unadjustiert signifikant ($p = 0,016$), nach Adjustierung allerdings nicht mehr (BH-adj. $p = 0,069$). Die Tumoren, die mTOR-Varianten enthielten ($n = 5$; Mittelwert: 2,08; Median: 2,49; Range: 0,5-2,63), wiesen auch die höhere PD-L1-Expression auf als die Tumoren, die keine Mutationen im mTOR-Gen aufwiesen ($n = 66$; Mittelwert: 0,92; Median: 0,7; Range: 0,03-2,77) (s. Abb. 34, C).

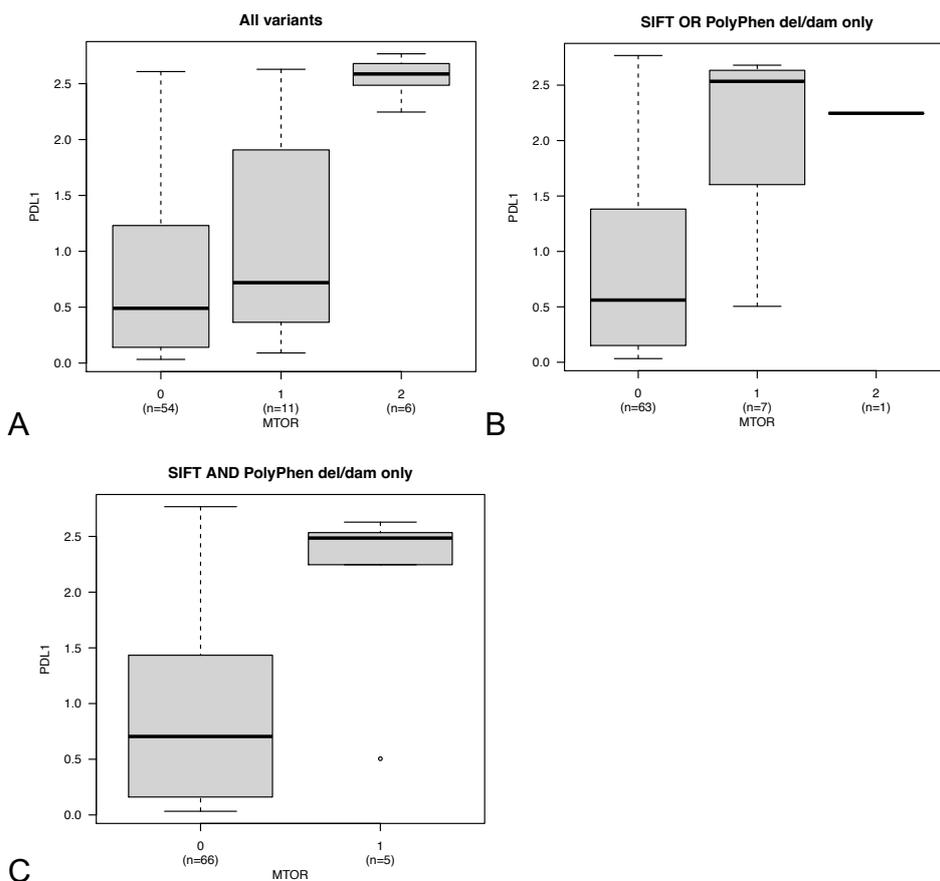


Abbildung 34: PD-L1-Expression vs. Tumormutationslast (mTOR).

Die Abbildungen zeigen Turkey-Boxplots für die Korrelation der PD-L1-Expression im Metastasengewebe vs. Tumormutationslast für mTOR. Die Expression (y-Achse) wurde mit dem ScoreTS berechnet. Die mTOR-Varianten (x-Achse) wurden mittels NGS untersucht. Die schwarze Linie markiert den Median der jeweiligen Gruppe. Die obere bzw. untere Grenze der Box sind das 25%- bzw. das 75%-Quantil. Die Länge der Boxen definiert den Interquartilsabstand.

A: Boxplots für Zusammenhang PD-L1-Expression vs. Tumormutationslast "all variants" (mTOR).

B: Boxplots für Zusammenhang PD-L1-Expression vs. Tumormutationslast "SIFT or PolyPhen" (mTOR).

C: Boxplots für Zusammenhang PD-L1-Expression vs. Tumormutationslast "SIFT and PolyPhen" (mTOR).

Analog wurde die Tumormutationslast im VHL-Gen vs. Proteinexpression korreliert. Die PD-L1-Expression auf Proteinebene ist negativ assoziiert mit einer hohen Mutationslast von VHL. Zunächst wurden alle Varianten miteinbezogen. Je mehr VHL-Varianten („all variants“) nachgewiesen wurden, desto niedriger wurde PD-L1 in den Metastasen exprimiert ($p = 0,0037$; BH-adj. $p = 0,03$). Damit hatten Tumoren mit der im Median niedrigsten PD-L1-Expression die meisten Mutationen im VHL-Gen. Ausgewertet wurden $n = 34$ Tumoren mit keiner Variation in VHL (Mittelwert: 1,34; Median: 1,3; Range: 0,03-2,77), $n = 36$ mit einer Variante (Mittelwert: 0,7; Median: 0,39; Range: 0,04-2,68) und $n = 1$ mit zwei Varianten (Mittelwert: 0,09; Median: 0,09; Range: 0,09-0,09) (s. Abb. 35, A).

Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen PD-L1-Expression und Tumormutationslast wurden ebenfalls für SIFT oder PolyPhen schädliche/möglicherweise schädliche Mutationen durchgeführt. Der Zusammenhang war nicht statistisch signifikant ($p = 0,95$; BH-adj. $p = 0,96$). Untersucht wurden $n = 58$ Tumoren, die keine derartige Variante aufwiesen (Mittelwert: 1; Median: 0,73; Range: 0,03-2,77) und $n = 13$ mit einer Variante für VHL (Mittelwert: 0,99; Median: 0,51; Range: 0,06-2,68). Im Median wiesen die Tumoren mit einer Variante für VHL die niedrigere PD-L1-Expression auf Proteinebene auf (s. Abb. 35, B).

Zusätzlich wurde hier ebenfalls untersucht, ob es eine Assoziation mit der PD-L1-Expression im Tumor und Mutationen im VHL-Gen gibt, die in SIFT und PolyPhen schädliche/möglicherweise schädliche Varianten aufweisen. Der Zusammenhang war nicht signifikant ($p = 0,42$; BH-adj. $p = 0,56$). Die Tumoren, die VHL-Varianten enthielten ($n = 11$; Mittelwert: 0,97; Median: 0,72; Range: 0,03-2,77), wiesen eine höhere PD-L1-Expression auf als die Tumoren, die keine Mutationen im VHL-Gen aufwiesen ($n = 60$; Mittelwert: 1,16; Median: 0,86; Range: 0,14-2,68) (s. Abb. 35, C).

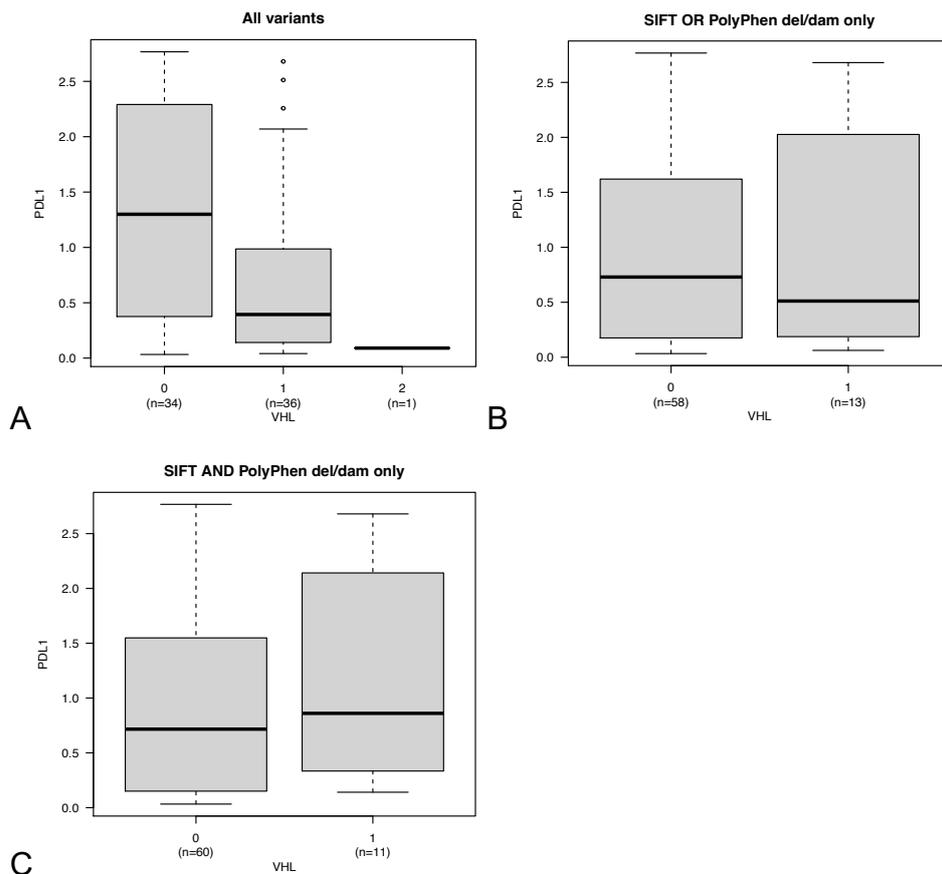


Abbildung 35: PD-L1-Expression vs. Tumormutationslast (VHL).

Die Abbildung zeigt Turkey-Boxplots für die Korrelation der PD-L1-Expression im Metastasengewebe vs. Tumormutationslast für VHL. Die Expression (y-Achse) wurde mit dem ScoreTS berechnet. Die VHL-Varianten (x-Achse) wurden mittels NGS untersucht. Die schwarze Linie markiert den Median der jeweiligen Gruppe. Die obere bzw. untere Grenze der Box sind das 25 %- bzw. das 75 %-Quantil. Die Länge der Boxen definiert den Interquartilsabstand.

A: Boxplots für Zusammenhang PD-L1-Expression vs. Tumormutationslast "all variants" (VHL).

B: Boxplots für Zusammenhang PD-L1-Expression vs. Tumormutationslast "SIFT or PolyPhen" (VHL).

C: Boxplots für Zusammenhang PD-L1-Expression vs. Tumormutationslast "SIFT and PolyPhen" (VHL).

3.8 Evaluation der Auswirkungen einer systemischen Therapie auf die Proteinexpression

Ausgewertet wurden die Daten von n = 111 Patienten. Die Patientendaten sind anonymisiert. Therapieangaben waren von n = 82 Patienten vorhanden. Davon lag für n = 31 Patienten der Beginn einer Systemtherapie vor der OP einer Metastase, für welche die Expression in den Genen PD-L1, BTLA und hTIM3 analysiert wurde. Seltene Medikamente wurden als „other“ zusammengefasst. Ein Wechsel der Systemtherapie erfolgte entweder aufgrund eines Tumorprogresses oder aufgrund intolerabler Nebenwirkungen für den Patienten.

Es handelt sich bei den folgenden Auswertungen um beispielhafte Verläufe von Patienten zur Demonstration. Aufgrund der wenigen Daten und vielen Einflussfaktoren konnten hieraus keine Schlüsse gezogen werden. Die Abfolge der Metastasen und der erhaltenen Systemtherapien wurde graphisch aufgearbeitet (s. Abb. 36).

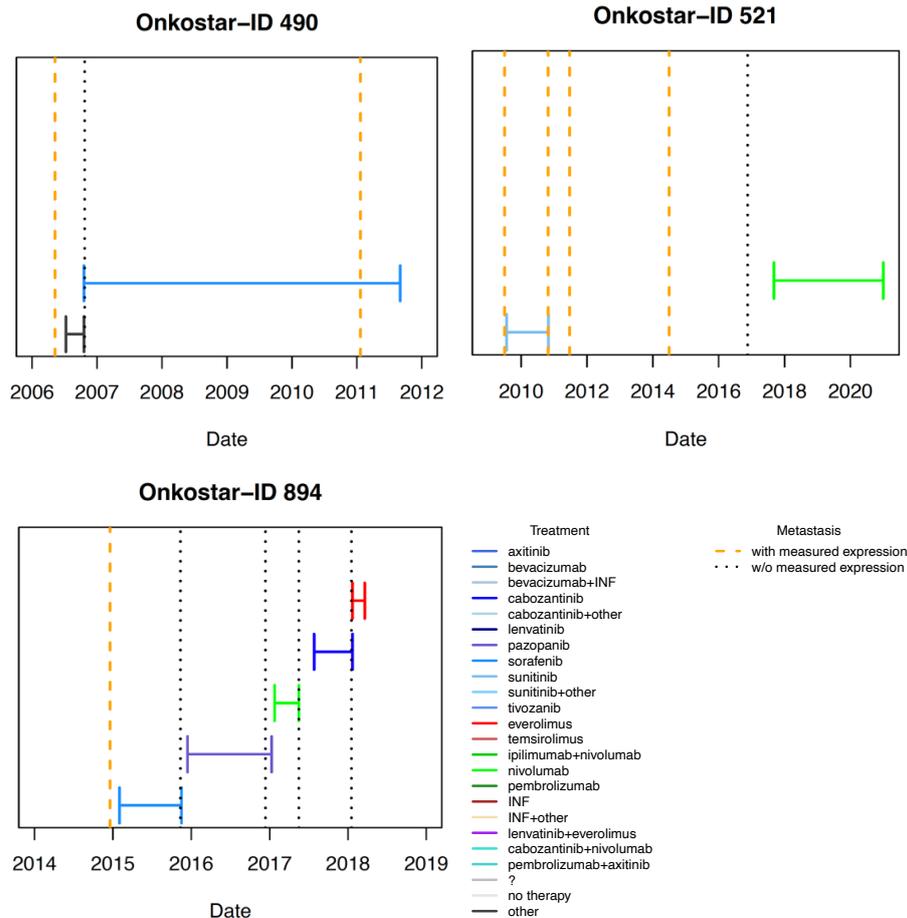


Abbildung 36: Abfolge der Metastasenoperationen und der verabreichten Systemtherapien (n = 82).

Beispielhaft sind die Abfolgen von Metastasen-OP und verabreichten Systemtherapien für n = 3 Patienten dargestellt. Eine Legende ist der Abbildung rechts unten zu entnehmen. Auf der x-Achse ist die Zeit des FUP in Kalenderjahren aufgetragen. Bei dem Patienten links oben wurden n = 3 Metastasen diagnostiziert. Für n = 2 Metastasen konnte die Proteinexpression gemessen werden, davon je n = 1 nach bzw. vor erhaltener Systemtherapie. Der Patient hat insgesamt während des FUP (ca. fünf Jahre) zwei verschiedene Systemtherapien erhalten. Unter „Sorafenib“ (TKI) war der Patient fast fünf Jahre stabil. Für den Patienten rechts oben konnte zu n = 4 (von n = 5) Metastasen nach erhaltener Systemtherapie die Proteinexpression gemessen werden. Das FUP betrug über zehn Jahre. Für den Patienten links unten konnte die Proteinexpression von n = 1 Metastase (von n = 5) vor Systemtherapie gemessen werden. Der Patient hatte bei einem FUP von ca. drei Jahren n = 5 verschiedenen Systemtherapien. Therapiewechsel erfolgte bei Tumorprogress.

Unter den $n = 31$ Patienten befinden sich $n = 18$ mit TKI-Behandlung, $n = 6$ erhielten einen mTOR-Inhibitor, $n = 5$ ICI, $n = 2$ „others“ und jeweils $n = 1$ Patient erhielt TKI + mTOR-Inhibitor, TKI + other bzw. Interferon (INF) als letzte eingetragene Behandlung vor der jeweiligen Metastasen-OP. Dabei wurde für $n = 3$ Patienten die Expression in mehreren Metastasen gemessen, mit Behandlung mit Medikamenten aus unterschiedlichen Wirkstoffklassen vor OP (s. Abb. 37).

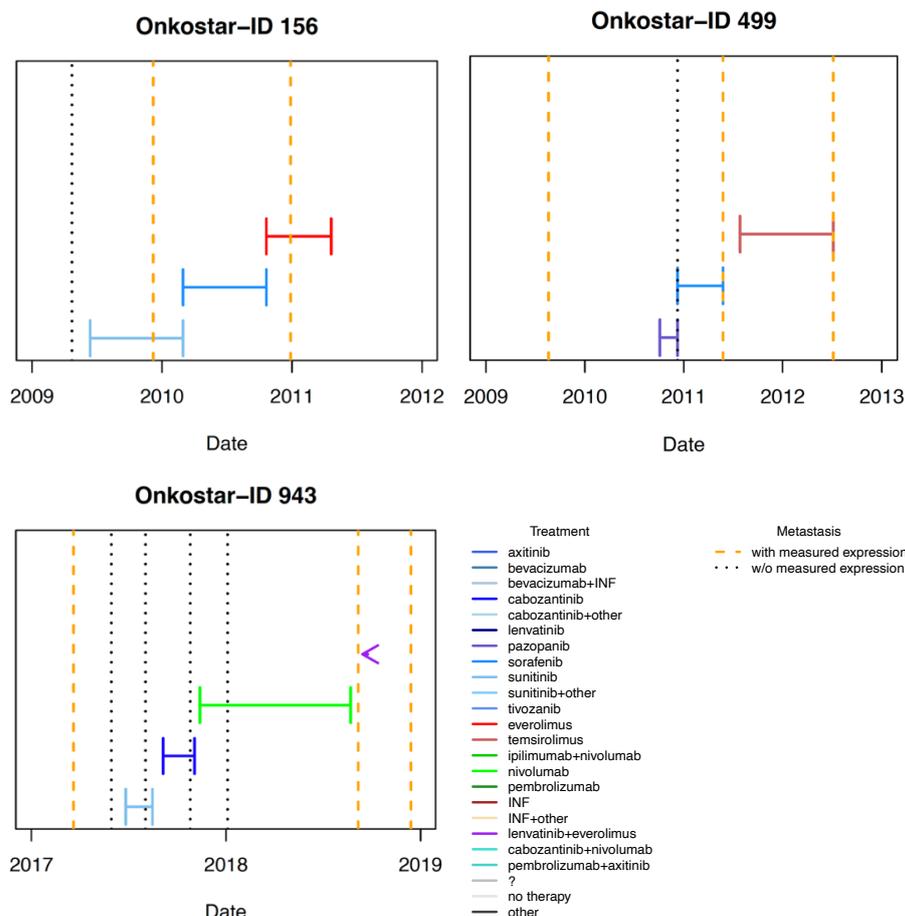


Abbildung 37: Abfolge der Metastasenoperationen und der präoperativ erhaltenen Systemtherapien ($n = 31$).

Beispielhaft sind die Abfolgen von Metastasen-OP und verabreichten Systemtherapien für $n = 3$ Patienten dargestellt. Eine Legende ist der Abbildung rechts unten zu entnehmen. Auf der x-Achse ist die Zeit des FUP in Kalenderjahren aufgetragen. Bei dem Patienten links oben wurden $n = 3$ Metastasen diagnostiziert. Für $n = 2$ Metastasen konnte die Proteinexpression nach Systemtherapie aus unterschiedlichen Wirkstoffklassen gemessen werden. Der Patient hat insgesamt während des FUP (ca. drei Jahre) drei verschiedene Systemtherapien erhalten. Für den Patienten rechts oben konnte zu $n = 3$ (von $n = 4$) Metastasen nach Systemtherapie unterschiedlicher Wirkklasse die Proteinexpression gemessen werden. Das FUP betrug ca. drei Jahre. Für den Patienten links unten konnte die Proteinexpression von $n = 3$ Metastasen (von $n = 7$) nach unterschiedlich wirkender Systemtherapie gemessen werden. Der Patient hatte bei einem FUP von ca. zwei Jahren $n = 4$ verschieden Systemtherapien.

Zur Analyse der $n = 31$ Patienten wurde die Expression vs. die letzten vorher eingetragenen Behandlungen in einem mixed model verglichen und dabei auch TKI + mTOR-Inhibitor, TKI + other und INF in „others“ mit aufgenommen (s. Abb. 38, A).

Für PD-L1 ($p = 0,02$), BTLA ($p = 0,737$) und hTIM3 ($p = 0,032$) ergaben die Analysen nach multiplen Tests keinen signifikanten Unterschied in der Proteinexpression vs. Systemtherapie.

In einem zweiten mixed model wurde zusätzlich die Zeit zwischen Beginn der Therapie und OP-Datum sowie die Interaktion zwischen dieser Zeit und den Wirkstoffklassen als zusätzliche Variable aufgenommen (s. Abb. 38, B).

Der eingezeichnete p-Wert für PD-L1 ($p = 0,028$), BTLA ($p = 0,67$) und hTIM3 ($p = 0,532$) aus der Varianzanalyse bezieht sich immer auf den Vergleich der Expression zwischen den Klassen. Nach Adjustierung für multiples Testen ist keiner der aufgeführten Effekte signifikant.

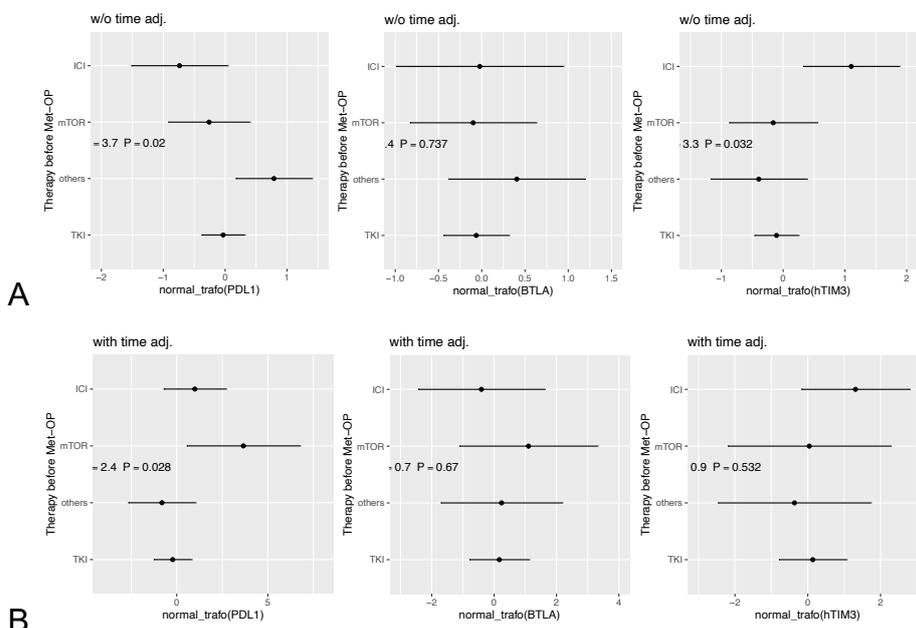


Abbildung 38: Proteinexpression in den Metastasen vs. Systemtherapie ($n = 31$). Auf der x-Achse sind die Proteinexpressionswerte und auf der y-Achse die Systemtherapien aufgetragen. Die Proteinexpression wurde mit dem ScoreTS bestimmt. Links ist die Analyse für PD-L1, mittig für BTLA und rechts für hTIM3 aufgezeigt.
A: Abgebildet sind mixed models für die Proteinexpression in den Metastasen vs. Systemtherapie ($n = 31$).
B: Abgebildet sind mixed models für die Proteinexpression in den Metastasen vs. Systemtherapie mit zusätzlicher Varianzanalyse für die Zeit von OP bis Therapiebeginn und der Interaktion dieser Zeit mit den Wirkstoffklassen als Variablen ($n = 31$).

3.9 Zytotoxizität von Nivolumab auf ALI Tumormodelle

Für die Patientenabgeleiteten ALI Tumormodelle wurde Frischgewebe aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen kultiviert. Das genaue Vorgehen ist dem Material- und Methodikteil zu entnehmen. Während der Kultivierung wurden die TC fotografisch festgehalten, um Wachstum und Veränderungen digital zu dokumentieren. Es wurden mehrere Modelle generiert, die für spätere Analysen zur Verfügung stehen. Im Folgenden sind beispielhaft Fotos einzelner Zellkulturmodelle zu sehen, wovon später eines behandelt wurde.

Es handelt sich hierbei histologisch um ccRCC-Gewebe ALI TC (s. Abb. 39).

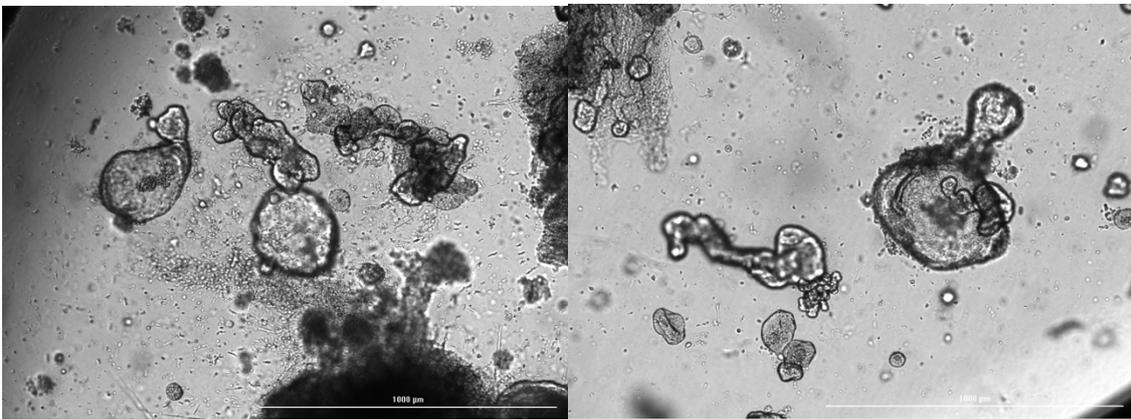


Abbildung 39: Cellimaging der ALI Tumormodelle.

Die Modelle wurden für die Zellkulturversuche charakterisiert und zunächst immunhistochemisch angefärbt. Nach einer HE-Übersichtsfärbung wurden die Modelle mit den bereits zuvor verwendeten Antikörpern gegen PD-L1, CTLA4 und zu Kontrollzwecken gegen CD8 angefärbt. Exemplarisch ist ein Foto eines weiteren Modells dargestellt (s. Abb. 40).

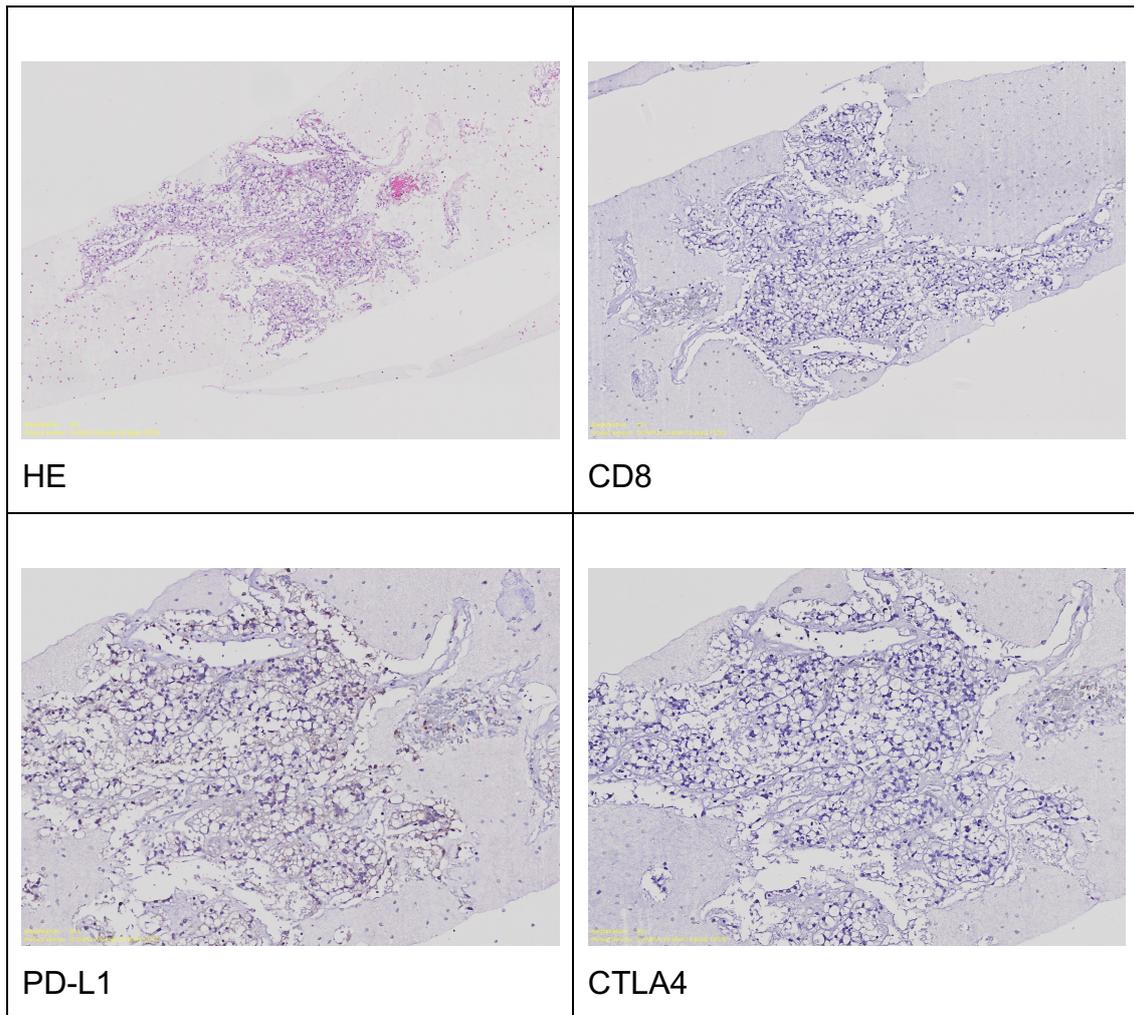


Abbildung 40: Immunhistochemische Charakterisierung eines ALI Tumormodells.

Ein TC-Modell eines ccRCC wurde in einem Zytotoxizitätsversuch mit Nivolumab, einem monoklonalen Antikörper gegen PD-1 behandelt (s. Abb. 41). Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrollgruppe kultiviert (s. Abb. 42).

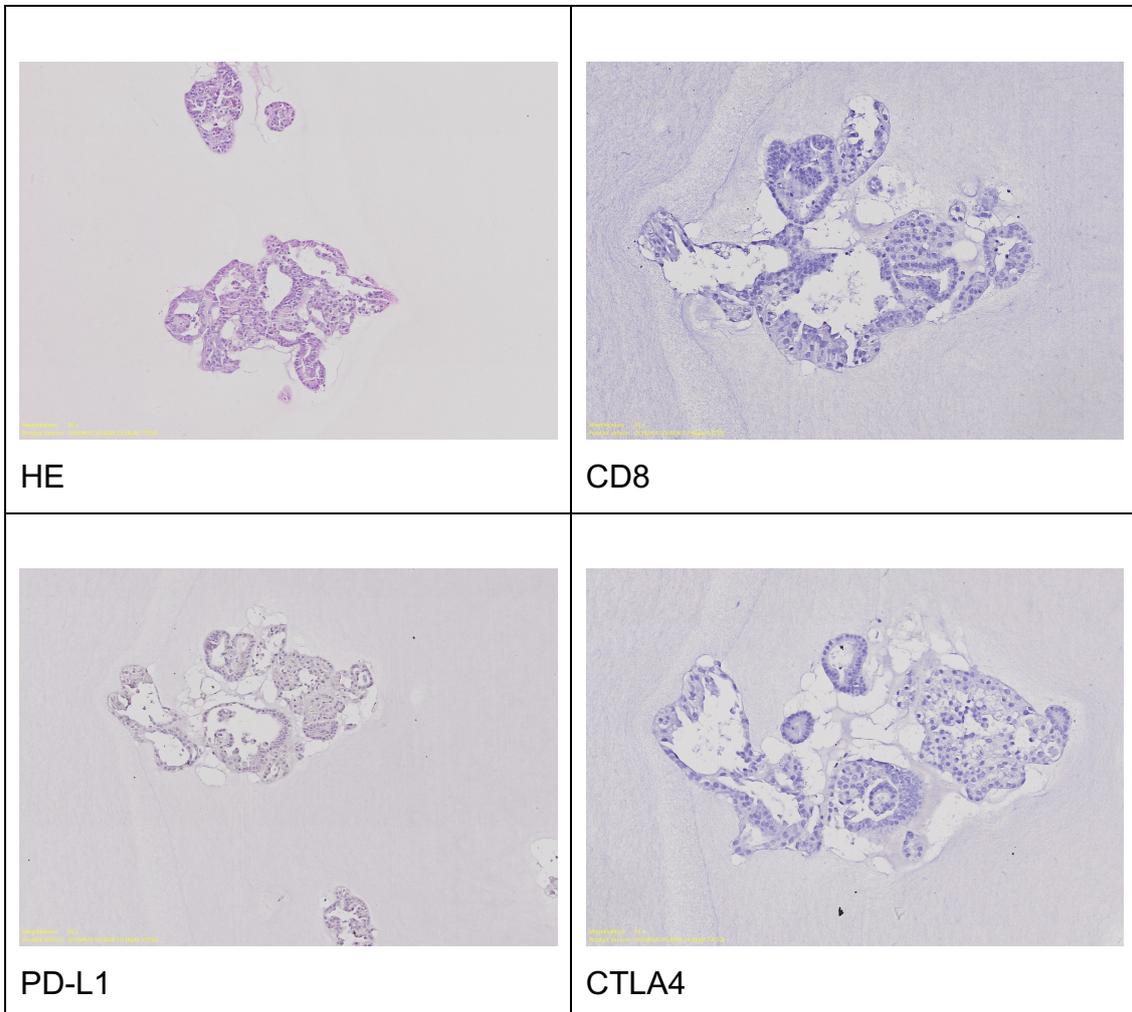


Abbildung 41: Immunhistochemie der mit Nivolumab behandelten Gewebekultur nach sieben Tagen.

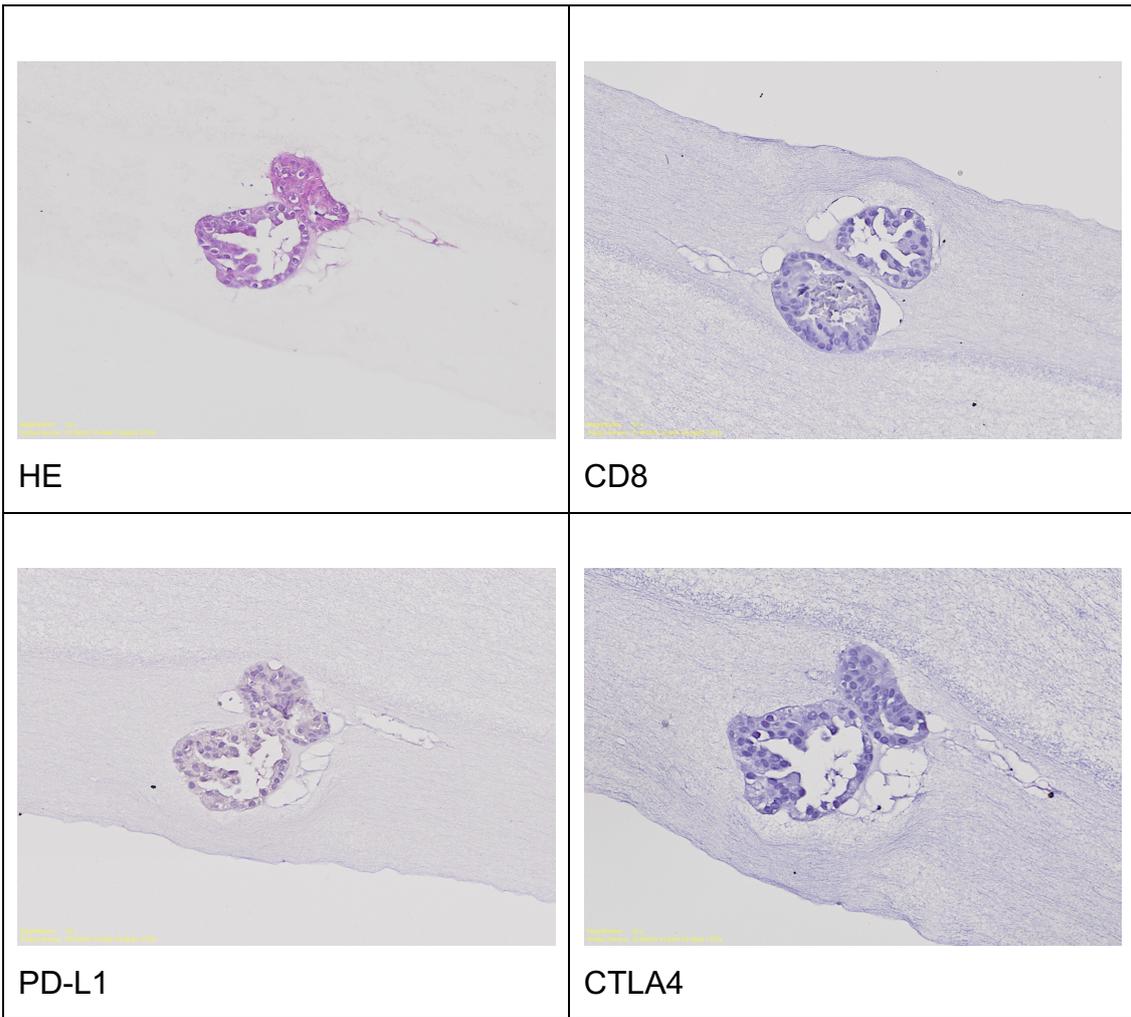


Abbildung 42: Immunhistochemie der Kontrollgruppe (unbehandelte Gewebekultur) nach sieben Tagen.

Die Effekte von Nivolumab auf die Zellzytotoxizität wurden photographisch dokumentiert (s. Abb. 43 und 44) und mit dem CellTox™ Green Cytotoxicity Assay untersucht.

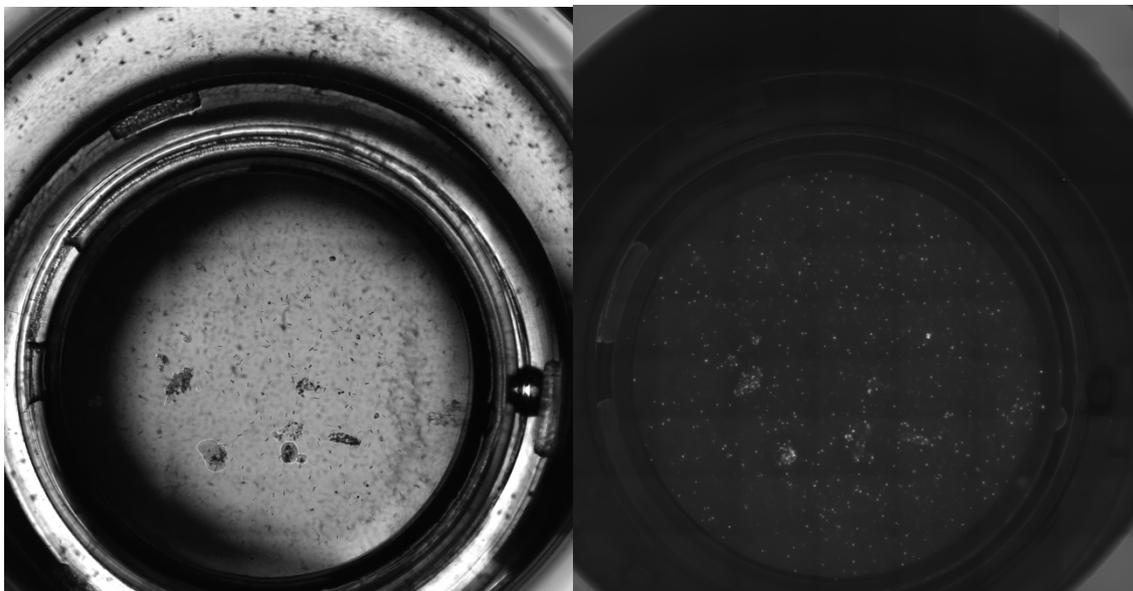


Abbildung 43: Cellimaging des CellTox™ Green Cytotoxicity Assay der mit Nivolumab behandelten Gewebekulturen nach sieben Tagen.

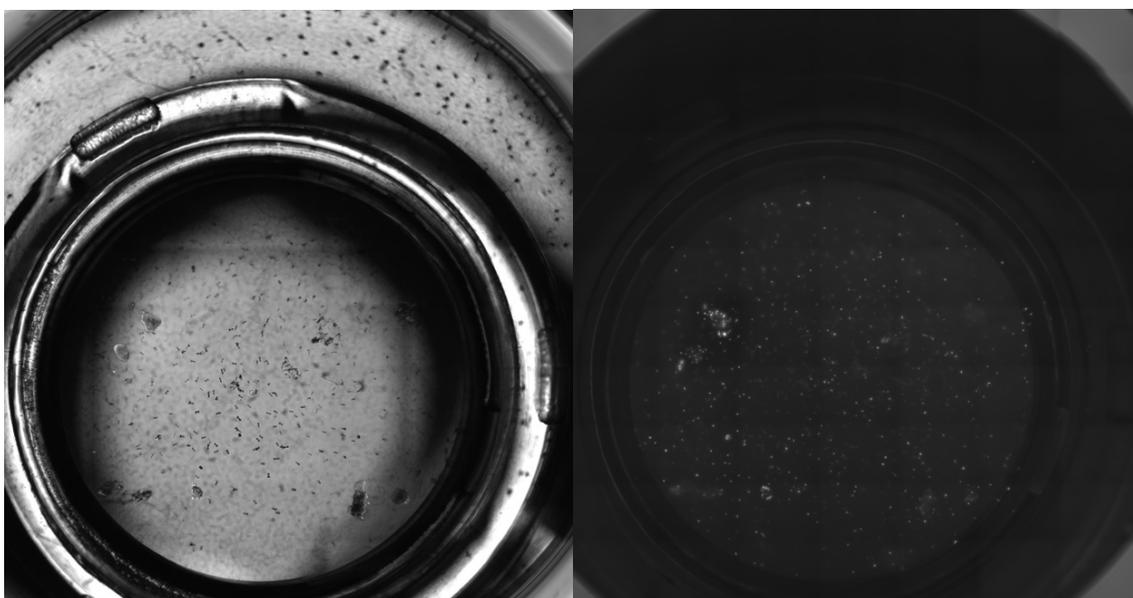


Abbildung 44: Cellimaging des CellTox™ Green Cytotoxicity Assay der Kontrollgruppe (unbehandelte Gewebekulturen) nach sieben Tagen.

Die Intensität der Färbung ist proportional zur Zelltoxizität. In den funktionellen Zellkulturtests für mit Nivolumab behandelte Gewebekulturen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe hat sich kein signifikanter Unterschied gezeigt. Es kam zu einer leichten Reduktion bzw. gesteigerten Zytotoxizität unter Behandlung mit Nivolumab im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Mittelwert +/- Standardabweichung 0,73 +/- 0,25 vs. 1 +/- 0,70) (s. Abb. 45).

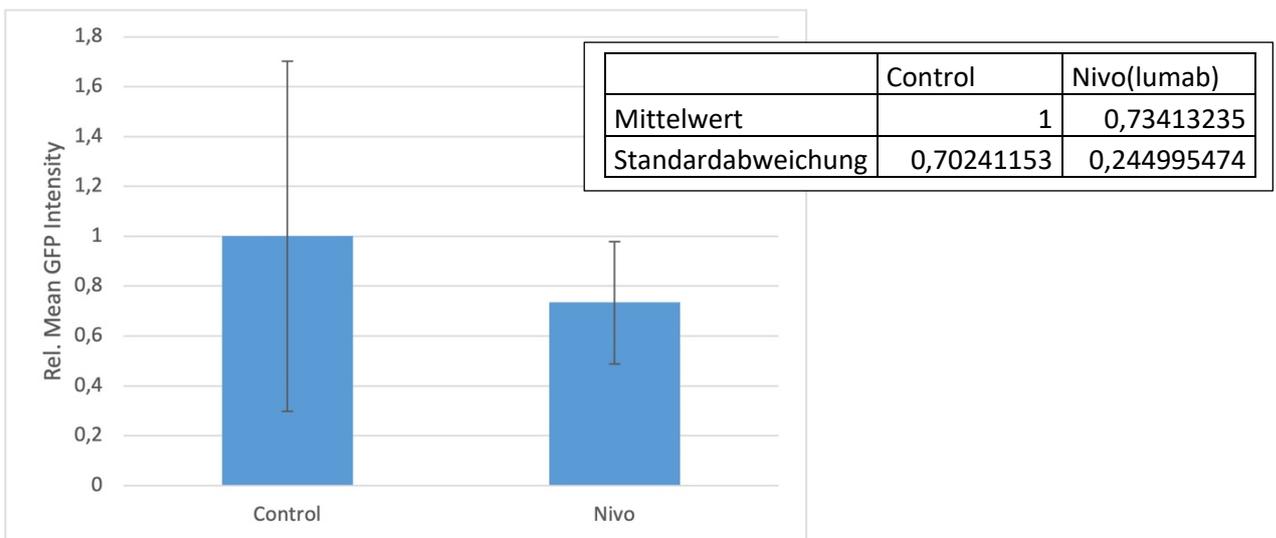


Abbildung 45: Ergebnisse des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays.

Die Abbildung zeigt Boxplots für die Ergebnisse CellTox™ Green Cytotoxicity Assays. Die Färbeintensität (y-Achse) war proportional zur Zytotoxizität. Für die verglichenen Gruppen (x-Achse) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den funktionellen Tests. Der untere und obere „Whisker“ markieren die Standardabweichung.

4 Diskussion

Zukünftig könnten prädiktive Biomarker in der Diagnostik des mRCC einen hohen Stellenwert haben. Diese müssten für ein hohes Maß an Objektivierung geprüft und einheitlich für Diagnosezwecke zugelassen werden. Trotz eines deutlichen Anstiegs der Ansprechrate und der Überlebenszeit mit den derzeitigen Kombinationstherapien aus IO-IO oder TKI-IO spricht eine nicht zu vernachlässigende Anzahl von Patienten aufgrund einer angeborenen oder erworbenen Resistenz nicht auf die Therapie an [191, 209]. Obwohl in einigen Studien potenzielle prognostische Biomarker identifiziert wurden, konnten sich die untersuchten Marker aufgrund ihrer unzureichenden Vorhersagekraft in der Klinik nicht durchsetzen. Derzeit gibt es keinen prädiktiven molekularen Biomarker, der in der klinischen Routine zur Steuerung einer personalisierten Therapie eingesetzt wird [103]. Die Entscheidung über die Art der systemischen Therapie basiert bisher lediglich auf der klinischen IMDC-Risikoklassifikation [189].

Ziel dieser Arbeit war es, die Proteinexpression der immunologischen Marker PD-L1, BTLA, hTIM3, CTLA4 und LAG3 in RCCs und korrespondierendem metastatischem Gewebe zu untersuchen sowie mögliche Korrelationen zu klinischen Merkmalen und somatischen Mutationen zu beleuchten. Insbesondere lag das Augenmerk auf der intertumoralen Heterogenität der Expression auf Proteinebene.

Zu Beginn wurden für die Analysen TMAs aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe gefertigt, um so ein hohes Maß an Standardisierung im immunhistochemischen Färbeprozess zu gewährleisten. Pro Patienten steht nur ein kleiner Gewebeausschnitt repräsentativ für das ganze Tumorgewebe zur Verfügung. Um bei dieser Technik keine Einbußen bei der Aussagekraft machen zu müssen, werden die Tumorbereiche zuvor sorgfältig histologisch beurteilt und außerdem mindestens zwei Stenzen aus unterschiedlichen Tumorregionen entnommen. Da die Gewebeschnitte aus den TMAs jedoch aufgrund der Schnitthöhe trotzdem einen variablen Tumorgehalt aufweisen können, ist die Qualität der Gewebe-Cores von größter Bedeutung. Die Proben werden mit

Paraffin haltbar gemacht, dennoch muss erwähnt sein, dass die Proben teilweise seit über 20 Jahren in der Pathologie gelagert werden, was zumindest auf DNA-Ebene Auswirkungen auf die Qualität des Gewebes hat. In der vorliegenden Arbeit wurden die immunhistochemischen Färbungen mit Hilfe eines computergestützten automatisierten Analyseprogrammes ausgewertet. Diese Art der Auswertung macht es möglich, ein objektives Ergebnis auf einer kontinuierlichen Skala zu ermitteln. Die durch die Software ausgewerteten Färbungen lassen sich außerdem reproduzieren, was als zusätzlicher Vorteil gewertet wird [197]. Im Vergleich zum menschlichen Auge können automatisierte Auswertungsprogramme besser zwischen feinen Unterschieden in der Färbeintensität, v. a. bei hohen und niedrigen Färbestärken, differenzieren, was zudem einen zeitlichen Vorteil gegenüber dem Scoringssystem des Pathologen bietet. Da auf einem TMA bis zu hundert Gewebestanzen Platz finden, die alle in einem Färbevorgang behandelt wurden, erfasst werden können, erlaubt diese softwarebasierte Technik die Auswertung von ganzen Kohorten in kurzer Zeit. Korrelationen zwischen Biomarkern und klinisch-pathologischen Eigenschaften können auf diese Weise hergestellt werden [198]. Einschränkungen bei der softwarebasierten Auswertung muss man dennoch einräumen. Die Software erlernt anhand der zu Beginn durchgeführten Trainingseinheit mit einer begrenzten Anzahl von Trainingsbildern alle in den Geweben vorkommenden Zelltypen zu unterscheiden. Das kann sehr schwierig sein, weil Tumoren aus einem komplexen Gemisch verschiedenster Zellen bestehen [198]. Außerdem wird das Trainieren der Software manuell durch einen Begutachter durchgeführt, was gleichzeitig einen gewissen Bias-Effekt mit sich bringt. Die in der vorliegenden Kohorte untersuchten Proben beliefen sich auf insgesamt $n = 111$ Primärtumoren und $n = 230$ Metastasen von $n = 111$ Patienten.

Wir konnten insgesamt ein sehr heterogenes Expressionsmuster der verschiedenen Immun-Checkpoints beim RCC nachweisen. Die untersuchten immunologischen Marker waren nicht nur in den Primärtumoren sehr uneinheitlich exprimiert, sondern auch in den Metastasen.

PD-L1 war in den Metastasen signifikant höher exprimiert als in den Primärtumoren. PD-L1 zeigte hierbei keine signifikanten

Expressionsunterschiede in Abhängigkeit der Lokalisation der Metastasen ($p = 0,22$). Jedoch waren auch diese Ergebnisse nicht homogen. Im Einklang mit unseren Ergebnissen zeigte eine frühere Arbeit mit 163 abgestimmten RCC-Gewebebaaren aus Primärtumor und Metastasen eine höhere Proteinexpression in Metastasen als in Primärtumoren ($p = 0,03$). Unter den verschiedenen Metastasen wurde PD-L1 besonders in Lungen-/Lymphknoten (37,5 %) und Knochenmetastasen (12,2 %) exprimiert [117]. Das inhomogene Expressionsmuster spiegelt den aktuellen Stand der Forschung wider. Die tumorale PD-L1-Expression ist einer der am besten untersuchten prädiktiven Biomarker für die Immuntherapie. Im Gegensatz zu anderen Tumorarten sind die Ergebnisse zur PD-L1-Expression als prädiktiver Biomarker für RCCs jedoch uneinheitlich und reichen von keiner bis zu einer eindeutigen Assoziation der PD-L1-Expression mit dem Ansprechen und dem Patientenergebnis [67, 71, 73, 110-112]. Die uneinheitlichen Ergebnisse könnten dadurch begründet sein, dass in den Arbeiten nicht immer der gleiche Antikörperklon verwendet wird, wovon die Bewertung in hohem Maße abhängig ist, wie eine Arbeit gezeigt hat [108]. Weitere mögliche Erklärungen für den begrenzten prädiktiven Wert der tumoralen PD-L1-Expression sind die dynamische Natur der PD-L1-Expression, die durch Behandlungen stark beeinflusst werden kann, sowie die intratumorale Heterogenität im Primärtumor und zwischen Primärtumor und Metastasen [108, 114, 117-121]. Aufgrund der begrenzten Aussagefähigkeit von PD-(L)1 als Marker in Tumorgewebe haben sich in den letzten Jahren einige Arbeiten auf die Rolle von löslichen Markern im Patientenblut konzentriert, um einen Erklärungsansatz für den fehlenden Zusammenhang der Expression auf Proteinebene und dem Ansprechen auf eine Systemtherapie zu finden. Eine spanische Arbeitsgruppe hat die Gewebeexpression von PD-1 und PD-L1 im Zentrum des Tumors und an der Invasionsfront sowie die Höhe des löslichen PD-1 und PD-L1 (engl.: soluble PD-(L)1 = sPD-(L)1) im Plasma in derselben Patientenkohorte hinsichtlich möglicher Wechselbeziehungen untersucht. Es handelte sich um Patienten mit ccRCC im metastasierten und nicht-metastasierten Stadium. Die Expression von PD-L1 und PD-1 im Tumorzentrum korrelierte positiv mit der gleichzeitigen Expression an der Tumorfront [210].

Diese positive Korrelation der intratumoralen Expression an verschiedenen Orten bietet einen umsetzbaren Diagnosefahrplan für RCC-Patienten, die sich einer OP unterziehen. In Kontrast hierzu bleiben jedoch die von *Gerlinger et al.* bahnbrechenden Untersuchungsergebnisse bezüglich der Tumorerheterogenität des RCC, in denen die Diversität der Biopsien je nach Herkunftsort bewiesen werden konnte [76, 166]. Eine neuere Arbeit aus Tübingen konnte außerdem zeigen, dass PD-L1 sowohl zentral als auch an der Invasionsfront eher schwach exprimiert war [211], was verlässliche Prognosen anhand des einzelnen Biomarkers schwierig erscheinen lässt und wiederum die These unterstützt, dass mehrere Tumorproben von Nöten sind, um die Vorhersagekraft zu erhöhen sowie die gesamte Tumorbilologie abbilden zu können. Die Analyse der löslichen Marker in der o. g. Studie ergab bei den Patienten deutlich niedrigere sPD-L1-Konzentrationen als bei gesunden Personen. Jedoch wiesen die Konzentrationen in beiden Gruppen eine hohe Variabilität auf. Insgesamt waren die Werte bei Patienten höher als bei Kontrollen, das Ergebnis war jedoch nicht statistisch signifikant. Hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs zwischen den Plasmaspiegeln dieser beiden Biomarker in Abhängigkeit von ihrer Expression im Tumorzentrum und an der Invasionsfront zeigte sich ein Trend für höhere PD-L1-Plasmaspiegel bei Patienten, deren Tumoren im Tumorzentrum, an der Grenze und in beiden Bereichen PD-L1⁺ waren. Dieser Trend war jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass der sPD-L1-Spiegel für die IMDC-Prognosegruppen in der Patientenpopulation mit metastasierendem ccRCC anstieg und auch mit dem klinischen Ansprechen von Patienten mit metastasierendem ccRCC, die eine systemische Therapie erhielten, assoziiert war [210]. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie, die Patienten mit ccRCC unter einer Therapie mit Nivolumab untersuchte. Bei den RCC-Patienten war eine progressive oder stabile Erkrankung mit einem Anstieg der sPD-L1-Werte unter Nivolumab-Therapie verbunden, während sich die mittleren sPD-L1-Werte bei Patienten mit objektivem Ansprechen nicht veränderten oder abnahmen [212]. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass PD-(L)1 als prognostischer Marker für das Therapieansprechen noch nicht hinreichend erforscht ist, möglicherweise

aber als Verlaufsparemeter unter einer Immuntherapie dienen kann. Jedoch zeigt sich in Kombination mit weiteren Untersuchungen wie der Höhe der löslichen Formen das große Potential dieser Biomarker.

Für BTLA gibt es keine früheren Studien bei Nierenkrebs. Hier fanden wir eine signifikant höhere BTLA-Expression in den Primärtumoren im Vergleich zu den entsprechenden Metastasen ($p = 0,037$). BTLA war in unserer Arbeit außerdem abhängig von der Lokalisation unterschiedlich stark exprimiert. In Lokalrezidiven, Lymphknoten und der Nebenniere war BTLA auf Proteinebene im Vergleich zu Lungen- und Knochenmetastasen signifikant höher exprimiert ($p = 0,028$). Damit bestätigen wir die intertumorale Heterogenität der Proteinexpression zwischen Primärtumor und entsprechender Metastase für PD-L1 und BTLA, wobei ein positiver Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von BTLA in den Metastasen immunologisch sensibler Organe wie den Lymphknoten und der Nebenniere bestehen könnte. In einer neuen Tübinger Arbeit war die BTLA-Expression hingegen im Normalgewebe am höchsten, mit schwacher Färbung im Tumorzentrum und an der Invasionsfront [211], wobei in dieser Arbeit nur klarzellige Primärtumoren betrachtet wurden.

Ähnlich zu sPD-(L)1 wurden auch für BTLA systemische Untersuchungen durchgeführt, da die intratumorale Expression bislang unzureichend erforscht ist und uneinheitliche Ergebnisse gezeigt hat. Wie einleitend beschrieben wurden in einer Studie Blutproben von Patienten mit einem ccRCC hinsichtlich der Zusammensetzung der Leukozyten vor und nach Nephrektomie untersucht. BTLA⁺/CD8⁺ T-Zellen zeigten hier Potential als Biomarker für die Tumormast bei Patienten mit lokalisiertem ccRCC [106]. Ob die systemische Analyse von Leukozyten weitere prognostische Vorhersagekraft besitzt, ist bislang nicht erforscht. BTLA wird eine wichtige Rolle beim Fortschreiten der Erkrankung zugeschrieben. So geht man davon aus, dass BTLA das Wachstum des Tumors beeinflusst [106, 131]. Inwieweit sich die Expression von BTLA als alleiniger Marker und therapeutisches Target eignet, muss in weiteren prospektiven Studien erörtert werden. Die eigenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass BTLA ein bisher unterschätztes inhibitorisches Protein ist, was die Therapiemöglichkeiten sowie die Prognose des RCC beeinflussen kann. Mit der

Entwicklung neuer zielgerichteter Immuntherapeutika gegen BTLA könnte sich die Prognose für die Patientengruppen, die unter Lokalrezidiven, Lymphknoten- oder Nebennierenmetastasen leiden verbessern. Dieser Ansatz erscheint in Zeiten der modernen Bildgebung und dadurch verbesserter Diagnostik durchaus praktikabel.

Für die Expression von hTIM3 in den Primärtumoren und den entsprechenden Metastasen hat sich in den Untersuchungen kein signifikanter Unterschied gezeigt. Eine Tübinger Arbeitsgruppe konnte in der bereits erwähnten Studie jedoch zeigen, dass hTIM3 am stärksten an der Invasionsfront exprimiert wurde, was die intratumorale Heterogenität der Tumorentität weiter unterstreicht [211]. In Bezug auf den Ort der Metastasen ergab sich ebenfalls kein Unterschied. Die prognostische Bedeutung der hTIM3-Expression beim RCC ist nach wie vor umstritten, und es liegen mehrere widersprüchliche Ergebnisse vor. Frühere immunhistochemische Studien zeigten, dass hTIM3 im Primärtumor stärker exprimiert wurde als in den Metastasen (53,0 % vs. 45,4 %), wobei die Expression in allen metastatischen Lokalisationen homogen war, mit Ausnahme der geringeren Expression in Knochenmetastasen im Vergleich zum Primärtumor ($p = 0,01$). Darüber hinaus war die hTIM3-Expression sowohl im Primärtumor als auch in Metastasen mit einem längeren PFS (HR 0,67, $p = 0,02$) und OS (HR 0,52, $p < 0,001$) assoziiert [213]. Die Ergebnisse mögen darauf hindeuten, dass hTIM3 als alleiniger prädiktiver Marker nicht zielführend ist, jedoch haben vielversprechende präklinische Studien darauf hingewiesen, dass die kombinierte Inhibition von PD-1 und hTIM3 zu einer Tumorregression führt, indem die T-Zell-Antwort verbessert wird [145]. Außerdem konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf eine Anti-PD-1-Therapie und der hTIM3-Expression auf Tumorzellen gibt [148], was nahelegt, dass hTIM3 eine nicht unwesentliche Rolle im Krankheitsprozess des RCC spielt. Um die Aussagekraft dieser Effekte zu beurteilen sind künftig weitere Studien von Nöten.

Die Marker CTLA4 und LAG3 haben hinsichtlich ihrer Expression in den Tumoren interessanterweise keinen signifikanten Unterschied gezeigt, obwohl ersterer bereits klinisch Anwendung in Form von Ipilimumab in Kombination mit

Nivolumab in der Erstlinie des RCC findet. Die ORR und das OS wurden durch die medikamentöse Blockade von CTLA4 in Kombination mit einer PD-1 Blockade in der CheckMate 214-Studie bei Patienten mit mittlerem und niedrigem Risiko erhöht. Dabei hatten Patienten mit einem hohen PD-L1 Expressionsniveau den größten Nutzen [71]. Bei der Betrachtung der Ergebnisse für CTLA4 und LAG3 muss beachtet werden, dass die beiden Marker vorwiegend auf Lymphozyten exprimiert werden [149, 152]. Die Auswertung anhand der TMAs hat sich damit als komplizierter erwiesen als die der anderen untersuchten Proteine. Da es insgesamt nur wenige Werte > 0 gab, das heißt mit CTLA4⁺ oder LAG3⁺ Zellen, wurden keine ausführlichen statistischen Tests durchgeführt, was die Aussagekraft in Bezug auf die Eignung als prädiktive Biomarker schmälert. In einer amerikanischen Studie wurde die LAG3-Proteinkonzentration auf Leukozyten in normalen Nieren in der Nähe von RCCs, Primärtumoren und passenden metastatischen Tumoren untersucht. Sie fanden heraus, dass die LAG3-Proteinkonzentrationen an metastatischen Stellen im Vergleich zu den entsprechenden Primärtumoren im Durchschnitt niedriger waren, und dass der Unterschied bei Patienten mit klinischen Hochrisikomerkmale (z. B. T-Stadium) ausgeprägter war. Die Gruppe konnte außerdem feststellen, dass der prognostische Wert der LAG3-Spiegel je nach der untersuchten Gewebestelle (Primärtumor vs. Metastasen) variiert und dass relativ höhere LAG3-Spiegel an metastasierten Stellen ein besseres Ansprechen auf eine Immuntherapie und ein längeres Gesamtüberleben nach der Entwicklung einer metastasierten Erkrankung vorhersagen können [214]. Eine andere Arbeitsgruppe hat anhand von Daten des TCGA bei ccRCCs eine Analyse der LAG3-Expression durchgeführt. LAG3 war anders als bei uns in ccRCCs überexprimiert und korrelierte signifikant mit der PD-L1-Expression in der gesamten Kohorte und in der mRCC-Gruppe (alle, $p < 0,05$). In Kontrast zu unseren Ergebnissen wiesen LAG3⁺ RCCs als auch PD-L1⁺ RCCs u. a. ein höheres TNM-Stadium ($p < 0,05$), was auf eine mögliche positive Korrelation zwischen der Proteinexpression und einem fortgeschrittenen Tumorstadium hinweist. PD-L1⁺/LAG3⁺ RCCs und PD-L1⁻/LAG3⁺ RCCs ($p = 0,01$) zeigten ein ebenso wie PD-L1⁺/LAG3⁺ mRCC und PD-L1⁻/LAG3⁺ mRCC ($p < 0,05$) schlechteres CSS als doppelt negative

mRCCs. Die Ergebnisse dieser Forschungsgruppe deuten darauf hin, dass möglicherweise insbesondere die Koexpression der beiden Marker ein klinisch schlechteres Ergebnis prognostizieren lässt [215]. Des Weiteren legen die Ergebnisse nahe, dass eine Blockade von LAG3 in Kombination mit der Blockade von PD-L1 wie schon einleitend erwähnt ein potenzieller therapeutischer Ansatz für Nierenkrebs ist [161, 215].

Betrachtet man die Proteinexpression in den Tumoren im zeitlichen Verlauf, zeigen sich für PD-L1, BTLA und hTIM3 keine signifikanten Zusammenhänge. Zwar kann man sagen, dass BTLA über die Jahre zunächst sinkend und später wieder steigend ist, dennoch ist die Aussagekraft hier gering. Die Patienten haben multiple Systemtherapien erhalten, u. a. TKI und ICI, die Auswirkungen auf die Proteinexpression haben können. Interessant wäre es die Proteinexpression an einer ausreichend großen Kohorte zu untersuchen, die noch keinerlei Therapie erhalten haben. Das in der vorliegenden Arbeit ausgewählte Kollektiv war dafür allerdings nicht geeignet. Außerdem waren die zeitlichen Abstände sowie die Anzahl der aufgetretenen Metastasen sehr variabel, was vergleichende Aussagen schwierig macht.

Hinsichtlich der Genetik und Proteinexpression ist nach aktuellem Forschungsstand von keinem standardmäßigen Expressionsmuster auszugehen. Wie *Gerlinger et al.* anschaulich demonstrieren konnten, entwickeln sich die Tumoren am ehesten im Sinne einer Tumorevolution, bei der ein dominanter Klon mit einem Kernsatz von Mutationen genetisch unterschiedliche Subklone mit zusätzlichen Mutationen entstehen lässt. Die Ergebnisse von Gerlingers Arbeit zeigen, wie schwierig es ist, die genomische Landschaft eines Tumors anhand einer einzigen Biopsieprobe umfassend zu profilieren, und wie wichtig eine multiregionale Probenahme ist, um das volle Ausmaß der Heterogenität zu erfassen [76, 166]. Klar wird durch unsere Ergebnisse sowie zahlreiche andere Arbeiten, dass sich die Expression der Biomarker PD-L1, BTLA und hTIM3 beim mRCC intratumoral und intertumoral im zeitlichen bzw. örtlichen Verlauf in den korrespondierenden Metastasen im Vergleich zum Primarius dynamisch verändert und stark variiert. Für CTLA4 und LAG3 können aktuell keine validen Aussagen getroffen werden. Die ausgeprägte intertumorale

Variabilität des RCC macht es insgesamt schwierig, immunologische Marker solitär als Prädiktoren für das Therapieansprechen im klinischen Alltag zu verwenden. So lässt sich allein auf Proteinebene nicht zwangsläufig ein Zusammenhang feststellen, jedoch sprechen die verbesserten Überlebensraten, die mit der Einführung der ICI einhergegangen sind, für sich. Die mediane Überlebenszeit von ca. 13 Monaten [98, 99] hat sich aktuell auf ca. 39 Monate verlängert [67, 100-102]. Die vorliegenden Ergebnisse sowie die aktuelle Literatur legen nahe, dass es sinnvoll sein kann mehrere Marker in der Diagnostik und Therapieauswahl zu kombinieren, um die Vorhersagekraft auf Prognose und Therapieansprechen zu erhöhen. Die bisher nicht klinisch eingesetzte Kombination von z. B. Medikamenten, die gegen BTLA oder hTIM3 zusammen mit PD-L1 gerichtet sind, könnte vielversprechende Entwicklungen in der personalisierten Krebstherapie mit sich bringen und muss daher zukünftig in der klinischen Forschung Beachtung finden. Weiterhin könnte eine Hinzunahme von systemischen Markern bspw. im Patientenblut, wie sPD-(L)1 [212] oder BTLA⁺/CD8⁺ T-Zellen [106] aufschlussreiche Hinweise bezüglich der endogenen Immunantwort und dem Fortschreiten des Tumorleidens geben. Außerdem ist bislang nicht geklärt, wie sich bereits verabreichte Therapeutika auf die Proteinexpression in den Tumoren und den Metastasen auswirken. Die Therapieauswahl richtet sich nach einigen wenigen klinischen Kriterien und der Erfahrung der behandelnden Ärzte, die sich an den offiziellen Leitlinien für das RCC orientieren. Die Reihenfolge und die Substanzen selbst unterscheiden sich daher je nach Behandlungszeitpunkt beträchtlich.

Die verabreichten Systemtherapien waren wie bereits erwähnt über die Jahre in unserem Kollektiv sehr variabel, da es auch in den Leitlinien zu entsprechend geänderten Empfehlungen kam. Wie und ob die Therapien einen Einfluss auf die Proteinexpression oder somatische Mutationen haben, ist nicht bekannt und schwer zu untersuchen. Jedoch konnten *Sauter-Meyerhoff et al.* somatische Ereignisse zu Arzneimittelzielinformationen zuordnen und so zeigen, dass mindestens ein Arzneimittelzielgen in 62 % der Fälle mutiert war [192]. Dies legt einen Zusammenhang zwischen Mutationen und Therapieansprechen nahe. N = 31 Patienten unserer Kohorte haben vor Metastasenresektion keine

Systemtherapie erhalten. Für diese Patienten könnte man untersuchen, ob sich die Therapie auf die Proteinexpression auswirkt. Jedoch haben diese Patienten im Anschluss ebenfalls sehr unterschiedliche Systemtherapien erhalten, wodurch die Effekte zu unterschiedlich sind und eine Statistik wenig sinnvoll erscheint. Ein weiterer Einfluss besteht neben der Therapie zusätzlich in der Lokalisation der Metastase, wie für BTLA gezeigt werden konnte.

Die Expression könnte also unterschiedlich sein, jedoch ist die Patientenzahl im hiesigen Kollektiv für eine Aussage zu gering und die Effekte zu unterschiedlich, sodass ein Vergleich nicht substanzhaltig wäre.

Die Korrelation der Proteinexpression von PD-L1, BTLA und hTIM3 mit klinisch-pathologischen Parametern wie TNM oder Grading hat in dieser Arbeit für keinen der getesteten Marker einen signifikanten Unterschied gezeigt. Zwar gab es in der univariaten Analyse einige Trends, bspw. beim Geschlecht der Patienten, die sich jedoch in der multivariaten Analyse nicht bestätigen ließen.

Im Einklang mit unseren Ergebnissen konnte die zuvor erwähnte spanische Arbeitsgruppe zumindest für PD-(L)1 ebenfalls keine Korrelation mit dem Alter oder dem Geschlecht feststellen [210]. Eine weitere Arbeit fand gleichfalls keinen Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen wie TNM oder Histologie [216]. Die Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern in der kürzlich erschienen Arbeit von *Stühler et al.* ergab interessanterweise eine signifikant höhere BTLA-Expression in $\geq T3$ Tumoren vs. T1/2 Tumoren (Tumorzentrum $p = 0,009$; Invasionsfront $p = 0,005$), wobei sich der fehlende Zusammenhang zwischen der PD-L1- und der hTIM3-Expression mit klinisch-pathologischen Merkmalen bestätigte [211].

Diese Vorgehensweise scheint nicht als prädiktiver Faktor zu funktionieren, was mitunter daran liegen könnte, dass die Diagnosen zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten gestellt werden. Weiterhin untermauert dieses Ergebnis die Heterogenität dieser Tumorentität.

Darüber hinaus wurde die Proteinexpression von PD-L1, BTLA und hTIM3 mit dem Überleben korreliert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine heterogene intertumorale Expression von immunologischen Markern mit unterschiedlichen

Auswirkungen auf das Überleben. Für PD-L1 hat sich eine nicht-monotone Assoziation der Expression und dem Überleben in ccRCC-Metastasen mit hohem Risiko für niedrige und hohe Expression und niedrigem Risiko in einem kleinen Bereich dazwischen gezeigt. Auch nach Adjustierungen nach klinischen Variablen ist der signifikante Unterschied bestehen geblieben. In dieser Analyse konnten demnach keine möglichen Risiko- oder konfundierenden Faktoren identifiziert werden, die das Überleben beeinflussen. Betrachtet wurden hier Fälle, in denen sowohl Primarius als auch Metastase histologisch ccRCC waren (n = 183). Die Effekte sind hier am stärksten. In den anderen Überlebensanalysen zu PD-L1, in die alle Metastasen (n = 230), alle ccRCC-Metastasen (n = 210), alle Primärtumoren, zu denen korrespondierendes Metastasengewebe vorhanden war (n = 59) sowie davon die ccRCC Primärtumoren (n = 55) zeigten sich Trends, die jedoch nach multiplen Testen nicht mehr signifikant waren. Da sich in den Analysen für die Korrelation der PD-L1-Expression mit dem Überleben vermehrt Trends für ein höheres Risiko für ein OS/CSS-Event gezeigt haben ist es möglich, dass die Ergebnisse mit einer größeren Anzahl an Tumorproben signifikant wären. Andere Studien haben ebenfalls eine schlechtere Überlebensrate bei hoher PD-L1-Expression gezeigt [113-116, 210, 211, 216]. In der zuvor beschriebenen spanischen Studie hatten die Patienten mit PD-L1-Positivität im Tumor und hohen Plasmaspiegeln (> 793 ng/mL) ebenfalls ein signifikant schlechteres 5-Jahres-OS, wobei die Kohorte überwiegend eine Behandlung mit TKI erhielt [210]. Eine Überlebensanalyse in der Arbeit von *Zhang et al.* zeigte ein kürzeres OS für Patienten mit hoher PD-L1-Expression im Primärtumor oder in Metastasen (HR 1,59, p = 0,02) [117]. In einer Meta-Analyse, die sechs Studien und 1.323 Patienten umfasste, erhöhte eine höhere PD-L1-Expression das Sterberisiko um 81 % (HR 1,81, p < 0,001). Wurde die Analyse auf Fälle beschränkt, die nur immunhistochemisch untersucht wurden, war das Sterberisiko bei höherer PD-L1-Expression um mehr als das Zweifache erhöht (HR 2,05, p < 0,001) [123]. Die CheckMate 025-Studie hat unabhängig von der Behandlung (Nivolumab oder Everolimus) für Patienten mit einer hohen PD-L1-Expression ein kürzeres Überleben gezeigt [73], während der Effekt in der CheckMate 214-Studie von der

erhaltenen Therapie abhängig war (kürzeres Überleben für Patienten mit Sunitinib vs. Nivolumab + Ipilimumab) [71, 108]. Interessanterweise scheint die PD-L1-Expression also einen gewissen prädiktiven Wert für die IO-Monotherapie und die IO-Doubletten zu haben, nicht aber für die TKI-IO-Kombination [66, 67, 217]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Rolle von PD-L1 als prognostischer Biomarker noch nicht endgültig aufgeklärt ist.

Für die BTLA-Expression hat sich kein erhöhtes Risiko für ein OS/CSS-Event gezeigt. Konträr konnte die neuere Tübinger Arbeit in Abhängigkeit von der intratumoralen Lokalisation zeigen, dass BTLA⁺ Tumoren im Tumorzentrum mit einem schlechteren CSS (Median 48,46 vs. 68,91 Monate, $p = 0,061$) korrelierten [211], was darauf hindeutet, dass die alleinige Untersuchung von Proben an einem TMA im Vergleich zu histologischen Vollschnitten eine geringere Aussagekraft besitzt.

Für hTIM3 hat sich in unserer Kohorte gleichermaßen kein erhöhtes Risiko für ein OS/CSS-Event gezeigt, was in Einklang mit den neuerlichen Tübinger Ergebnissen steht [211]. Wie bereits erwähnt, gibt es in Kontrast hierzu Ergebnisse aus einer kleinen retrospektiven Studie, die zeigen, dass die hTIM3-Expression im Primärtumor und den Metastasen mit einem längeren PFS (HR 0,67, $p = 0,02$) und OS (HR 0,52, $p < 0,001$) im Vergleich zu hTIM3⁻ Tumor bei besserer Ansprechrate auf die verabreichte Immuntherapie assoziiert ist (s. o.) [148].

Für das OS ($p = 0,058$) hat sich außerdem eine nicht-monotone borderline-Assoziation für die LAG3-Expression gezeigt. Die Höhe der Proteinexpression scheint nicht generell mit klinisch-pathologischen Merkmalen assoziiert zu sein. Zumindest hinsichtlich BTLA lassen die Ergebnisse von *Stühler et al.* jedoch hoffen [211]. Möglicherweise könnten größer angelegte prospektive Studien eindeutigere Ergebnisse liefern. Betrachtet man als klinisches Merkmal solitär das Überleben, gibt es mehrere beschriebene Zusammenhänge. In unserer Arbeit wirft der nicht-monotone Zusammenhang zwischen der Expression in den ccRCC-Metastasen und dem hohen Risiko für ein OS/CSS-Event weitere Fragen nach den Ursachen auf. Es gelang uns nicht beeinflussende Kofaktoren zu

identifizieren, dies bietet allerdings für zukünftige Forschungsarbeiten einen interessanten Ansatz hinsichtlich des Patientenoutcomes.

Die zahlreichen Studien, die gezeigt haben, dass eine hohe PD-L1-Expression mit einem Überlebensnachteil assoziiert ist, legen nahe, dass dieser Biomarker trotz des widersprüchlichen Forschungsstandes nicht als prädiktiver Marker aufgegeben werden darf. Es müssen vielmehr weitere Studien durchgeführt werden, die klinisch verwendbare Kofaktoren identifizieren können, welche das Überleben sicherer prognostizieren lassen. Möglicherweise konnten mit Patienten unter IO-Monotherapie oder IO-Doubletten, nicht aber für die TKI-IO-Kombination [66, 67, 217] bereits Subgruppen identifiziert werden, für die PD-L1 einen prognostischen Wert hat.

Da die bisherige Risikostratifizierung klinisch einzig nach der IMDC-Klassifikation erfolgt, bleibt die Herausforderung weitere prädiktive Faktoren ausfindig zu machen, auch wenn diese Prognosescores in Zeiten der Targettherapie weiter ihre Vorhersagekraft behalten [2, 64, 98, 218-221].

Die in multiregionalen Exom-Sequenzierungsstudien nachgewiesene intratumorale Heterogenität des RCC könnte darauf hindeuten, dass die am Primärtumor vorgenommene molekulare Klassifizierung die Biologie der Metastasen nicht widerspiegelt [166]. In einer Studie mit mRCC-Gewebe waren nur 31 % der untersuchten somatischen Mutationen ubiquitär verteilt. Außerdem stimmten nur 23 % der Proben genetisch zwischen den verschiedenen Entnahmestellen innerhalb des Primärtumors und 21 % zwischen Primärtumor und Metastase überein, was auf ein hohes Maß an intratumoraler genetischer Heterogenität hinweist. Die wichtigsten Treibermutationen waren jedoch häufig in allen Regionen des Primärtumors und der entsprechenden Metastasen vorhanden, was wie bereits erwähnt auf einen gemeinsamen klonalen Ursprung schließen lässt [78]. Diese intratumorale Heterogenität hat wichtige Auswirkungen, da resistente Subklone mit spezifischen Mutationen bereits vor der Behandlung existieren können und dann unter der Therapie selektiert werden. Ob genetische Analysen in Biopsieproben von mehreren metastatischen Stellen oder Flüssigbiopsien, die unmittelbar vor Beginn einer systemischen

Therapie entnommen wurden, den prädiktiven Wert erhöhen können, ist nicht bekannt, wobei zudem ein solcher Ansatz klinisch unpraktikabel erscheint.

Sauter-Meyerhoff et al. konnten zeigen, dass die genomische Landschaft des RCC bei der Metastasierung insgesamt recht stabil zu bleiben scheint [192]. Dennoch sind genetische Veränderungen beim RCC weit verbreitet und gehen meist mit dem Verlust von Tumorsuppressorgenen einher. 70 % der ccRCCs tragen eine Mutation im VHL-Gen, das für das VHL-Protein kodiert [170, 222]. In der von *Sauter-Meyerhoff et al.* untersuchten Kohorte waren demgemäß ebenfalls VHL (40,5 %) und außerdem PBRM1 (40,5 %) und KDM5C (32,9 %) die am häufigsten mutierten Gene [192]. VHL übt eine tumorsuppressive Funktion aus, indem es an HIF bindet und dessen Abbau vermittelt. Der Verlust oder die Mutation von VHL führt zur Inaktivierung von VHL, was zur Aktivierung und Erhöhung von HIF-Proteinen und zur Transkription von nachgeschalteten Zielgenen führt [222, 223]. Die Aktivierung von HIF-Zielgenen, die mit der Reaktion auf Hypoxie zusammenhängen, wie VEGF oder Platelet Derived Growth Factor, ist für die Pathogenese des RCC von wesentlicher Bedeutung, da sie die Angiogenese, den Sauerstofftransport, die Glukoseaufnahme und den Glukosestoffwechsel, das Überleben der Tumorzellen und die Metastasierung fördern. Die HIF-Stabilisierung aufgrund des Verlusts der Funktion des VHL-Proteins ist ein Kennzeichen des RCC, sodass bei der Mehrzahl der RCCs pseudohypoxische Bedingungen vorherrschen, obwohl gleichzeitig eine verstärkte Angiogenese als weiteres Merkmal vorhanden ist [224]. Die Tumorgefäße weisen jedoch zahlreiche strukturelle und funktionelle Anomalien auf, die durch eine unregelmäßige Form, Hyperpermeabilität und das Fehlen von Perizyten gekennzeichnet sind. All diese Veränderungen führen zu einem abnormalen Blutfluss, der die Extravasation von Tumorzellen, die intratumorale Infiltration von T-Zellen und eine veränderte Abgabe von Antitumormitteln zur Folge hat [225].

Einer Arbeitsgruppe am IKP gelang es kürzlich, eine molekulare Subklassifizierung von RCCs anhand von 174 Signaturgenen vorzunehmen. Die Klassifizierung wurde mit Daten aus dem TCGA sowie unabhängigen RCCs verglichen. Die Tumoren wurden entweder dem ccRCC, papRCC oder chrRCC

zugeordnet und brachten zudem molekular heterogene Tumoren (bspw. mit ccRCC- und papRCC-Merkmalen) ans Licht, die ein Risiko für ein schlechteres Outcome hatten. Die zugewiesenen Anteile der molekularen Subtyp-Merkmale korrelierten signifikant mit dem CSS im TCGA. Die Übersetzung in einen numerischen RCC-Risk-Score ermöglichte außerdem die Prognose im TCGA. Die Überlebensmodellierung auf der Grundlage des Scores war im Vergleich zu pathologischen Kategorien signifikant verbessert [226]. Die immer besser verstandenen molekularen Veränderungen in der Mutationslandschaft des RCC bieten enorme Chancen in der Behandlungsstrategie und bleiben wichtige Schwerpunkte in der aktuellen Forschung.

Ein immunsuppressives TME ist ein weiteres Merkmal des RCC, das durch angiogene Mediatoren, Chemokine und defekte T-Zellen mit dysfunktionaler Zytotoxizität, die durch die Checkpoint-Regulation beeinträchtigt wird, sowie durch die immunsuppressive Aktivität von MDSCs gekennzeichnet ist [170]. VEGF erhöht die Präsenz von MDSCs [227], hemmt das angeborene Immunsystem, indem es die Differenzierung von Monozyten in reife dendritische Zellen verhindert und die PD-L1-Expression auf dendritischen Zellen hochreguliert [228-230]. Darüber hinaus hemmt es das adaptive Immunsystem, indem es die Differenzierung von Vorläuferzellen in CD8⁺/CD4⁺ T-Zellen blockiert [231]. Überdies reguliert VEGF die Expression von PD-1 und CTLA4 auf Immunzellen, was zu einer Erschöpfung der T-Zellen führt [147, 232]. Im Gegensatz zu den hemmenden Wirkungen auf Effektor-T-Zellen erhöht VEGF auch die Anzahl der regulatorischen T-Zellen und hält so einen immunsuppressiven Kontext aufrecht [233].

Es ist offensichtlich, dass die Signalwege, die die Angiogenese und die Immunantwort beeinflussen, miteinander verwoben sind und sich gegenseitig positiv oder negativ beeinflussen können. Antiangiogene Medikamente können zu einer Normalisierung der Tumorgefäße und einer Verringerung der Hypoxie führen, was sich wiederum positiv auf die Infiltration von Immunzellen in den Tumor auswirken kann [234, 235]. So können antiangiogene Medikamente die Differenzierung der dendritischen Zellen wiederherstellen und die Zahl der MDSCs und regulatorischen T-Zellen verringern [236, 237]. Aufgrund dieser

synergistischen Antitumoreffekte gibt es gute Gründe, TKI- und IO-Therapien zu kombinieren [238, 239]. Die synergistischen Mechanismen im komplexen zellulären TME sind jedoch noch nicht abschließend geklärt und angesichts der komplizierten Interaktionen zwischen den beteiligten Zellen (Tumor-, Immun-, Endothel- und anderen Zelltypen) im Tumorstroma schwer zu entschlüsseln [181]. Bemerkenswerterweise kann die PD-L1-Expression durch Hypoxie stimuliert werden [240]. So führt HIF-1 α zu einer Überexpression von PD-L1 in Immunzellen wie MDSCs und Makrophagen, die wiederum zytotoxische T-Zellen negativ regulieren [241-244].

Bei Brust- und Prostatakrebszelllinien wurde gezeigt, dass durch Hypoxie stabilisiertes HIF-1 α die PD-L1-Expression durch HIF-Bindung an ein spezifisches Hypoxie-Reaktions-Element im Promotor von PD-L1 in MDSCs, Makrophagen und dendritischen Zellen aktiviert wird [240, 245]. Auch bei ccRCC-Zelllinien wurde festgestellt, dass die Hochregulierung von PD-L1 von HIF abhängig ist [232]. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die bei ccRCCs beobachtete PD-L1-Expression eine Folge der Deregulierung der HIF-Achse aufgrund einer VHL-Mutation ist. Somit könnte die Wirksamkeit von PD-L1-gerichteten Medikamenten bei ccRCCs auf die HIF-1 α -Akkumulation aufgrund der VHL-Inaktivierung zurückzuführen sein. In einem kleinen Kollektiv von immunhistochemisch analysierten gefrorenen ccRCCs beobachteten *Ruf et al.* eine starke PD-L1-Färbung in VHL-mutierten Tumoren und nur eine schwache und verstreute Positivität in einem VHL-Wildtyp-Tumor [232]. In unserem Kollektiv fanden wir jedoch eine signifikant geringere PD-L1-Proteinexpression bei VHL-Mutation ($p = 0,03$). Daher können wir die Beobachtung eines immunsuppressiven TME durch die VHL-Mutation in unserer Studie nicht bestätigen. Schließlich könnte die Tatsache eines Zusammenhangs zwischen VHL-Mutation und niedriger PD-L1-Proteinexpression in unserer Analyse möglicherweise den in klinischen Studien beobachteten fehlenden Synergismus von TKI-IO-Kombinationen bei mRCCs erklären. Eine Einschränkung ist, dass die Charakterisierung des TME durch die PD-L1-Expression allein unzureichend zu sein scheint und weitere Studien erforderlich sind, um eine klare Aussage über das TME zu treffen. Außerdem sind größere Kohorten erforderlich, um den VHL-

Mutationsstatus als potenziellen prädiktiven Marker für PD-L1-gerichtete Therapien bei mRCC-Patienten zu bestätigen.

Wir konnten weiters eine neuartige Korrelationen zwischen dem Vorhandensein von somatischen Mutationen und der Höhe der Markereexpression auf Proteinebene nachweisen. Überraschenderweise hat sich eine signifikant höhere PD-L1-Expression auf Proteinebene bei mehr mTOR-Varianten gezeigt ($p = 0,03$). Auch bei den Mutationsanalysen, die Auswirkungen auf das Protein haben ist der Zusammenhang signifikant geblieben (SIFT oder PolyPhen $p = 0,015$; SIFT und Polyphen $p = 0,069$). Der PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg spielt bei der Entstehung vieler Tumoren eine wichtige Rolle, da er zahlreiche zelluläre Funktionen wie Zellwachstum, -proliferation, -überleben und -stoffwechsel zentral reguliert. Kürzlich veröffentlichte TCGA-Daten berichten von Aberrationen im PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg in bis zu 28 % der RCCs [246, 247]. Bei ccRCCs führt der Verlust des Tumorsuppressorgens VHL zu einer direkten Aktivierung des PI3-K/AKT/mTOR-Signalwegs [171]. Obwohl die PD-L1-Transkription nicht direkt von der mTOR-Aktivierung abhängt, könnte die Translation von IFN- γ -induzierten Transkripten, einschließlich PD-L1, von der Aktivierung der PI3-K, AKT- und mTOR-Kinase-Aktivität abhängen, da diese Aktivierung eine zentrale Rolle bei der Initiierung der IFN-stimulierten Gentranslation spielt und die Transkription von PD-L1 neben anderen Faktoren durch IFN- γ ausgelöst werden kann [248, 249]. Dementsprechend verändert die Hemmung von mTOR den PD-L1-Spiegel in verschiedenen Krebszelltypen [250]. Daten über die Korrelation von mTOR-Mutationen mit der PD-L1-Expression vor einer Behandlung mit mTOR-Inhibitor sind für Nierenkrebs nicht bekannt. Interessanterweise wurde für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (engl.: Non-Small-Cell Lung Cancer = NSCLC), wie in unseren Studien, zuvor berichtet, dass die Mutation der AKT/mTOR-Achse in der Lage war, Immun-Checkpoints, einschließlich PD-L1, hochzuregulieren. Diese Daten deuten darauf hin, dass die onkogene Aktivierung des AKT/mTOR-Signalwegs die Immunabwehr fördert, indem sie die PD-L1-Expression vorantreibt. Dies wurde in NSCLC-Zelllinien bestätigt, wo die Hemmung der PI3-K/mTOR-Signalübertragung zu einer Verringerung der PD-L1-Konzentration führte.

Gleiches konnte in genetisch veränderten Mausmodellen von Lungenkrebs gezeigt werden, in denen die Kombination eines mTOR-Inhibitors mit einem PD-1-Antikörper das Tumorstadium verringerte, die Zahl der TILs erhöhte und die Zahl der regulatorischen T-Zellen verringerte [250].

Dieser Zusammenhang wurde für das RCC so bislang nicht gezeigt und bringt sehr interessante Überlegungen mit sich. Bislang ist in der Therapie des mRCC entweder eine Kombinationsbehandlung aus TKI + ICI oder eine Kombination aus ICI + ICI üblich. Der bislang erhoffte synergistische Effekt, den die Kombination aus Medikamenten, die auf unterschiedliche Mechanismen abzielen (Angiogenese, unterschiedliche Immun-Checkpoints) ist ausgeblieben. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse in Assoziation mit der Proteinexpression könnte hierfür einen Erklärungsansatz darstellen. Bisher ist es nicht gängig einen PD-(L)1-Inhibitor mit einem mTOR-Inhibitor zu kombinieren, wobei die Überexpression von PD-L1 bei gleichzeitig vorhandenen mTOR-Mutationen nahelegt, dass eine Kombinationsbehandlung für diese Patienten einen klinischen Benefit bringen würde. Die Kombination von TKI + ICI ist laut Leitlinie in der Erstlinientherapie für alle IMDC-Risikogruppen bei fortgeschrittenem RCC enthalten [102, 251, 252]. In der Erstlinie ist eine Kombination mit einem mTOR-Inhibitor nicht empfohlen. Die Gabe von einem mTOR-Inhibitor kann aber bei schlechtem Risikoprofil erwogen werden, wenn eine ICI-Kombinationstherapie in der Erstlinie nicht möglich ist. Nach Versagen einer TKI-Monotherapie kann in der Zweitlinie die Kombination aus TKI + mTOR-Inhibitor verabreicht werden [2]. In Übereinstimmung mit unseren Erkenntnissen über eine erhöhte PD-L1-Expression bei Nachweis von mTOR-Mutationen haben frühere Studien einen Zusammenhang zwischen Mutationen im mTOR-Signalweg und einem verbesserten Überleben mit IO-basierten Therapien bei verschiedenen Tumorarten gezeigt [253, 254]. Unter Verwendung des Datensatzes der Memorial Sloan-Kettering Cancer Center-Kriterien bzw. Motzerkriterien identifizierten *Cheng et al.* acht Gene, die am mTOR-Signalweg beteiligt sind, darunter FGFR2, PIK3C3, FGFR4, FGFR1, FGF3, AKT1, mTOR und RPTOR. Die Mutation der 8-Gensignatur war mit einer erhöhten TMB- und PD-1/PD-L1-Expression und einem besseren Überleben bei IO-behandelten

Patienten verbunden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Genmutationen des mTOR-Stoffwechsels bei der IO-Therapie für ein besseres Überleben bei verschiedenen Krebsarten prädiktiv sind [253]. Um diese Ergebnisse zu validieren, sind jedoch weitere größer angelegte Studien nötig. Darüber hinaus haben viele Studien in den letzten Jahren darauf hingewiesen, dass die mTOR-Hemmung CD8⁺ T-Gedächtniszellen aktiviert, was zu verstärkten Impfstoffantworten auf virale Antigene und Immunantworten gegen Krebs führt [255-258]. Die derzeit veröffentlichten Studien über die Veränderung von PD-L1 durch mTOR-Hemmung haben jedoch widersprüchliche Ergebnisse erbracht, wobei die meisten Studien eine Hochregulierung von PD-L1 durch mTOR-Hemmung zeigen [259-261]. In einer früheren Studie von *Wang et al.* aus dem Jahr 2013 wurde berichtet, dass die Ausschaltung von mTOR die PD-L1-Konzentration in Endothelzellen signifikant erhöht [262]. In Übereinstimmung damit fand eine nachfolgende Studie von *Hirayama et al.* heraus, dass die Behandlung mit Everolimus die PD-L1-Expression in Maus-RCC-Modellen hochreguliert. Daher reduzierte die Kombination von Everolimus mit einer Anti-PD-L1-Therapie die Tumorlast im Vergleich zur alleinigen Everolimus-Behandlung und erhöhte gleichzeitig die TILs und das Verhältnis von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen zu TILs [263].

Folglich könnte die Assoziation von mTOR-Mutationen und erhöhter PD-L1-Expression, die entweder vor Therapiebeginn vorhanden war, wie in unserer Studie beschrieben, oder durch mTOR-Inhibition induziert wurde, wie extern beschrieben, ein starkes wissenschaftliches Argument für die Kombination von mTOR-Inhibitoren mit PD-L1-Blockade als wirksame Strategie zur Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit liefern. In der Tat hat die Kombination von mTOR-Inhibitoren mit PD-L1-Inhibitoren die Antitumoraktivität im Vergleich zur Monotherapie in einem Mausmodell für RCCs und Mundhöhlenkrebs signifikant erhöht [263, 264].

Zukünftig könnte es klinische Kombinationsbehandlungen unter Hinzunahme von mTOR-Inhibitoren zu PD-L1-Antikörpern geben, die die Prognose des mRCC verbessern könnten. Eine Hürde in der klinischen Anwendbarkeit der Mutationsanalysen in Kombination mit der immunhistochemisch ermittelten

Proteinexpression stellt neben den finanziellen Möglichkeiten weiterhin die Heterogenität des RCC dar. Eine Studie hat auch für das Vorhandensein von somatischen Mutationen die große intratumorale Heterogenität gezeigt [76]. Wünschenswert wäre es gewesen, die Primärtumoren vollständig zu sequenzieren und die Ergebnisse der Mutationsanalysen mit denen der Metastasen zu vergleichen. Eine Schwierigkeit besteht hierbei darin, dass die Primärtumorproben bereits für viele Jahre in der Pathologie gelagert wurden, was dazu führt, dass die DNA des Tumors teilweise stark fragmentiert wird. Das wiederum hat Einflüsse auf die Qualität des Materials, welches mittels NGS sequenziert werden kann. Des Weiteren wurden viele Tumoren bei Erstdiagnose außer Haus operiert und die Patienten haben sich erst für die weitere Behandlung bei fortgeschrittener Erkrankung in das UKT begeben, weswegen deren Proben nicht zur Verfügung standen. Die vorhandenen Proben der korrespondierenden Primärtumoren wurden für das NGS mittels des besagten Genpanels vorbereitet und sollen in zukünftigen Arbeiten analysiert werden. Für einen Fall konnte die Analyse exemplarisch durchgeführt werden. Hier hat sich gezeigt, dass bereits im Primärtumor die meisten Mutationen vorhanden waren, was im Einklang mit bisherigen Ergebnissen steht [76, 166]. Von insgesamt $n = 19$ Patienten des Kollektivs gab es laut Datenbank einen operierten Primärtumor und mehrere operierte Metastasen, für die man den zeitlichen Verlauf der Mutationsanalysen hätte betrachten können. Hiervon wurden allerdings nur $n = 6$ Primärtumoren in Tübingen operiert und nicht alle Proben standen zur Verfügung. Von $n = 40$ Patienten gibt es einen Primärtumor sowie jeweils eine korrespondierende Metastase, wovon für künftige Analysen $n = 10$ Paare zur Verfügung stehen. Interessant wäre es gezielt die mTOR-Mutationen bei diesen Patienten zu untersuchen. Für aussagekräftige Ergebnisse sind hier jedoch weitere Proben nötig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es Tumormodelle zu kultivieren, an denen funktionelle Zellzytotoxizitätsassays durchgeführt werden können. Zu einigen der häufigen Tumorentitäten wie dem Kolorektalen Karzinom oder dem Prostatakarzinom konnten bereits Tumororganoide etabliert werden [265, 266].

Zu Nierenkrebs gibt es weniger Arbeiten. Jüngere Studien haben sich daher mit der Kultivierung von RCC-Organoiden befasst. Es gelang einer Arbeitsgruppe, wenn auch mit geringerer Erfolgsquote als bei Normalgewebe, Kulturen zu etablieren, die einen epithelialen und mesenchymalen Phänotyp aufwiesen und tumorspezifische Marker beibehielten [267]. Humane RCCs wurden von einer weiteren Gruppe einzeln histologisch, immunhistochemisch und mittels quantitativer PCR charakterisiert, um die Eigenschaften jedes Tumors zu bestimmen. Isolierte Zellen wurden, um die Interaktionen interzellulär, die Entwicklung von Organoiden und die Aufrechterhaltung von Genexpressionssignaturen über die Zeit in der Kultur zu bewerten, untersucht. Molekulare Analysen der Zellgerüstkonstrukte, einschließlich IHC und quantitativer PCR, zeigten, dass einzelne Tumorphänotypen bis zu 21 Tage lang in Kultur aufrechterhalten werden konnten [268]. Durch Arbeiten wie diese eröffnen sich Möglichkeiten für die Entwicklung präklinischer Modelle zur Verbesserung therapeutischer Behandlungen, jedoch waren die Methoden noch nicht ausgereift und die Organoide wurden unzureichend charakterisiert [269]. In einer weiteren interessanten Arbeit gelang es kürzlich ein Kultursystem zur Erzeugung von Tumororganoiden aus Nierenkrebsgewebe zu entwickeln. Es wurden 33 Organoidlinien von RCCs und zehn Organoidlinien von normalen Nieren erzeugt. Die Organoide der RCCs wurden einschließlich der histopathologischen Merkmale, der Mutationslandschaft, des globalen Genexpressionsprofils und der zellulären Heterogenität charakterisiert. Die RCC-Organoide behielten die histopathologischen Merkmale, das Biomarker-Expressionsprofil und die genetischen Veränderungen der ursprünglichen Tumoren bei und enthielten in Auszügen TME-Zellen, die bereits in den ursprünglichen Tumoren gefunden wurden [269].

Die Modelle in unserem Versuch wurden in einem ALI-System kultiviert. Zusammengefasst ergeben sich durch die realistischen, direkt vom Patienten abgeleiteten Modelle mit nativ eingebettetem TME samt Immunzellen einige Vorteile. Die Modelle können bspw. mit Expressions- und Mutationsprofilen charakterisiert werden. Mit dieser Methode können die in-vitro den in-vivo Bedingungen angenähert werden. Es gelten weniger künstlich erzeugte

Bedingungen in Bezug auf das Verhältnis der Tumor- zu Immunzellen, was eine bessere Testung von Immuntherapien an den Modellen gewährleistet und somit einen Schritt in Richtung individualisierte Krebstherapie darstellt. Die Tumor- und Immunzellkomponenten ermöglichen einerseits eine Vorhersage auf das Therapieansprechen bei einer IO-Behandlung, andererseits gibt es nicht immer eine positive Korrelation mit dem Patientenansprechen in-vivo. Für gastrointestinale Tumoren konnte in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden, dass die Ansprechraten der Modelle in-vitro mit derer in-vivo korrelierten [270, 271]. Derzeit führt eine Arbeitsgruppe ko-klinische Versuche durch, um zu testen, ob die in-vitro-Antworten der von Patienten stammenden RCC-Organoiden das Ansprechen der Patienten auf die entsprechenden Behandlungen in-vivo rekapitulieren [269].

Die intratumorale Heterogenität des RCC stellt ein zusätzliches Problem für die Validität des Verfahrens dar. Die Gewebemodelle spiegeln eventuell nicht die Biologie des gesamten Tumors wider. Von *Li et al.* durchgeführte Einzelzell-RNA-Sequenzierungsanalysen untermauerten die sowohl intra- als auch intertumorale Heterogenität in RCC-Organoiden. Die Ergebnisse zeigten, dass diese RCC-Organoiden hauptsächlich aus epithelialen Tumorzellen bestanden. Ein kleiner Anteil von TME-Zellen, wie Endothelzellen, Myofibroblasten und Immunzellen, wurde ebenfalls nachgewiesen, wobei jede organoide RCC-Linie unterschiedliche Komponenten von TME-Zellen enthielt und eine erhebliche Intratumor-Heterogenität aufwies. Durch die Anreicherung von Merkmalen und unterschiedlichen Gensignaturen spezifischer Zellcluster konnten mithilfe von Daten aus dem TCGA unterschiedliche Prognosen vorhergesagt werden. Um zu prüfen, ob die RCC-Organoiden die Mutationslandschaft der ursprünglichen Tumoren bewahren, wurde in der Studie außerdem an mehreren etablierten RCC-Organoiden und den dazugehörigen Tumorproben eine Ganz-Exom-Sequenzierung durchgeführt. Die gemeinsamen bekannten RCC-assoziierten Mutationen, die in den Tumoren gefunden wurden, blieben in den entsprechenden RCC-Organoiden weitgehend erhalten. Somatische Mutationen in VHL, dem am häufigsten mutierten Gen in RCCs, wurden in zehn RCC-Organoiden und den dazugehörigen Tumoren identifiziert. Außerdem stimmten

somatische Mutationen in anderen RCC-assoziierten Genen wie PBRM1 meistens zwischen den RCC-Organoiden und den entsprechenden Tumorgeweben überein. Allerdings wurden in RCC-Organoiden gelegentlich Zuwächse oder Verluste genetischer Mutationen beobachtet, was sich die Autoren durch die intratumorale Diversifizierung während der Expansion neoplastischer Zellen erklärten [269], was mit den von *Gerlinger et al.* gezeigten Ergebnissen vereinbar ist [76, 166].

Da die Modelle von einzelnen Patienten abgeleitet sind, fehlt es an Reproduzierbarkeit in Validierungskohorten, was den klinischen Einsatz schwierig macht. Außerdem ist das Verfahren sehr zeit- und kostenintensiv. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es nicht umsetzbar, von jedem Patienten eine ALI-TC zu etablieren und diese vor Therapiebeginn mittels Zytotoxizitätsassay zu testen. Gerade im fortgeschrittenen Tumorstadium würden die Patienten nicht von einer Verzögerung des Therapiebeginns profitieren. Wie sich die Tumorbilogie und das TME jedoch nach erhaltener Immuntherapie genau ändern ist derzeit nicht bekannt, was die Testung am initial gewonnen Primärtumormaterial zusätzlich schwierig macht. *Li et al.* fanden, indem sie einzelne Zusätze des Zellkulturmediums entfernten heraus, dass RCC-Organoiden und normale Nierenorganoiden unterschiedliche Anforderungen an Nischenfaktoren und damit die Zusammensetzung des Kulturmediums haben. EGF war mit Ausnahme eines Organoids für die Bildung aller RCC-Organoidlinien erforderlich. R-Spondin-1, Noggin und FGF-10 waren in dieser Studie nicht für alle getesteten RCC-Organoiden erforderlich und wurden daher aus dem Medium ausgeschlossen. Die Entfernung von nicht essenziellen Kulturkomponenten aus dem RCC-Organoid-Kulturmedium reduzierte die erheblichen Kosten immens. Die Anzahl der gebildeten Organoiden variierte je nach Zusammensetzung [269]. Die genannten Komponenten waren in dem von uns verwendeten Medium ebenfalls enthalten, die Ergebnisse von *Li et al.* deuten darauf hin, dass die Inhaltsstoffe ggf. einer Überarbeitung bedürfen und unterstreichen, dass die Methoden der Zellkultivierung bei RCCs noch nicht ausgereift sind. Durch die Anpassung des Mediums und der Laborbedingungen könnten zukünftige Zellkulturversuche

besser standardisiert werden und ein besseres Wachstum der Tumormodelle gesichert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein histologisch gesichertes ccRCC als ALI Tumormodell kultiviert und mit Nivolumab behandelt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe hat sich in diesem Versuch kein signifikanter Unterschied gezeigt. Es kam dennoch zu einer gesteigerten Zytotoxizität unter Behandlung mit Nivolumab. Das Ergebnis ist jedoch stark abhängig von verschiedensten Faktoren wie bspw. der Anzahl der Immunzellen, die im verwendeten Gewebestück vorhanden waren. Wie bereits erläutert kann es durch verschiedene Mechanismen zu einer Immundysfunktion im TME des RCC kommen [272], was auch als immune-desert bezeichnet wird. In diesem Immunzellarmen bzw. -defizienten TME wirkt eine IO-basierte Therapie in der Konsequenz schlechter. Um zu gewährleisten, dass in den Tumoren CD8⁺ Immunzellen vorhanden sind, wurden beispielhaft von TMAs sowie von den charakterisierten Tumormodellen Färbungen mit einem Antikörper, der an CD8 bindet durchgeführt. Die Ergebnisse waren schwer auszuwerten, konnten jedoch zeigen, dass CD8⁺ Zellen vorhanden waren. Um aussagekräftige Versuche für das in-vitro oder gar in-vivo Therapieansprechen machen zu können sind weitere Versuche sowie eine Standardisierung des Verfahrens notwendig. Für andere Tumorentitäten konnte man Organoidmodelle mit zugehörigen T-Zellen in einer Kokultur generieren, mit denen ähnliche Versuche gemacht werden können. Hier verlieren sich allerdings die genannten Vorteile wie z. B. das Vorhandensein des gesamten TME, welches bekanntermaßen einen Einfluss auf die Tumorentwicklung, die Tumorprogression und die Therapieresistenz hat [180, 182]. *Li et al.* untersuchten in ihrer Studie ebenfalls das Ansprechen auf zielgerichtete Medikamente in den RCC-Organoidlinien. Die Ergebnisse des Wirkstoffscreenings zeigten, dass die meisten RCC-Organotide nicht gut auf TKI ansprachen, was die Autoren auf das Fehlen der entsprechenden Targets in diesem in-vitro-Kultursystem zurückführten. Im Gegensatz dazu konnte interessanterweise eine erhebliche Hemmung der Organoidbildung durch die mTOR-Inhibitoren Everolimus und Temsirolimus beobachtet werden, wobei es trotz gleichem Targetmolekül dennoch Unterschiede in den Reaktionen bei

verschiedenen RCC-Organoiden gab. Die Analyse der Daten aus der RNA-Sequenzierung ergab, dass die Zielgene dieser zielgerichteten Therapeutika und die entsprechenden Signalwege unterschiedlich aktiviert waren, was die Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber den Behandlungsschemata erklären könnte [269]. Die vielversprechenden wachstumshemmenden Wirkungen von Inhibitoren des mTOR-Signalwegs auf mehrere RCC-Organoidlinien decken sich mit den Ergebnissen älterer klinischer Studien, wonach die Behandlung mit den mTOR-Inhibitoren Everolimus oder Temsirolimus das Überleben von Patienten mit RCC verlängern kann [269, 273]. Erwähnt werden muss, dass bei den in dieser Studie erstellten Tumororganoidmodellen das TME, wie z. B. das Stroma und die Immunzellen, nicht exakt rekapituliert werden konnten, was ihre Verwendung bei der Bewertung der Wirksamkeit von antiangiogenen Medikamenten und ICI einschränkte [269]. Die Methoden für Organoidsysteme müssen in Zukunft neben einem hohen Maß an Standardisierung und Objektivierung zusätzlich gewährleisten, dass das TME adäquat in die Modelle integriert wird.

Mittels Zellkulturmethoden etablierte RCCs scheinen nach aktuellem Stand der Forschung im Großen und Ganzen die Eigenschaften des ursprünglichen Gewebes zu rekapitulieren. Die unterschiedlichen Reaktionen auf zielgerichtete Medikamente, die durch die ausgeprägte intra- und intertumorale Heterogenität sowie einen Verlust des im Patienten vorhandenen TME erklärt werden können zeigen auf, dass den Organoiden bzw. TC aus RCCs zukünftig mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte. Gleichzeitig demonstrieren sie anschaulich die Chancen, die sich durch die neueren Methoden und deren Korrelation zu Histologie und Sequenzierungsdaten in Bezug auf Medikamententestungen, personalisierte Medizin sowie der Auswahl von geeigneten Behandlungsschemata und der Prognose des Therapieansprechens bieten [269].

Zukünftig könnte auf Basis von funktionellen Untersuchungen der identifizierten immunologischen Markerproteine PD-L1, BTLA, hTIM3, CTLA4 und LAG3 in Zellkulturexperimenten mit von Patienten abgeleiteten ALI Tumormodellen das in-vitro Therapieansprechen versuchsweise prognostiziert werden. Die

Methoden müssen hierfür jedoch standardisiert und Modelle besser charakterisiert werden. Inwieweit die Prognosen mit dem Therapieansprechen in-vivo korrelieren, bleibt Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse der Korrelation von Proteinexpression und Mutationsprofil der Metastasen wäre es erstrebenswert in-vitro Zytotoxizitätsassays mit einer Kombinationsbehandlung von PD-(L)1-Antikörpern und mTOR-Inhibitoren durchzuführen und die Effekte zu beobachten. Hierfür war jedoch zum jetzigen Zeitpunkt in dieser Studie nicht genügend Material zur Verfügung. Außerdem könnten mithilfe größer angelegter Studien weitere Arzneimittelkombinationen an den TC getestet werden.

Zusammenfassend zeigt unsere Studie ein sehr heterogenes Expressionsmuster der Immun-Checkpoints PD-L1, BTLA und hTIM3 mit unterschiedlichen Auswirkungen auf das Überleben. Die Mutationsanalysen deuten darauf hin, dass eine kombinierte Behandlung mit mTOR-Inhibitoren und PD-L1-Antikörpern vielversprechend erscheint und möglicherweise auch den in klinischen Studien beobachteten mangelnden Synergismus der TKI-IO-Kombinationsbehandlung bei mRCCs erklärt. Die Identifikation von validen Biomarkern sowie die Etablierung von Zellkulturmethoden in der Diagnostik und Therapieplanung des RCC zeigen bisweilen Schwierigkeiten auf, die u. a. durch die ausgeprägte Tumorerheterogenität begründet sind. Sie beweisen jedoch in zahlreichen Arbeiten ihr Potenzial, die Biologie des RCC besser zu verstehen und Patienten zielgerichtet zu therapieren und das Ansprechen auf Arzneimittel oder das Überleben zu prognostizieren.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die Expression der immunologischen Marker PD-L1, BTLA, hTIM3, CTLA4 und LAG3 beim mRCC untersucht. Die Immuntherapie mit ICI ist die Grundlage der adjuvanten und metastasierten Therapie des RCC. Es gibt jedoch keine im klinischen Alltag anwendbaren Biomarker, die das Therapieansprechen vorhersagen. Die Auswahl der Systemtherapie basiert auf dem IMDC-Risikomodell [189].

Die ausgewählten immunmodulatorischen Marker sind für das RCC im Kontext von Tumorprogress oder Therapieoptionen von Bedeutung bzw. kommen hierfür aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften potenziell in Betracht.

Die Kohorte bestand aus 111 Patienten, die an einem mRCC erkrankt waren und zwischen 1998 und 2020 am UKT operiert und/oder systemisch therapiert wurden, wobei das letzte FUP im Oktober 2020 erhoben wurde. Eingeschlossen wurden sowohl klarzellige als auch papilläre und chromophobe histologische Subtypen. Auf die Erstellung von TMAs folgten immunhistochemische Färbungen mit validierten Antikörpern. Die Ergebnisse wurden mit dem Ziel der Objektivierbarkeit mit der Bildanalyse-Software Tissue Studio® v.4.4.3 (Definiens AG, München, Deutschland) ausgewertet und anschließend die Proteinexpression mit dem ScoreTS berechnet. Hierfür wurden 111 Primärtumoren (101 ccRCC, 6 papRCC, 2 chrRCC, 1 Mischtyp, 1 nicht klassifizierbar) sowie 230 Metastasen (FFPE) untersucht. Bei 59 Patienten lag Primärtumor- und korrespondierendes Metastasengewebe, bei 51 Patienten Material aus mehreren Metastasen unterschiedlicher Lokalisation vor.

Mit der Zielsetzung Rückschlüsse auf Vorhersagbarkeit für Therapieansprechen oder Krankheitsprogress beim mRCC anhand der untersuchten Marker zu ziehen, wurde die Höhe der Proteinexpression hinsichtlich der intertumoralen Heterogenität in Primärtumorgewebe und korrespondierenden Metastasen analysiert.

PD-L1 war in Metastasen unabhängig von der Lokalisation signifikant höher exprimiert als im Primärtumor ($p = 0,0011$). BTLA hingegen war im Primarius signifikant höher exprimiert als in Metastasen ($p = 0,037$). Die höchste Expression zeigte BTLA in Lokalrezidiven, sowie in den immunologisch sensiblen

Organen Lymphknoten und Nebenniere. In Lunge und Knochen zeigte sich im Vergleich hierzu eine signifikant niedrigere Expression ($p = 0,028$). Damit bestätigten wir die intertumorale Heterogenität der Proteinexpression zwischen Primärtumor und entsprechender Metastase für PD-L1 und BTLA. Für hTIM3, CTLA4 und LAG3 hat sich kein signifikanter Unterschied gezeigt.

Betrachtet man die Tumorexpression im zeitlichen Verlauf, zeigen sich für PD-L1, BTLA und hTIM3 keine signifikanten Zusammenhänge.

Die Proteinexpression wurde außerdem zu klinisch-pathologischen Merkmalen korreliert, um deren prognostischen Wert beurteilen zu können. Für keines der untersuchten Proteine hat sich ein signifikanter Unterschied gezeigt.

Ergänzend durchgeführte Überlebensanalysen zeigten eine nicht-monotone Assoziation der PD-L1-Expression mit dem Überleben in ccRCC Metastasen. Patienten mit einer niedrigen und einer hohen PD-L1-Expression hatten ein schlechteres OS ($p = 0,019$) oder CSS ($p = 0,011$). In einem kleinen Bereich dazwischen war das Risiko zu versterben geringer. In dieser Analyse konnten keine möglichen Risiko- oder konfundierenden Faktoren identifiziert werden, die das Überleben beeinflussen. Für BTLA, hTIM3, CTLA4 und LAG3 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Überlebensuntersuchungen.

Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass es sinnvoll sein kann mehrere Marker auf Proteinebene in der Diagnostik zu kombinieren, um die Vorhersagekraft zu erhöhen. Die bisher nicht klinisch eingesetzten Kombination von Medikamenten, die gegen BTLA, hTIM3 oder LAG3 und PD-L1 gerichtet sind, erscheinen vielversprechend.

Überdies wurden Korrelationen der Markerexpression auf Proteinebene mit somatischen Mutationen auf DNA-Ebene evaluiert. Genetische Veränderungen sind beim RCC weit verbreitet und gehen meist mit dem Verlust von Tumorsuppressorgenen, am häufigsten VHL, einher. Die PD-L1-Expression auf Proteinebene war jedoch negativ mit einer hohen Mutationslast von VHL („all variants“ $p = 0,0037$; BH-adj. $p = 0,03$) assoziiert. Daher können wir das in anderen Arbeiten beschriebene immunsuppressive TME durch die VHL-Mutation in unserer Studie nicht bestätigen. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse könnten den in klinischen Studien beobachteten fehlenden Synergismus von

TKI-IO-Kombinationen bei mRCC erklären. Unerwartet war eine PD-L1-Expression positiv mit einer hohen Mutationslast von mTOR („all variants“ $p = 0,0026$; BH-adj. $p = 0,03$; SIFT oder PolyPhen $p = 0,0015$; BH-adj. $p = 0,015$; SIFT und Polyphen $p = 0,016$; BH-adj. $p = 0,069$) assoziiert, was so bisher für das RCC nicht bekannt war. Diese neuartige Korrelation liefert ein starkes wissenschaftliches Argument für die Hinzunahme von mTOR- zu PD-L1-Inhibitoren als wirksame Therapiestrategie.

Die durchgeführten Zellkulturversuche sollten beleuchten, inwiefern sich zukünftig auf Basis von funktionellen Untersuchungen der identifizierten Markerproteine in Experimenten mit von Patienten abgeleiteten ALI Tumormodellen das in-vitro Therapieansprechen prognostizieren lässt. In dem Zytotoxizitätsassay zeigte sich für die mit Nivolumab behandelten ccRCC-TC im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine nicht signifikante Zytotoxizität (Mittelwert 0,73 vs. 1). Für valide Prognosestellungen müssen die Methoden standardisiert und angepasst werden, da sie aktuell noch sehr zeit- und kostenintensiv sind. Die Modelle müssen darüber hinaus präziser charakterisiert und das TME besser rekapituliert werden. Inwieweit die Prognosen mit dem Therapieansprechen in-vivo korrelieren, bleibt Gegenstand aktueller Forschung.

Die Identifikation von prädiktiven Biomarkern sowie die Etablierung präklinischer Zellkulturmodelle in der Diagnostik und Therapieplanung des RCC bereiten bisweilen Schwierigkeiten, die u. a. durch die ausgeprägte Tumorerogenität und die Dynamik der Markerexpression begründet sind, sodass sich hier auch zukünftig weiterer Forschungsbedarf ergibt. Die durchgeführten Mutationsanalysen resultieren in der Überlegung klinische Studien unter Hinzunahme von mTOR- zu PD-L1-Inhibitoren zu initiieren. Eine Limitation der Studie ergibt sich aus der alleinigen Untersuchung von Proben an einem TMA, die im Vergleich zu histologischen Vollschnitten eine geringere Aussagekraft besitzen könnten. Immun-Checkpoints bzw. deren Koexpression beweisen jedoch ihr Potenzial, die Biologie des RCC besser zu verstehen, Patienten zielgerichtet mit neuen Kombinationen zu therapieren und das Arzneimittelansprechen oder das Überleben zu prognostizieren.

6 Literaturverzeichnis

1. G.d.e.K.i.D.e.V. Robert Koch-Institut E: **Krebs in Deutschland 2019/2020**. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV: Berlin 2021, **14. Ausgabe**.
2. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF): **Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkrazinoms, Langversion 4.0**. 2023.
3. Office EG: **EAU Guidelines**. Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan 2023.
4. Jonasch E, Gao J, Rathmell WK: **Renal cell carcinoma**. *BMJ : British Medical Journal* 2014, **349**:g4797.
5. Rini BI, Campbell SC, Escudier B: **Renal cell carcinoma**. *The Lancet* 2009, **373**(9669):1119-1132.
6. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, Eble JN, Fleming S, Ljungberg B, Medeiros LJ *et al*: **The Heidelberg classification of renal cell tumours**. *J Pathol* 1997, **183**(2):131-133.
7. Shen SS, Krishna B, Chirala R, Amato RJ, Truong LD: **Kidney-specific cadherin, a specific marker for the distal portion of the nephron and related renal neoplasms**. *Mod Pathol* 2005, **18**(7):933-940.
8. Al-Bayati O, Hasan A, Pruthi D, Kaushik D, Liss MA: **Systematic review of modifiable risk factors for kidney cancer**. *Urol Oncol* 2019, **37**(6):359-371.
9. Chow WH, Dong LM, Devesa SS: **Epidemiology and risk factors for kidney cancer**. *Nat Rev Urol* 2010, **7**(5):245-257.
10. Shapiro JA, Williams MA, Weiss NS, Stergachis A, LaCroix AZ, Barlow WE: **Hypertension, antihypertensive medication use, and risk of renal cell carcinoma**. *Am J Epidemiol* 1999, **149**(6):521-530.
11. Tahbaz R, Schmid M, Merseburger AS: **Prevention of kidney cancer incidence and recurrence: lifestyle, medication and nutrition**. *Curr Opin Urol* 2018, **28**(1):62-79.
12. Bellocco R, Pasquali E, Rota M, Bagnardi V, Tramacere I, Scotti L, Pelucchi C, Boffetta P, Corrao G, La Vecchia C: **Alcohol drinking and risk of renal cell carcinoma: results of a meta-analysis**. *Ann Oncol* 2012, **23**(9):2235-2244.
13. Gago-Dominguez M, Yuan JM, Castelao JE, Ross RK, Yu MC: **Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma**. *British Journal of Cancer* 1999, **81**(3):542-548.
14. Partanen T, Heikkilä P, Hernberg S, Kauppinen T, Moneta G, Ojajärvi A: **Renal cell cancer and occupational exposure to chemical agents**. *Scand J Work Environ Health* 1991, **17**(4):231-239.
15. Brüning T, Pesch B, Wiesenhütter B, Rabstein S, Lammert M, Baumüller A, Bolt HM: **Renal cell cancer risk and occupational exposure to trichloroethylene: results of a consecutive case-control study in Arnsberg, Germany**. *Am J Ind Med* 2003, **43**(3):274-285.
16. Vamvakas S, Bahner U, Heidland A: **Cancer in end-stage renal disease: potential factors involved -editorial**. *Am J Nephrol* 1998, **18**(2):89-95.

17. Stewart JH, Bucciante G, Agodoa L, Gellert R, McCredie MRE, Lowenfels AB, Disney APS, Wolfe RA, Boyle P, Maisonneuve P: **Cancers of the Kidney and Urinary Tract in Patients on Dialysis for End-Stage Renal Disease: Analysis of Data from the United States, Europe, and Australia and New Zealand.** *Journal of the American Society of Nephrology* 2003, **14**(1):197-207.
18. Gago-Dominguez M, Yuan JM, Castelao JE, Ross RK, Yu MC: **Family history and risk of renal cell carcinoma.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, **10**(9):1001-1004.
19. Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, Zbar B, Linehan WM: **Hereditary renal cancers.** *Radiology* 2003, **226**(1):33-46.
20. Kuroda N, Toi M, Hiroi M, Enzan H: **Review of papillary renal cell carcinoma with focus on clinical and pathobiological aspects.** *Histol Histopathol* 2003, **18**(2):487-494.
21. Pavlovich CP, Walther MM, Eyler RA, Hewitt SM, Zbar B, Linehan WM, Merino MJ: **Renal tumors in the Birt-Hogg-Dubé syndrome.** *Am J Surg Pathol* 2002, **26**(12):1542-1552.
22. Zbar B, Alvord WG, Glenn G, Turner M, Pavlovich CP, Schmidt L, Walther M, Choyke P, Weirich G, Hewitt SM *et al*: **Risk of Renal and Colonic Neoplasms and Spontaneous Pneumothorax in the Birt-Hogg-Dubé Syndrome.** *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2002, **11**(4):393-400.
23. Lehtonen HJ: **Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: update on clinical and molecular characteristics.** *Fam Cancer* 2011, **10**(2):397-411.
24. Rakowski SK, Winterkorn EB, Paul E, Steele DJ, Halpern EF, Thiele EA: **Renal manifestations of tuberous sclerosis complex: Incidence, prognosis, and predictive factors.** *Kidney Int* 2006, **70**(10):1777-1782.
25. Chittiboina P, Lonser RR: **Von Hippel-Lindau disease.** *Handb Clin Neurol* 2015, **132**:139-156.
26. Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG, Jr.: **Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein.** *Cancer Cell* 2002, **1**(3):237-246.
27. Curti BD: **Renal cell carcinoma.** *Jama* 2004, **292**(1):97-100.
28. Bedke J, Buse S, Kurosch M, Haferkamp A, Jäger D, Hohenfellner M: **Paraneoplastische Syndrome des Nierenzellkarzinoms.** *Der Urologe A* 2007, **46**.
29. Jayson M, Sanders H: **Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma.** *Urology* 1998, **51**(2):203-205.
30. Luciani LG, Cestari R, Tallarigo C: **Incidental renal cell carcinoma-age and stage characterization and clinical implications: study of 1092 patients (1982-1997).** *Urology* 2000, **56**(1):58-62.
31. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM: **The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours.** *Eur Urol* 2016, **70**(1):93-105.
32. Finelli A, Cheung DC, Al-Matar A, Evans AJ, Morash CG, Pautler SE, Siemens DR, Tanguay S, Rendon RA, Gleave ME *et al*: **Small Renal**

- Mass Surveillance: Histology-specific Growth Rates in a Biopsy-characterized Cohort.** *Eur Urol* 2020, **78**(3):460-467.
33. Dabestani S, Marconi L, Hofmann F, Stewart F, Lam TB, Canfield SE, Staehler M, Powles T, Ljungberg B, Bex A: **Local treatments for metastases of renal cell carcinoma: a systematic review.** *Lancet Oncol* 2014, **15**(12):e549-561.
 34. Scosyrev E, Messing EM, Sylvester R, Campbell S, Van Poppel H: **Renal function after nephron-sparing surgery versus radical nephrectomy: results from EORTC randomized trial 30904.** *Eur Urol* 2014, **65**(2):372-377.
 35. MacLennan S, Imamura M, Lapitan MC, Omar MI, Lam TB, Hilvano-Cabungcal AM, Royle P, Stewart F, MacLennan G, MacLennan SJ *et al*: **Systematic review of oncological outcomes following surgical management of localised renal cancer.** *Eur Urol* 2012, **61**(5):972-993.
 36. MacLennan S, Imamura M, Lapitan MC, Omar MI, Lam TB, Hilvano-Cabungcal AM, Royle P, Stewart F, MacLennan G, MacLennan SJ *et al*: **Systematic review of perioperative and quality-of-life outcomes following surgical management of localised renal cancer.** *Eur Urol* 2012, **62**(6):1097-1117.
 37. Van Poppel H, Da Pozzo L, Albrecht W, Matveev V, Bono A, Borkowski A, Colombel M, Klotz L, Skinner E, Keane T *et al*: **A prospective, randomised EORTC intergroup phase 3 study comparing the oncologic outcome of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma.** *Eur Urol* 2011, **59**(4):543-552.
 38. Hemal AK, Kumar A: **A prospective comparison of laparoscopic and robotic radical nephrectomy for T1-2N0M0 renal cell carcinoma.** *World J Urol* 2009, **27**(1):89-94.
 39. Van Poppel H, Becker F, Cadeddu JA, Gill IS, Janetschek G, Jewett MA, Laguna MP, Marberger M, Montorsi F, Polascik TJ *et al*: **Treatment of localised renal cell carcinoma.** *Eur Urol* 2011, **60**(4):662-672.
 40. Bernhard JC, Pantuck AJ, Wallerand H, Crepel M, Ferrière JM, Bellec L, Maurice-Tison S, Robert G, Albouy B, Pasticier G *et al*: **Predictive factors for ipsilateral recurrence after nephron-sparing surgery in renal cell carcinoma.** *Eur Urol* 2010, **57**(6):1080-1086.
 41. Marszalek M, Carini M, Chlosta P, Jeschke K, Kirkali Z, Knüchel R, Madersbacher S, Patard JJ, Van Poppel H: **Positive surgical margins after nephron-sparing surgery.** *Eur Urol* 2012, **61**(4):757-763.
 42. Kwon EO, Carver BS, Snyder ME, Russo P: **Impact of positive surgical margins in patients undergoing partial nephrectomy for renal cortical tumours.** *BJU Int* 2007, **99**(2):286-289.
 43. Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R, Tangen C, Van Poppel H, Crawford ED: **Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis.** *J Urol* 2004, **171**(3):1071-1076.
 44. Spiess PE, Fishman MN: **Cytoreductive nephrectomy vs medical therapy as initial treatment: a rational approach to the sequence question in metastatic renal cell carcinoma.** *Cancer Control* 2010, **17**(4):269-278.

45. **Clinical Trial to Assess the Importance of Nephrectomy.** In.: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00930033>.
46. Kierney PC, van Heerden JA, Segura JW, Weaver AL: **Surgeon's role in the management of solitary renal cell carcinoma metastases occurring subsequent to initial curative nephrectomy: an institutional review.** *Ann Surg Oncol* 1994, **1**(4):345-352.
47. Kavolius JP, Mastorakos DP, Pavlovich C, Russo P, Burt ME, Brady MS: **Resection of metastatic renal cell carcinoma.** *J Clin Oncol* 1998, **16**(6):2261-2266.
48. van der Poel HG, Roukema JA, Horenblas S, van Geel AN, Debruyne FM: **Metastasectomy in renal cell carcinoma: A multicenter retrospective analysis.** *Eur Urol* 1999, **35**(3):197-203.
49. Ranck MC, Golden DW, Corbin KS, Hasselle MD, Liauw SL, Stadler WM, Hahn OM, Weichselbaum RR, Salama JK: **Stereotactic body radiotherapy for the treatment of oligometastatic renal cell carcinoma.** *Am J Clin Oncol* 2013, **36**(6):589-595.
50. De Meerleer G, Khoo V, Escudier B, Joniau S, Bossi A, Ost P, Briganti A, Fonteyne V, Van Vulpen M, Lumen N *et al*: **Radiotherapy for renal-cell carcinoma.** *Lancet Oncol* 2014, **15**(4):e170-177.
51. Buti S, Bersanelli M, Sikokis A, Maines F, Facchinetti F, Bria E, Ardizzoni A, Tortora G, Massari F: **Chemotherapy in metastatic renal cell carcinoma today? A systematic review.** *Anticancer Drugs* 2013, **24**(6):535-554.
52. Yang JC: **Bevacizumab for patients with metastatic renal cancer: an update.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(18 Pt 2):6367s-6370s.
53. Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Fergelot P: **Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma.** *Eur Urol* 2006, **49**(4):633-643.
54. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA: **A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer.** *N Engl J Med* 2003, **349**(5):427-434.
55. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E *et al*: **Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial.** *Lancet* 2007, **370**(9605):2103-2111.
56. Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, Nathan P, Staehler M, de Souza P, Merchan JR *et al*: **Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma.** *N Engl J Med* 2013, **369**(8):722-731.
57. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, Barrios CH, Salman P, Gladkov OA, Kavina A *et al*: **Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial.** *J Clin Oncol* 2010, **28**(6):1061-1068.
58. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST *et al*: **Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma.** *N Engl J Med* 2007, **356**(2):115-124.

59. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Pili R, Bjarnason GA *et al*: **Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(22):3584-3590.
60. Motzer RJ, Nosov D, Eisen T, Bondarenko I, Lesovoy V, Lipatov O, Tomczak P, Lyulko O, Alyasova A, Harza M *et al*: **Tivozanib versus sorafenib as initial targeted therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: results from a phase III trial.** *J Clin Oncol* 2013, **31**(30):3791-3799.
61. Frankenberger B, Noessner E, Schendel DJ: **Immune suppression in renal cell carcinoma.** *Semin Cancer Biol* 2007, **17**(4):330-343.
62. Pardoll DM: **The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.** *Nat Rev Cancer* 2012, **12**(4):252-264.
63. Inman BA, Frigola X, Dong H, Kwon ED: **Costimulation, coinhibition and cancer.** *Curr Cancer Drug Targets* 2007, **7**(1):15-30.
64. Heng DY, Xie W, Regan MM, Harshman LC, Bjarnason GA, Vaishampayan UN, Mackenzie M, Wood L, Donskov F, Tan MH *et al*: **External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study.** *Lancet Oncol* 2013, **14**(2):141-148.
65. Elhilali MM, Gleave M, Fradet Y, Davis I, Venner P, Saad F, Klotz L, Moore R, Ernst S, Paton V: **Placebo-associated remissions in a multicentre, randomized, double-blind trial of interferon gamma-1b for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. The Canadian Urologic Oncology Group.** *BJU Int* 2000, **86**(6):613-618.
66. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, Pouliot F, Alekseev B, Soulières D, Melichar B *et al*: **Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma.** *N Engl J Med* 2019, **380**(12):1116-1127.
67. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, Venugopal B, Kollmannsberger C, Negrier S, Uemura M *et al*: **Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma.** *N Engl J Med* 2019, **380**(12):1103-1115.
68. Choueiri TK, Powles T, Burotto M, Escudier B, Bourlon MT, Zurawski B, Oyervides Juárez VM, Hsieh JJ, Basso U, Shah AY *et al*: **Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma.** *N Engl J Med* 2021, **384**(9):829-841.
69. Bedke J, Albiges L, Capitanio U, Giles RH, Hora M, Lam TB, Ljungberg B, Marconi L, Klatter T, Volpe A *et al*: **The 2021 Updated European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: Immune Checkpoint Inhibitor-based Combination Therapies for Treatment-naive Metastatic Clear-cell Renal Cell Carcinoma Are Standard of Care.** *Eur Urol* 2021.
70. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Burotto M, Choueiri T, Hammers HJ, Plimack ER, Porta CG, George S, Powles TB *et al*: **661P Conditional survival and 5-year follow-up in CheckMate 214: First-line nivolumab**

- + ipilimumab (N+I) versus sunitinib (S) in advanced renal cell carcinoma (aRCC).** *Annals of Oncology* 2021, **32**:S685-S687.
71. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, Plimack ER, Barthélémy P, Porta C, George S *et al*: **Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma.** *N Engl J Med* 2018, **378**(14):1277-1290.
 72. Bhojani N, Jeldres C, Patard JJ, Perrotte P, Suardi N, Hutterer G, Patenaude F, Oudard S, Karakiewicz PI: **Toxicities associated with the administration of sorafenib, sunitinib, and temsirolimus and their management in patients with metastatic renal cell carcinoma.** *Eur Urol* 2008, **53**(5):917-930.
 73. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tykodi SS, Sosman JA, Procopio G, Plimack ER *et al*: **Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma.** *N Engl J Med* 2015, **373**(19):1803-1813.
 74. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Tannir NM, Mainwaring PN, Rini BI, Hammers HJ, Donskov F, Roth BJ, Peltola K *et al*: **Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial.** *Lancet Oncol* 2016, **17**(7):917-927.
 75. Peisen F, Thaiss W, Tietze N, Rausch S, Amend B, Nikolaou K, Bedke J, Stenzl A, Kaufmann S: **[Influence of immunomodulators on urological imaging].** *Urologe A* 2019, **58**(12):1451-1460.
 76. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A *et al*: **Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing.** *N Engl J Med* 2012, **366**(10):883-892.
 77. Weiss J, Notohamiprodjo M, Bedke J, Nikolaou K, Kaufmann S: **Imaging response assessment of immunotherapy in patients with renal cell and urothelial carcinoma.** *Curr Opin Urol* 2018, **28**(1):35-41.
 78. Motzer RJ, Porta C, Eto M, Powles T, Grünwald V, Hutson TE, Alekseev B, Rha SY, Kopyltsov E, Vidal MJM *et al*: **Phase 3 trial of lenvatinib (LEN) plus pembrolizumab (PEMBRO) or everolimus (EVE) versus sunitinib (SUN) monotherapy as a first-line treatment for patients (pts) with advanced renal cell carcinoma (RCC) (CLEAR study).** *Journal of Clinical Oncology* 2021, **39**(6_suppl):269-269.
 79. Johannsen M, Staehler M, Ohlmann CH, Flörcken A, Schmittel A, Otto T, Bex A, Hein P, Miller K, Weikert S *et al*: **Outcome of treatment discontinuation in patients with metastatic renal cell carcinoma and no evidence of disease following targeted therapy with or without metastasectomy.** *Ann Oncol* 2011, **22**(3):657-663.
 80. Rini BI, Motzer RJ, Powles T, McDermott DF, Escudier B, Donskov F, Hawkins R, Bracarda S, Bedke J, De Giorgi U *et al*: **Atezolizumab plus Bevacizumab Versus Sunitinib for Patients with Untreated Metastatic Renal Cell Carcinoma and Sarcomatoid Features: A Prespecified Subgroup Analysis of the IMmotion151 Clinical Trial.** *Eur Urol* 2021, **79**(5):659-662.

81. McDermott DF, Choueiri TK, Motzer RJ, Aren OR, George S, Powles T, Donskov F, Harrison MR, Cid JRRR, Ishii Y *et al*: **CheckMate 214 post-hoc analyses of nivolumab plus ipilimumab or sunitinib in IMDC intermediate/poor-risk patients with previously untreated advanced renal cell carcinoma with sarcomatoid features.** *Journal of Clinical Oncology* 2019, **37**(15_suppl):4513-4513.
82. **Neoadjuvant AXITINIB and AVELUMAB for Patients With Localized Clear-cell RCC.** In.: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03341845>.
83. Scherr AJ, Lima JP, Sasse EC, Lima CS, Sasse AD: **Adjuvant therapy for locally advanced renal cell cancer: a systematic review with meta-analysis.** *BMC Cancer* 2011, **11**:115.
84. Choueiri TK, Tomczak P, Park SH, Venugopal B, Ferguson T, Chang Y-H, Hajek J, Symeonides SN, Lee JL, Sarwar N *et al*: **Adjuvant Pembrolizumab after Nephrectomy in Renal-Cell Carcinoma.** *New England Journal of Medicine* 2021, **385**(8):683-694.
85. Amin MB, Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, de-Peralta Venturina M, Deshpande A, Menon M: **Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases.** *Am J Surg Pathol* 2002, **26**(3):281-291.
86. Stühler V, Rausch S, Kroll K, Scharpf M, Stenzl A, Bedke J: **The prognostic value of fat invasion and tumor expansion in the hilar veins in pT3a renal cell carcinoma.** *World J Urol* 2021.
87. Gudbjartsson T, Hardarson S, Petursdottir V, Thoroddsen A, Magnusson J, Einarsson GV: **Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: a retrospective nation-wide study of 629 patients.** *Eur Urol* 2005, **48**(4):593-600.
88. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML: **Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma.** *Am J Surg Pathol* 2003, **27**(5):612-624.
89. Adibi M, Thomas AZ, Borregales LD, Merrill MM, Slack RS, Chen HC, Sircar K, Murugan P, Tamboli P, Jonasch E *et al*: **Percentage of sarcomatoid component as a prognostic indicator for survival in renal cell carcinoma with sarcomatoid dedifferentiation.** *Urol Oncol* 2015, **33**(10):427.e417-423.
90. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, De La Taille A, Tostain J, Artibani W, Abbou CC *et al*: **Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience.** *J Clin Oncol* 2005, **23**(12):2763-2771.
91. Donin NM, Pantuck A, Klöpfer P, Bevan P, Fall B, Said J, Beldegrun AS, Chamie K: **Body Mass Index and Survival in a Prospective Randomized Trial of Localized High-Risk Renal Cell Carcinoma.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016, **25**(9):1326-1332.
92. Albiges L, Hakimi AA, Xie W, McKay RR, Simantov R, Lin X, Lee JL, Rini BI, Srinivas S, Bjarnason GA *et al*: **Body Mass Index and Metastatic Renal Cell Carcinoma: Clinical and Biological Correlations.** *J Clin Oncol* 2016, **34**(30):3655-3663.
93. Choi Y, Park B, Jeong BC, Seo SI, Jeon SS, Choi HY, Adami HO, Lee JE, Lee HM: **Body mass index and survival in patients with renal cell**

- carcinoma: a clinical-based cohort and meta-analysis.** *Int J Cancer* 2013, **132**(3):625-634.
94. Neumann E, Klaiber P, Freitag K, Schwab M, Schaeffeler E, Hennenlotter J, Fend F, Kruck S, Scharpf M, Stenzl A *et al*: **Assessment of concomitant non-oncologic medication in patients with surgically treated renal cell carcinoma: impact on prognosis, cell-cycle progression and proliferation.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2019, **145**(7):1835-1843.
 95. Kroeger N, Li H, De Velasco G, Donskov F, Sim HW, Stühler V, Wells JC, Stukalin I, Heide J, Bedke J *et al*: **Active Smoking Is Associated With Worse Prognosis in Metastatic Renal Cell Carcinoma Patients Treated With Targeted Therapies.** *Clin Genitourin Cancer* 2019, **17**(1):65-71.
 96. Li P, Wong YN, Armstrong K, Haas N, Subedi P, Davis-Cerone M, Doshi JA: **Survival among patients with advanced renal cell carcinoma in the pretargeted versus targeted therapy eras.** *Cancer Med* 2016, **5**(2):169-181.
 97. Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Frank I, Kwon ED, Weaver AL, Parker AS, Zincke H: **Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials.** *Cancer* 2003, **97**(7):1663-1671.
 98. Motzer RJ, Bacik J, Schwartz LH, Reuter V, Russo P, Marion S, Mazumdar M: **Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma.** *J Clin Oncol* 2004, **22**(3):454-463.
 99. Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T: **Immunotherapy for advanced renal cell cancer.** *Cochrane Database Syst Rev* 2005(1):Cd001425.
 100. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Powles T, Donskov F, Plimack ER, Barthélémy P, Hammers HJ *et al*: **Survival outcomes and independent response assessment with nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in patients with advanced renal cell carcinoma: 42-month follow-up of a randomized phase 3 clinical trial.** *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2020, **8**(2):e000891.
 101. Motzer R, Alekseev B, Rha SY, Porta C, Eto M, Powles T, Grunwald V, Hutson TE, Kopyltsov E, Mendez-Vidal MJ *et al*: **Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma.** *N Engl J Med* 2021.
 102. Powles T, Plimack ER, Soulières D, Waddell T, Stus V, Gafanov R, Nosov D, Pouliot F, Melichar B, Vynnychenko I *et al*: **Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib monotherapy as first-line treatment of advanced renal cell carcinoma (KEYNOTE-426): extended follow-up from a randomised, open-label, phase 3 trial.** *Lancet Oncol* 2020, **21**(12):1563-1573.
 103. Chan JY, Choudhury Y, Tan MH: **Predictive molecular biomarkers to guide clinical decision making in kidney cancer: current progress and future challenges.** *Expert Rev Mol Diagn* 2015, **15**(5):631-646.

104. Rausch S, Schollenberger D, Hennenlotter J, Stühler V, Kruck S, Stenzl A, Bedke J: **mTOR and mTOR phosphorylation status in primary and metastatic renal cell carcinoma tissue: differential expression and clinical relevance.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2019, **145**(1):153-163.
105. Stenman M, Laurell A, Lindskog M: **Prognostic significance of serum albumin in patients with metastatic renal cell carcinoma.** *Med Oncol* 2014, **31**(3):841.
106. Wald G, Barnes KT, Bing MT, Kresowik TP, Tomanek-Chalkley A, Kucaba TA, Griffith TS, Brown JA, Norian LA: **Minimal changes in the systemic immune response after nephrectomy of localized renal masses.** *Urol Oncol* 2014, **32**(5):589-600.
107. Ai L, Xu A, Xu J: **Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond.** *Adv Exp Med Biol* 2020, **1248**:33-59.
108. Lavacchi D, Pellegrini E, Palmieri VE, Doni L, Mela MM, Di Maida F, Amedei A, Pillozzi S, Carini M, Antonuzzo L: **Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Renal Cancer: Current State and Future Perspective.** *Int J Mol Sci* 2020, **21**(13).
109. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, Chen S, Klein AP, Pardoll DM, Topalian SL *et al*: **Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape.** *Sci Transl Med* 2012, **4**(127):127ra137.
110. Motzer RJ, Powles T, Atkins MB, Escudier B, McDermott DF, Suarez C, Bracarda S, Stadler WM, Donskov F, Lee J-L *et al*: **IMmotion151: A Randomized Phase III Study of Atezolizumab Plus Bevacizumab vs Sunitinib in Untreated Metastatic Renal Cell Carcinoma (mRCC).** *Journal of Clinical Oncology* 2018, **36**(6_suppl):578-578.
111. Rodriguez-Vida A, Strijbos M, Hutson T: **Predictive and prognostic biomarkers of targeted agents and modern immunotherapy in renal cell carcinoma.** *ESMO Open* 2016, **1**(3):e000013.
112. Kamai T, Kijima T, Tsuzuki T, Nukui A, Abe H, Arai K, Yoshida KI: **Increased expression of adenosine 2A receptors in metastatic renal cell carcinoma is associated with poorer response to anti-vascular endothelial growth factor agents and anti-PD-1/Anti-CTLA4 antibodies and shorter survival.** *Cancer Immunol Immunother* 2021, **70**(7):2009-2021.
113. Thompson RH, Dong H, Kwon ED: **Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(2 Pt 2):709s-715s.
114. Callea M, Albiges L, Gupta M, Cheng SC, Genega EM, Fay AP, Song J, Carvo I, Bhatt RS, Atkins MB *et al*: **Differential Expression of PD-L1 between Primary and Metastatic Sites in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma.** *Cancer Immunol Res* 2015, **3**(10):1158-1164.
115. Choueiri TK, Figueroa DJ, Fay AP, Signoretti S, Liu Y, Gagnon R, Deen K, Carpenter C, Benson P, Ho TH *et al*: **Correlation of PD-L1 tumor expression and treatment outcomes in patients with renal cell**

- carcinoma receiving sunitinib or pazopanib: results from COMPARZ, a randomized controlled trial.** *Clin Cancer Res* 2015, **21**(5):1071-1077.
116. Lu Y, Song Y, Xu Y, Ou N, Liang Z, Hu R, Zhang W, Kang J, Wang X, Liu L *et al*: **The prevalence and prognostic and clinicopathological value of PD-L1 and PD-L2 in renal cell carcinoma patients: a systematic review and meta-analysis involving 3,389 patients.** *Transl Androl Urol* 2020, **9**(2):367-381.
 117. Zhang X, Yin X, Zhang H, Sun G, Yang Y, Chen J, Zhu X, Zhao P, Zhao J, Liu J *et al*: **Differential expressions of PD-1, PD-L1 and PD-L2 between primary and metastatic sites in renal cell carcinoma.** *BMC Cancer* 2019, **19**(1):360.
 118. Cimadamore A, Massari F, Santoni M, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, Montironi R, Moch H: **PD1 and PD-L1 Inhibitors for the Treatment of Kidney Cancer: The Role of PD-L1 Assay.** *Curr Drug Targets* 2020, **21**(16):1664-1671.
 119. Jilaveanu LB, Shuch B, Zito CR, Parisi F, Barr M, Kluger Y, Chen L, Kluger HM: **PD-L1 Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: An Analysis of Nephrectomy and Sites of Metastases.** *J Cancer* 2014, **5**(3):166-172.
 120. Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, Yearley JH, Kefford RF, Thompson JF, Long GV *et al*: **PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials.** *Pigment Cell Melanoma Res* 2015, **28**(3):245-253.
 121. McLaughlin J, Han G, Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, Pelekanou V, Rehman J, Velcheti V, Herbst R, LoRusso P, Rimm DL: **Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer.** *JAMA Oncol* 2016, **2**(1):46-54.
 122. Choueiri TK, Fishman MN, Escudier B, McDermott DF, Drake CG, Kluger H, Stadler WM, Perez-Gracia JL, McNeel DG, Curti B *et al*: **Immunomodulatory Activity of Nivolumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2016, **22**(22):5461-5471.
 123. Iacovelli R, Nolè F, Verri E, Renne G, Paglino C, Santoni M, Cossu Rocca M, Giglione P, Aurilio G, Cullurà D *et al*: **Prognostic Role of PD-L1 Expression in Renal Cell Carcinoma. A Systematic Review and Meta-Analysis.** *Target Oncol* 2016, **11**(2):143-148.
 124. Choueiri TK, Albiges L, Haanen JBAG, Larkin JMG, Uemura M, Pal SK, Gravis G, Campbell MT, Penkov K, Lee J-L *et al*: **Biomarker analyses from JAVELIN Renal 101: Avelumab + axitinib (A+Ax) versus sunitinib (S) in advanced renal cell carcinoma (aRCC).** *Journal of Clinical Oncology* 2019, **37**(15_suppl):101-101.
 125. Choueiri TK, Motzer RJ, Rini BI, Haanen J, Campbell MT, Venugopal B, Kollmannsberger C, Gravis-Mescam G, Uemura M, Lee JL *et al*: **Updated efficacy results from the JAVELIN Renal 101 trial: first-line avelumab plus axitinib versus sunitinib in patients with advanced renal cell carcinoma.** *Ann Oncol* 2020, **31**(8):1030-1039.
 126. Motzer RJ, Powles T, Atkins MB, Escudier B, McDermott DF, Alekseev BY, Lee JL, Suarez C, Stroyakovskiy D, De Giorgi U *et al*: **Final Overall**

- Survival and Molecular Analysis in IMmotion151, a Phase 3 Trial Comparing Atezolizumab Plus Bevacizumab vs Sunitinib in Patients With Previously Untreated Metastatic Renal Cell Carcinoma.** *JAMA Oncol* 2022, **8**(2):275-280.
127. Rini BI, Powles T, Atkins MB, Escudier B, McDermott DF, Suarez C, Bracarda S, Stadler WM, Donskov F, Lee JL *et al*: **Atezolizumab plus bevacizumab versus sunitinib in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma (IMmotion151): a multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled trial.** *Lancet* 2019, **393**(10189):2404-2415.
 128. Chen YL, Lin HW, Chien CL, Lai YL, Sun WZ, Chen CA, Cheng WF: **BTLA blockade enhances Cancer therapy by inhibiting IL-6/IL-10-induced CD19(high) B lymphocytes.** *J Immunother Cancer* 2019, **7**(1):313.
 129. Fourcade J, Sun Z, Pagliano O, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, Kirkwood JM, Olive D, Kuchroo V, Zarour HM: **CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1.** *Cancer Res* 2012, **72**(4):887-896.
 130. Kim PS, Ahmed R: **Features of responding T cells in cancer and chronic infection.** *Curr Opin Immunol* 2010, **22**(2):223-230.
 131. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W: **T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment.** *Curr Opin Immunol* 2013, **25**(2):214-221.
 132. Hurchla MA, Sedy JR, Gavrieli M, Drake CG, Murphy TL, Murphy KM: **B and T lymphocyte attenuator exhibits structural and expression polymorphisms and is highly Induced in anergic CD4+ T cells.** *J Immunol* 2005, **174**(6):3377-3385.
 133. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang J, Fallarino F, Loftin SK, Hurchla MA, Zimmerman N, Sim J, Zang X *et al*: **BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1.** *Nat Immunol* 2003, **4**(7):670-679.
 134. Mariat C, Sánchez-Fueyo A, Alexopoulos SP, Kenny J, Strom TB, Zheng XX: **Regulation of T cell dependent immune responses by TIM family members.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005, **360**(1461):1681-1685.
 135. Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S, Kuchroo VK: **The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases.** *Trends Mol Med* 2005, **11**(8):362-369.
 136. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK: **Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation.** *Immunity* 2016, **44**(5):989-1004.
 137. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK: **The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity.** *Nat Immunol* 2005, **6**(12):1245-1252.
 138. van de Weyer PS, Muehlfeit M, Klose C, Bonventre JV, Walz G, Kuehn EW: **A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon**

- stimulation by its ligand galectin-9. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **351**(2):571-576.
139. Oikawa T, Kamimura Y, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Takahashi H, Zeniya M, Tajiri H, Azuma M: **Preferential involvement of Tim-3 in the regulation of hepatic CD8+ T cells in murine acute graft-versus-host disease.** *J Immunol* 2006, **177**(7):4281-4287.
 140. Wiener Z, Kohalmi B, Pocza P, Jeager J, Tolgyesi G, Toth S, Gorbe E, Papp Z, Falus A: **TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells.** *J Invest Dermatol* 2007, **127**(4):906-914.
 141. Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, Domenig C, Zheng XX, Sabatos CA, Manlongat N, Bender O, Kamradt T, Kuchroo VK *et al*: **Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance.** *Nat Immunol* 2003, **4**(11):1093-1101.
 142. Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, Schubart A, Sánchez-Fueyo A, Zheng XX, Coyle AJ, Strom TB, Freeman GJ, Kuchroo VK: **Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance.** *Nat Immunol* 2003, **4**(11):1102-1110.
 143. Koguchi K, Anderson DE, Yang L, O'Connor KC, Kuchroo VK, Hafler DA: **Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis.** *J Exp Med* 2006, **203**(6):1413-1418.
 144. Frisancho-Kiss S, Nyland JF, Davis SE, Barrett MA, Gatewood SJ, Njoku DB, Cihakova D, Silbergeld EK, Rose NR, Fairweather D: **Cutting edge: T cell Ig mucin-3 reduces inflammatory heart disease by increasing CTLA-4 during innate immunity.** *J Immunol* 2006, **176**(11):6411-6415.
 145. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC: **Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity.** *J Exp Med* 2010, **207**(10):2187-2194.
 146. Granier C, Vinatier E, Colin E, Mandavit M, Dariane C, Verkarre V, Biard L, El Zein R, Lesaffre C, Galy-Fauroux I *et al*: **Multiplexed Immunofluorescence Analysis and Quantification of Intratumoral PD-1+ Tim-3+ CD8+ T Cells.** *J Vis Exp* 2018(132).
 147. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet AL, Latreche S, Bergaya S, Benhamouda N, Tanchot C *et al*: **VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors.** *J Exp Med* 2015, **212**(2):139-148.
 148. Kato R, Jinnouchi N, Tuyukubo T, Ikarashi D, Matsuura T, Maekawa S, Kato Y, Kanehira M, Takata R, Ishida K *et al*: **TIM3 expression on tumor cells predicts response to anti-PD-1 therapy for renal cancer.** *Transl Oncol* 2021, **14**(1):100918.
 149. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP: **CTLA-4-Mediated Inhibition in Regulation of T Cell Responses: Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy.** *Annual Review of Immunology* 2001, **19**(1):565-594.
 150. Kahlmeyer A, Stöhr CG, Hartmann A, Goebell PJ, Wullich B, Wach S, Taubert H, Erlmeier F: **Expression of PD-1 and CTLA-4 Are Negative Prognostic Markers in Renal Cell Carcinoma.** *J Clin Med* 2019, **8**(5).

151. Zhang S, Zhang E, Long J, Hu Z, Peng J, Liu L, Tang F, Li L, Ouyang Y, Zeng Z: **Immune infiltration in renal cell carcinoma.** *Cancer Sci* 2019, **110**(5):1564-1572.
152. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DA: **LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target.** *Immunol Rev* 2017, **276**(1):80-96.
153. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, Hercend T: **LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4.** *J Exp Med* 1990, **171**(5):1393-1405.
154. Workman CJ, Dugger KJ, Vignali DA: **Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3.** *J Immunol* 2002, **169**(10):5392-5395.
155. Huang RY, Eppolito C, Lele S, Shrikant P, Matsuzaki J, Odunsi K: **LAG3 and PD1 co-inhibitory molecules collaborate to limit CD8+ T cell signaling and dampen antitumor immunity in a murine ovarian cancer model.** *Oncotarget* 2015, **6**(29):27359-27377.
156. Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, Bettini ML, Gravano DM, Vogel P, Liu CL *et al*: **Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape.** *Cancer Res* 2012, **72**(4):917-927.
157. Takamatsu K, Tanaka N, Hakozaiki K, Takahashi R, Teranishi Y, Murakami T, Kufukihara R, Niwa N, Mikami S, Shinojima T *et al*: **Profiling the inhibitory receptors LAG-3, TIM-3, and TIGIT in renal cell carcinoma reveals malignancy.** *Nat Commun* 2021, **12**(1):5547.
158. Brignone C, Escudier B, Grygar C, Marcu M, Triebel F: **A phase I pharmacokinetic and biological correlative study of IMP321, a novel MHC class II agonist, in patients with advanced renal cell carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(19):6225-6231.
159. **An Investigational Immuno-therapy Study to Assess the Safety, Tolerability and Effectiveness of Anti-LAG-3 With and Without Anti-PD-1 in the Treatment of Solid Tumors.** In.: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01968109>.
160. **Safety and Efficacy of LAG525 Single Agent and in Combination With PDR001 in Patients With Advanced Malignancies.** In.: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02460224>.
161. Zelba H, Bedke J, Hennenlotter J, Mostböck S, Zettl M, Zichner T, Chandran A, Stenzl A, Rammensee HG, Gouttefangeas C: **PD-1 and LAG-3 Dominate Checkpoint Receptor-Mediated T-cell Inhibition in Renal Cell Carcinoma.** *Cancer Immunol Res* 2019, **7**(11):1891-1899.
162. Motzer RJ, Robbins PB, Powles T, Albiges L, Haanen JB, Larkin J, Mu XJ, Ching KA, Uemura M, Pal SK *et al*: **Avelumab plus axitinib versus sunitinib in advanced renal cell carcinoma: biomarker analysis of the phase 3 JAVELIN Renal 101 trial.** *Nat Med* 2020, **26**(11):1733-1741.
163. McDermott DF, Huseni MA, Atkins MB, Motzer RJ, Rini BI, Escudier B, Fong L, Joseph RW, Pal SK, Reeves JA *et al*: **Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma.** *Nat Med* 2018, **24**(6):749-757.

164. Rini BI, Huseni M, Atkins MB, McDermott DF, Powles TB, Escudier B, Banchereau R, Liu LF, Leng N, Fan J *et al*: **LBA31 - Molecular correlates differentiate response to atezolizumab (atezo) + bevacizumab (bev) vs sunitinib (sun): Results from a phase III study (IMmotion151) in untreated metastatic renal cell carcinoma (mRCC).** *Annals of Oncology* 2018, **29**:viii724-viii725.
165. Motzer RJ, Choueiri TK, McDermott DF, Powles T, Yao J, Ammar R, Papillon-Cavanagh S, Saggi SS, McHenry BM, Ross-Macdonald P *et al*: **Biomarker analyses from the phase III CheckMate 214 trial of nivolumab plus ipilimumab (N+I) or sunitinib (S) in advanced renal cell carcinoma (aRCC).** *Journal of Clinical Oncology* 2020, **38**(15_suppl):5009-5009.
166. Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, Fisher R, McGranahan N, Matthews N, Santos CR *et al*: **Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing.** *Nat Genet* 2014, **46**(3):225-233.
167. Miao D, Margolis CA, Gao W, Voss MH, Li W, Martini DJ, Norton C, Bossé D, Wankowicz SM, Cullen D *et al*: **Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma.** *Science (New York, NY)* 2018, **359**(6377):801-806.
168. Voss MH, Kuo F, Chen D, Marker M, Patel P, Redzematovic A, Riaz N, Chan TA, Choueiri TK, Hsieh J *et al*: **Integrated biomarker analysis for 412 renal cell cancer (RCC) patients (pts) treated on the phase 3 COMPARZ trial: Correlating common mutation events in PBRM1 and BAP1 with angiogenesis expression signatures and outcomes on tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy.** *Journal of Clinical Oncology* 2017, **35**(15_suppl):4523-4523.
169. Hsieh JJ, Chen D, Wang PI, Marker M, Redzematovic A, Chen YB, Selcuklu SD, Weinhold N, Bouvier N, Huberman KH *et al*: **Genomic Biomarkers of a Randomized Trial Comparing First-line Everolimus and Sunitinib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma.** *Eur Urol* 2017, **71**(3):405-414.
170. Zhou X, Hou W, Gao L, Shui L, Yi C, Zhu H: **Synergies of Antiangiogenic Therapy and Immune Checkpoint Blockade in Renal Cell Carcinoma: From Theoretical Background to Clinical Reality.** *Front Oncol* 2020, **10**:1321.
171. Semenza GL: **HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations.** *J Clin Invest* 2013, **123**(9):3664-3671.
172. Agarwala SS, Case S: **Everolimus (RAD001) in the treatment of advanced renal cell carcinoma: a review.** *Oncologist* 2010, **15**(3):236-245.
173. Cozar JM, Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F, Vilchez JR, Tallada M, Garrido F, Ruiz-Cabello F: **High incidence of CTLA-4 AA (CT60) polymorphism in renal cell cancer.** *Hum Immunol* 2007, **68**(8):698-704.
174. Tupikowski K, Partyka A, Kolodziej A, Dembowski J, Debinski P, Halon A, Zdrojowy R, Frydecka I, Karabon L: **CTLA-4 and CD28 genes'**

- polymorphisms and renal cell carcinoma susceptibility in the Polish population--a prospective study. *Tissue Antigens* 2015, **86**(5):353-361.
175. Zhao W, Zhao F, Yang K, Lu Y, Zhang Y, Wang W, Xie H, Deng K, Yang C, Rong Z *et al*: **An immunophenotyping of renal clear cell carcinoma with characteristics and a potential therapeutic target for patients insensitive to immune checkpoint blockade.** *J Cell Biochem* 2019, **120**(8):13330-13341.
 176. Wu X, Zhao Z, Khan A, Cai C, Lv D, Gu D, Liu Y: **Identification of a Novel Signature and Construction of a Nomogram Predicting Overall Survival in Clear Cell Renal Cell Carcinoma.** *Front Genet* 2020, **11**:1017.
 177. Kandabarau S, Leiz J, Krohn K, Winter S, Bedke J, Schwab M, Schaeffeler E, Edemir B: **Hypertonicity-Affected Genes Are Differentially Expressed in Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Correlate with Cancer-Specific Survival.** *Cancers (Basel)* 2019, **12**(1).
 178. Liao Z, Yao H, Wei J, Feng Z, Chen W, Luo J, Chen X: **Development and validation of the prognostic value of the immune-related genes in clear cell renal cell carcinoma.** *Transl Androl Urol* 2021, **10**(4):1607-1619.
 179. Li F, Hu W, Zhang W, Li G, Guo Y: **A 17-Gene Signature Predicted Prognosis in Renal Cell Carcinoma.** *Dis Markers* 2020, **2020**:8352809.
 180. Simonaggio A, Epailard N, Pobel C, Moreira M, Oudard S, Vano YA: **Tumor Microenvironment Features as Predictive Biomarkers of Response to Immune Checkpoint Inhibitors (ICI) in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma (mccRCC).** *Cancers (Basel)* 2021, **13**(2).
 181. Heidegger I, Pircher A, Pichler R: **Targeting the Tumor Microenvironment in Renal Cell Cancer Biology and Therapy.** *Front Oncol* 2019, **9**:490.
 182. Yuki K, Cheng N, Nakano M, Kuo CJ: **Organoid Models of Tumor Immunology.** *Trends Immunol* 2020, **41**(8):652-664.
 183. Chevrier S, Levine JH, Zanotelli VRT, Silina K, Schulz D, Bacac M, Ries CH, Ailles L, Jewett MAS, Moch H *et al*: **An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma.** *Cell* 2017, **169**(4):736-749.e718.
 184. Finke JH, Rayman PA, Ko JS, Bradley JM, Gendler SJ, Cohen PA: **Modification of the tumor microenvironment as a novel target of renal cell carcinoma therapeutics.** *Cancer J* 2013, **19**(4):353-364.
 185. Gantt S, Gervassi A, Jaspan H, Horton H: **The role of myeloid-derived suppressor cells in immune ontogeny.** *Front Immunol* 2014, **5**:387.
 186. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ: **Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy.** *Cancer Immunol Immunother* 2009, **58**(1):49-59.
 187. Guan X, Liu Z, Zhang J, Jin X: **Myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma is correlated with CCL2, IL-17 and IL-18 expression in blood and tumors.** *Adv Clin Exp Med* 2018, **27**(7):947-953.

188. Neal JT, Li X, Zhu J, Giangarra V, Grzeskowiak CL, Ju J, Liu IH, Chiou SH, Salahudeen AA, Smith AR *et al*: **Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment**. *Cell* 2018, **175**(7):1972-1988 e1916.
189. Ko JJ, Xie W, Kroeger N, Lee JL, Rini BI, Knox JJ, Bjarnason GA, Srinivas S, Pal SK, Yuasa T *et al*: **The International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium model as a prognostic tool in patients with metastatic renal cell carcinoma previously treated with first-line targeted therapy: a population-based study**. *Lancet Oncol* 2015, **16**(3):293-300.
190. Clark JI, Wong MKK, Kaufman HL, Daniels GA, Morse MA, McDermott DF, Agarwala SS, Lewis LD, Stewart JH, Vaishampayan U *et al*: **Impact of Sequencing Targeted Therapies With High-dose Interleukin-2 Immunotherapy: An Analysis of Outcome and Survival of Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma From an On-going Observational IL-2 Clinical Trial: PROCLAIMSM**. *Clinical Genitourinary Cancer* 2017, **15**(1):31-41.e34.
191. Di Bona C, Stühler V, Rausch S, Stenzl A, Bedke J: **Pembrolizumab for the treatment of renal cell carcinoma**. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2021, **21**(9):1157-1164.
192. Sauter-Meyerhoff C, Bohnert R, Mazzola P, Stühler V, Kandabarau S, Büttner FA, Winter S, Herrmann L, Rausch S, Hennenlotter J *et al*: **Characterization of Genetic Heterogeneity in Recurrent Metastases of Renal Cell Carcinoma**. *Cancers (Basel)* 2021, **13**(24).
193. Qiagen: **RNeasy DSP FFPE Kit Gebrauchsanweisung (Handbuch) 06/2022**.
194. Battifora H: **The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing**. *Lab Invest* 1986, **55**(2):244-248.
195. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: **Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens**. *Nat Med* 1998, **4**(7):844-847.
196. Giltnane JM, Rimm DL: **Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology**. *Nat Clin Pract Oncol* 2004, **1**(2):104-111.
197. Cregger M, Berger AJ, Rimm DL: **Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression**. *Arch Pathol Lab Med* 2006, **130**(7):1026-1030.
198. Camp RL, Chung GG, Rimm DL: **Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays**. *Nat Med* 2002, **8**(11):1323-1327.
199. Fisel P, Stühler V, Bedke J, Winter S, Rausch S, Hennenlotter J, Nies AT, Stenzl A, Scharpf M, Fend F *et al*: **MCT4 surpasses the prognostic relevance of the ancillary protein CD147 in clear cell renal cell carcinoma**. *Oncotarget* 2015, **6**(31):30615-30627.
200. Reustle A, Menig LS, Leuthold P, Hofmann U, Stühler V, Schmees C, Becker M, Haag M, Klumpp V, Winter S *et al*: **Nicotinamide-N-methyltransferase is a promising metabolic drug target for primary**

- and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Clin Transl Med* 2022, **12**(6):e883.
201. Promega: **Celltox-green-cytotoxicity-assay-protocol.** <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/celltox-green-cytotoxicity-assay-protocol.pdf> Entnommen am **24.02.2023**.
 202. Harrell JFE: **Regression Modeling Strategies: With Applications to Linear Models, Logistic and Ordinal Regression, and Survival Analysis.** In: *Regression Modeling Strategies: With Applications to Linear Models, Logistic and Ordinal Regression, and Survival Analysis.* edn. Cham: Springer International Publishing; 2015: 311-325.
 203. Solomon SR, Sawilowsky S: **Impact of Rank-Based Normalizing Transformations on the Accuracy of Test Scores.** *Journal of Modern Applied Statistical Methods* 2009, **8**:448-462.
 204. Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.** *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 1995, **57**(1):289-300.
 205. Team RC: **R: A language and environment for statistical computing.** 2013.
 206. Kampstra P: **Beanplot: A Boxplot Alternative for Visual Comparison of Distributions.** *Journal of Statistical Software, Code Snippets* 2008, **28**(1):1 - 9.
 207. Hothorn T, Hornik K, van de Wiel MA, Zeileis A: **A Lego System for Conditional Inference.** *The American Statistician* 2006, **60**(3):257-263.
 208. Harrell JFE: **rms: Regression Modeling Strategies. R package version 6.1-1.** <https://CRAN.R-project.org/package=rms>. In.; 2021.
 209. Clark JI, Wong MKK, Kaufman HL, Daniels GA, Morse MA, McDermott DF, Agarwala SS, Lewis LD, Stewart JH, Vaishampayan U *et al*: **Impact of Sequencing Targeted Therapies With High-dose Interleukin-2 Immunotherapy: An Analysis of Outcome and Survival of Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma From an On-going Observational IL-2 Clinical Trial: PROCLAIM(SM).** *Clin Genitourin Cancer* 2017, **15**(1):31-41.e34.
 210. Larrinaga G, Solano-Iturri J, Errarte Yarza P, Unda M, Loizaga-Iriarte A, Pérez-Fernández A, Echevarría E, Asumendi A, Manini C, Angulo J: **Soluble PD-L1 Is an Independent Prognostic Factor in Clear Cell Renal Cell Carcinoma.** *Cancers* 2021, **13**:667.
 211. Stühler V, Alemi B, Rausch S, Stenzl A, Schwab M, Schaeffeler E, Bedke J: **Analysis of the immunological markers BTLA, TIM-3, and PD-L1 at the invasion front and tumor center in clear cell renal cell carcinoma.** *World J Urol* 2024, **42**(1):53.
 212. Mahoney KM, Ross-Macdonald P, Yuan L, Song L, Veras E, Wind-Rotolo M, McDermott DF, Stephen Hodi F, Choueiri TK, Freeman GJ: **Soluble PD-L1 as an early marker of progressive disease on nivolumab.** *J Immunother Cancer* 2022, **10**(2).
 213. Zhang X, Yin X, Zhang H, Sun G, Yang Y, Chen J, Shu K, Zhao J, Zhao P, Chen N *et al*: **Differential expression of TIM-3 between primary and metastatic sites in renal cell carcinoma.** *BMC Cancer* 2019, **19**(1):49.

214. Schoenfeld DA, Merkin RD, Moutafi M, Martinez S, Adeniran A, Kumar D, Jilaveanu L, Hurwitz M, Rimm DL, Kluger HM: **Location matters: LAG3 levels are lower in renal cell carcinoma metastatic sites compared to primary tumors, and expression at metastatic sites only may have prognostic importance.** *Front Oncol* 2022, **12**:990367.
215. Lee CH, Jung SJ, Seo WI, Chung JI, Lee DS, Jeong DH, Jeon Y, Choi I: **Coexpression of lymphocyte-activation gene 3 and programmed death ligand-1 in tumor infiltrating immune cells predicts worse outcome in renal cell carcinoma.** *Int J Immunopathol Pharmacol* 2022, **36**:3946320221125588.
216. Massouh Skorin R, Escovar la Riva P, Gabler F, Kirmayr M, Khamis T, Escobar S, Díaz A, Soto L: **Expression of PD-L1 in renal cancer, prognostic features and clinical utility of its routine staining.** *Actas Urol Esp (Engl Ed)* 2023, **47**(5):271-278.
217. Choueiri TK, Larkin J, Oya M, Thistlethwaite F, Martignoni M, Nathan P, Powles T, McDermott D, Robbins PB, Chism DD *et al*: **Preliminary results for avelumab plus axitinib as first-line therapy in patients with advanced clear-cell renal-cell carcinoma (JAVELIN Renal 100): an open-label, dose-finding and dose-expansion, phase 1b trial.** *Lancet Oncol* 2018, **19**(4):451-460.
218. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J: **Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma.** *J Clin Oncol* 1999, **17**(8):2530-2540.
219. Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Boumerhi G, Malhi S, Wood L, Elson P, Bukowski R: **Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma.** *J Clin Oncol* 2005, **23**(4):832-841.
220. Patil S, Figlin RA, Hutson TE, Michaelson MD, Négrier S, Kim ST, Huang X, Motzer RJ: **Prognostic factors for progression-free and overall survival with sunitinib targeted therapy and with cytokine as first-line therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma.** *Ann Oncol* 2011, **22**(2):295-300.
221. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, Eigel BJ, Ruether JD, Cheng T, North S *et al*: **Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(34):5794-5799.
222. Razafinjatovo C, Bihl S, Mischo A, Vogl U, Schmidinger M, Moch H, Schraml P: **Characterization of VHL missense mutations in sporadic clear cell renal cell carcinoma: hotspots, affected binding domains, functional impact on pVHL and therapeutic relevance.** *BMC Cancer* 2016, **16**:638.
223. Mlcochova H, Machackova T, Rabien A, Radova L, Fabian P, Iliev R, Slaba K, Poprach A, Kilic E, Stanik M *et al*: **Epithelial-mesenchymal transition-associated microRNA/mRNA signature is linked to metastasis and prognosis in clear-cell renal cell carcinoma.** *Sci Rep* 2016, **6**:31852.

224. Frew IJ, Moch H: **A clearer view of the molecular complexity of clear cell renal cell carcinoma.** *Annu Rev Pathol* 2015, **10**:263-289.
225. Melero I, Rouzaut A, Motz GT, Coukos G: **T-cell and NK-cell infiltration into solid tumors: a key limiting factor for efficacious cancer immunotherapy.** *Cancer Discov* 2014, **4**(5):522-526.
226. Büttner FA, Winter S, Stühler V, Rausch S, Hennenlotter J, Füssel S, Zastrow S, Meinhardt M, Toma M, Jerónimo C *et al*: **A novel molecular signature identifies mixed subtypes in renal cell carcinoma with poor prognosis and independent response to immunotherapy.** *Genome Med* 2022, **14**(1):105.
227. Huang Y, Chen X, Dikov MM, Novitskiy SV, Mosse CA, Yang L, Carbone DP: **Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF.** *Blood* 2007, **110**(2):624-631.
228. Alfaro C, Suarez N, Gonzalez A, Solano S, Erro L, Dubrot J, Palazon A, Hervas-Stubbs S, Gurrpide A, Lopez-Picazo JM *et al*: **Influence of bevacizumab, sunitinib and sorafenib as single agents or in combination on the inhibitory effects of VEGF on human dendritic cell differentiation from monocytes.** *Br J Cancer* 2009, **100**(7):1111-1119.
229. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP: **Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells.** *Nat Med* 1996, **2**(10):1096-1103.
230. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Krzysiek R, Knutson KL, Daniel B, Zimmermann MC *et al*: **Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity.** *Nat Med* 2003, **9**(5):562-567.
231. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisseleva E, Parman KS, Nadaf S, Carbone DP: **VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression.** *Blood* 2003, **101**(12):4878-4886.
232. Ruf M, Moch H, Schraml P: **PD-L1 expression is regulated by hypoxia inducible factor in clear cell renal cell carcinoma.** *Int J Cancer* 2016, **139**(2):396-403.
233. Adotevi O, Pere H, Ravel P, Haicheur N, Badoual C, Merillon N, Medioni J, Peyrard S, Roncelin S, Verkarre V *et al*: **A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients.** *J Immunother* 2010, **33**(9):991-998.
234. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van den Bossche J, Mack M, Pipeleers D, In't Veld P, De Baetselier P *et al*: **Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes.** *Cancer Res* 2010, **70**(14):5728-5739.
235. Huang Y, Goel S, Duda DG, Fukumura D, Jain RK: **Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy.** *Cancer Res* 2013, **73**(10):2943-2948.

236. Osada T, Chong G, Tansik R, Hong T, Spector N, Kumar R, Hurwitz HI, Dev I, Nixon AB, Lyerly HK *et al*: **The effect of anti-VEGF therapy on immature myeloid cell and dendritic cells in cancer patients.** *Cancer Immunol Immunother* 2008, **57**(8):1115-1124.
237. Kusmartsev S, Eruslanov E, Kübler H, Tseng T, Sakai Y, Su Z, Kaliberov S, Heiser A, Rosser C, Dahm P *et al*: **Oxidative stress regulates expression of VEGFR1 in myeloid cells: link to tumor-induced immune suppression in renal cell carcinoma.** *J Immunol* 2008, **181**(1):346-353.
238. Yasuda S, Sho M, Yamato I, Yoshiji H, Wakatsuki K, Nishiwada S, Yagita H, Nakajima Y: **Simultaneous blockade of programmed death 1 and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) induces synergistic anti-tumour effect in vivo.** *Clin Exp Immunol* 2013, **172**(3):500-506.
239. Tian L, Goldstein A, Wang H, Ching Lo H, Sun Kim I, Welte T, Sheng K, Dobrolecki LE, Zhang X, Putluri N *et al*: **Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming.** *Nature* 2017, **544**(7649):250-254.
240. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, Bronte V, Chouaib S: **PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation.** *J Exp Med* 2014, **211**(5):781-790.
241. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, Rusakiewicz S, Routy B, Roberti MP, Duong CP *et al*: **Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota.** *Science* 2015, **350**(6264):1079-1084.
242. Barsoum IB, Koti M, Siemens DR, Graham CH: **Mechanisms of hypoxia-mediated immune escape in cancer.** *Cancer Res* 2014, **74**(24):7185-7190.
243. Kumar V, Gabrilovich DI: **Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment.** *Immunology* 2014, **143**(4):512-519.
244. Noman MZ, Chouaib S: **Targeting hypoxia at the forefront of anticancer immune responses.** *Oncoimmunology* 2014, **3**(12):e954463.
245. Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, Graham CH: **A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells.** *Cancer Res* 2014, **74**(3):665-674.
246. Creighton CJ, Morgan M, Gunaratne PH, Wheeler DA, Gibbs RA, Gordon Robertson A, Chu A, Beroukhim R, Cibulskis K, Signoretti S *et al*: **Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma.** *Nature* 2013, **499**(7456):43-49.
247. Ghosh AP, Marshall CB, Coric T, Shim EH, Kirkman R, Ballestas ME, Ikura M, Bjornsti MA, Sudarshan S: **Point mutations of the mTOR-RHEB pathway in renal cell carcinoma.** *Oncotarget* 2015, **6**(20):17895-17910.
248. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K *et al*: **Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion.** *Nat Med* 2002, **8**(8):793-800.

249. Kaur S, Sassano A, Dolniak B, Joshi S, Majchrzak-Kita B, Baker DP, Hay N, Fish EN, Platanius LC: **Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(12):4808-4813.
250. Lastwika KJ, Wilson W, 3rd, Li QK, Norris J, Xu H, Ghazarian SR, Kitagawa H, Kawabata S, Taube JM, Yao S *et al*: **Control of PD-L1 Expression by Oncogenic Activation of the AKT-mTOR Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer.** *Cancer Res* 2016, **76**(2):227-238.
251. Bedke J, Albiges L, Capitanio U, Giles RH, Hora M, Lam TB, Ljungberg B, Marconi L, Klatte T, Volpe A *et al*: **Updated European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: Nivolumab plus Cabozantinib Joins Immune Checkpoint Inhibition Combination Therapies for Treatment-naïve Metastatic Clear-Cell Renal Cell Carcinoma.** *Eur Urol* 2021, **79**(3):339-342.
252. Albiges L, Tannir NM, Burotto M, McDermott D, Plimack ER, Barthélémy P, Porta C, Powles T, Donskov F, George S *et al*: **Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib for first-line treatment of advanced renal cell carcinoma: extended 4-year follow-up of the phase III CheckMate 214 trial.** *ESMO Open* 2020, **5**(6):e001079.
253. Cheng L, Wang Y, Qiu L, Chang Y, Lu H, Liu C, Zhang B, Zhou Y, Bai H, Xiong L *et al*: **mTOR pathway gene mutations predict response to immune checkpoint inhibitors in multiple cancers.** *Journal of Translational Medicine* 2022, **20**(1):247.
254. He Y, Wang X: **Identification of molecular features correlating with tumor immunity in gastric cancer by multi-omics data analysis.** *Ann Transl Med* 2020, **8**(17):1050.
255. Araki K, Youngblood B, Ahmed R: **The role of mTOR in memory CD8 T-cell differentiation.** *Immunol Rev* 2010, **235**(1):234-243.
256. Chi H: **Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions.** *Nature Reviews Immunology* 2012, **12**(5):325-338.
257. Li Q, Rao R, Vazzana J, Goedegebuure P, Odunsi K, Gillanders W, Shrikant PA: **Regulating mammalian target of rapamycin to tune vaccination-induced CD8(+) T cell responses for tumor immunity.** *J Immunol* 2012, **188**(7):3080-3087.
258. Pollizzi KN, Patel CH, Sun IH, Oh MH, Waickman AT, Wen J, Delgoffe GM, Powell JD: **mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8⁺ T cell differentiation.** *J Clin Invest* 2015, **125**(5):2090-2108.
259. Ilagan E, Manning BD: **Emerging role of mTOR in the response to cancer therapeutics.** *Trends Cancer* 2016, **2**(5):241-251.
260. Saxton RA, Sabatini DM: **mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease.** *Cell* 2017, **168**(6):960-976.
261. Ben-Sahra I, Manning BD: **mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth.** *Curr Opin Cell Biol* 2017, **45**:72-82.
262. Wang C, Yi T, Qin L, Maldonado RA, von Andrian UH, Kulkarni S, Tellides G, Pober JS: **Rapamycin-treated human endothelial cells preferentially activate allogeneic regulatory T cells.** *J Clin Invest* 2013, **123**(4):1677-1693.

263. Hirayama Y, Gi M, Yamano S, Tachibana H, Okuno T, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H: **Anti-PD-L1 treatment enhances antitumor effect of everolimus in a mouse model of renal cell carcinoma.** *Cancer Sci* 2016, **107**(12):1736-1744.
264. Moore EC, Cash HA, Caruso AM, Uppaluri R, Hodge JW, Van Waes C, Allen CT: **Enhanced Tumor Control with Combination mTOR and PD-L1 Inhibition in Syngeneic Oral Cavity Cancers.** *Cancer Immunol Res* 2016, **4**(7):611-620.
265. Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquinta PJ, Karthaus WR, Gopalan A, Dowling C, Wanjala JN, Undvall EA, Arora VK *et al*: **Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer.** *Cell* 2014, **159**(1):176-187.
266. van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, van Houdt W, van Gorp J, Taylor-Weiner A, Kester L *et al*: **Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients.** *Cell* 2015, **161**(4):933-945.
267. Grassi L, Alfonsi R, Francescangeli F, Signore M, De Angelis ML, Addario A, Costantini M, Flex E, Ciolfi A, Pizzi S *et al*: **Organoids as a new model for improving regenerative medicine and cancer personalized therapy in renal diseases.** *Cell Death Dis* 2019, **10**(3):201.
268. Batchelder CA, Martinez ML, Duru N, Meyers FJ, Tarantal AF: **Three Dimensional Culture of Human Renal Cell Carcinoma Organoids.** *PLoS One* 2015, **10**(8):e0136758.
269. Li Z, Xu H, Yu L, Wang J, Meng Q, Mei H, Cai Z, Chen W, Huang W: **Patient-derived renal cell carcinoma organoids for personalized cancer therapy.** *Clin Transl Med* 2022, **12**(7):e970.
270. Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, Lampis A, Eason K, Huntingford I, Burke R *et al*: **Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers.** *Science* 2018, **359**(6378):920-926.
271. Yao Y, Xu X, Yang L, Zhu J, Wan J, Shen L, Xia F, Fu G, Deng Y, Pan M *et al*: **Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer.** *Cell Stem Cell* 2020, **26**(1):17-26.e16.
272. Braun DA, Street K, Burke KP, Cookmeyer DL, Denize T, Pedersen CB, Gohil SH, Schindler N, Pomerance L, Hirsch L *et al*: **Progressive immune dysfunction with advancing disease stage in renal cell carcinoma.** *Cancer Cell* 2021, **39**(5):632-648.e638.
273. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N *et al*: **Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial.** *Lancet* 2008, **372**(9637):449-456.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Tübingen unter Betreuung von Professor Dr. med. Jens Bedke durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Professor Dr. med. Matthias Schwab, Leiter des Dr. Margarete Fischer-Bosch Instituts für klinische Pharmakologie, Stuttgart und der Abteilung für Klinische Pharmakologie, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum, Tübingen, Frau Dr. rer. nat. Elke Schaeffeler, Leiterin der Core-Facility Molekulare Analytik bzw. der Arbeitsgruppe „Integrative Omics Analyses & Cancer Therapy“ am Dr. Margarete Fischer-Bosch Instituts für klinische Pharmakologie (IKP), Stuttgart und Dr. med. Viktoria Stühler, Fachärztin für Urologie am Universitätsklinikum Tübingen.

Die Methoden unter 2.1 und 2.2 wurden teilweise nach Unterweisung durch das Pathologische Institut des UKT oder Dr. Stühler von mir selbstständig durchgeführt.

Die Versuche unter 2.3 bis 2.8 wurden nach Einarbeitung durch Thomas Hees, einem labortechnischen Assistenten von mir eigenständig unter seiner Aufsicht durchgeführt. Die verwendeten molekularen Daten für Methode 2.6 stammen aus einer zuvor durchgeführten Doktorarbeit von Sauter-Meyerhoff *et al.* [192] und wurden für die durchgeführten Analysen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Der Versuch unter 2.9 wurde von mir durch Unterstützung von Dr. Stühler durchgeführt.

Die Teilversuche unter 2.10.1 und 2.10.2 wurden von mir in Zusammenarbeit mit Lena-Sophie Menig-Benzig, Master of Science, seinerzeit Doktorandin, durchgeführt und von ihr beaufsichtigt.

Methode 2.10.3 wurde durch Thomas Hees und Methode 2.10.4 wurde durch Lena-Sophie Menig-Benzig durchgeführt. Die benötigten Ergebnisse wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die statistische Auswertung unter 2.11 erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Winter, Biosstatistiker und wissenschaftlicher Mitarbeiter am IKP.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Lisa Herrmann

8 Veröffentlichungen

Daten aus der Dissertationsschrift wurden für folgende Publikationen verwendet:

Analyse von immunologischen Markern im Primärtumor und korrespondierenden Metastasengewebe von Patienten mit einem metastasierten Nierenzellkarzinom

L. Herrmann*, V. Stühler*, S. Winter, A. Reustle, J. Hennenlotter, S. Rausch, A. Stenzl, J. Bedke, M. Schwab, E. Schaeffeler

**geteilte Autorenschaft*

Abstract und Kurzvortrag präsentiert am 73. DGU-Kongress im September 2021 in Stuttgart.

Characterization of Genetic Heterogeneity in Recurrent Metastases of Renal Cell Carcinoma.

Sauter-Meyerhoff C, Bohnert R, Mazzola P, Stühler V, Kandabarau S, Büttner FA, Winter S, Herrmann L, Rausch S, Hennenlotter J, Fend F, Scharpf M, Stenzl A, Ossowski S, Bedke J, Schwab M, Schaeffeler E. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 10;13(24):6221. doi: 10.3390/cancers13246221. PMID: 34944839

Prognostic impact of complete metastasectomy in metastatic renal cell carcinoma in the era of immuno-oncology-based combination therapies.

Stühler V, Herrmann L, Maas M, Walz S, Rausch S, Stenzl A, Bedke J. *World J Urol*. 2022 May;40(5):1175-1183. doi: 10.1007/s00345-022-03960-1. Epub 2022 Feb 26. PMID: 35217885 Free PMC article.

Zusätzlich präsentiert als Abstract am 73. DGU-Kongress im September 2021 in Stuttgart.

Role of the Systemic Immune-Inflammation Index in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with First-Line Ipilimumab plus Nivolumab.

Stühler V, Herrmann L, Rausch S, Stenzl A, Bedke J. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 16;14(12):2972. doi: 10.3390/cancers14122972. PMID: 35740636

Real world data on IO-based therapy for metastatic renal cell carcinoma.

Stühler V, Herrmann L, Rausch S, Stenzl A, Bedke J. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023 Jul;149(7):3249-3258. doi: 10.1007/s00432-022-04173-0. Epub 2022 Jul 30. PMID: 35907009 Free PMC article.

Immunological markers and somatic mutations as predictors for therapy selection in metastatic renal cell carcinoma?

L. Herrmann*, V. Stühler*, S. Winter, A. Reustle, J. Hennenlotter, S. Rausch, A. Stenzl, J. Bedke, M. Schwab, E. Schaeffeler

**Shared authorship, supported by Robert Bosch Stiftung, Stuttgart, Germany.
Abstract präsentiert am 37. EAU-Kongress im Juli 2022 in Amsterdam.*

Untersuchung der Assoziation der PD-L1 Proteinexpression mit somatischen Mutationen in Metastasen des Nierenzellkarzinoms mit möglichen Konsequenzen für die Systemtherapie

V. Stühler, L. Herrmann, S. Winter, A. Reustle, J. Hennenlotter, S. Rausch, A. Stenzl, I. Tsauro, J. Bedke, M. Schwab, E. Schaeffeler

Abstract präsentiert am 64. SWDGU-Kongress im Juni 2024 in Freiburg im Breisgau.

9 Danksagung

Einleitend möchte ich mich bei Prof. Dr. med. A. Stenzl, ehemals ärztlicher Direktor der Klinik für Urologie am UKT, welcher meine Dissertation über diese aktuell forschungsrelevante Thematik ermöglicht hat, bedanken.

In diesem Zuge gilt mein Dank auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. I. Tsaur, ärztlicher Direktor der Klinik für Urologie am UKT, unter dessen Klinikleitung ich die Dissertation abschließen konnte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. J. Bedke für die Ideenfindung und Überlassung des Themas, sowie der stetigen Anregung einen aktiven Beitrag im Zuge des Forschungsprozesses zu leisten. Für Ihre professionelle Unterstützung und Förderung, einhergehend mit dem Erhalt eines Promotionsstipendiums und der Teilnahme an zwei lehrreichen Kongressen, möchte ich ebenfalls meinen Dank ausdrücken.

Überdies möchte ich Frau Dr. V. Stühler herzlich danken, die mich während der gesamten Durchführung und Erstellung der Dissertation mit produktiven Gesprächen, Anregungen und lieben Worten enorm unterstützt hat und so maßgeblich zu deren Gelingen beigetragen hat. Ihr vorbildhafter Werdegang hat mich stets ermutigt und sehr geprägt.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Schwab für die freundliche Aufnahme an seinem Forschungsinstitut bedanken. Mein Aufenthalt dort hat mir viele spannende neue Einblicke gewährt und mein Interesse an experimenteller Forschung bestärkt.

Frau Dr. E. Schaeffeler möchte ich für die Aufnahme in ihrer Forschungsgruppe, die produktive Zusammenarbeit und fortwährende Unterstützung bei der praktischen Umsetzung meiner Dissertation danken.

Herrn T. Hees danke ich insbesondere für seine Unterstützung bei der Durchführung, seine angenehme und hilfsbereite Art bei meinen ersten Schritten in einem Forschungslabor und sein Dazutun bei der bestmöglichen Umsetzung der Projektidee. Für die Überlassung der Ergebnisse der von ihm durchgeführten Versuche möchte ich meinen Dank bekunden.

Frau L. Menig-Benzig danke ich für die geduldigen Erklärungen in allen Belangen, sowie die Begleitung einiger meiner Versuche und die Überlassung der Daten von den von ihr durchgeführten Versuchen.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. S. Winter, für die großartige Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Frau Dr. C. Sauter-Meyerhoff danke ich nochmals für die freundliche Überlassung der molekularen Daten, die einen spannenden und gewinnbringenden Aspekt in meine Arbeit eingebracht haben.

Nicht zu vergessen sind alle weiteren beteiligten Mitarbeiter des UKT und des IKP, die mich während der gesamten Erstellung der Dissertation durch ihr aktives Zutun begleitet haben.

Michael und meinen Freunden danke ich für die stetigen Ermutigungen während des Studiums und der Fertigstellung der Dissertation.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und meinen Großeltern, danke ich aus tiefstem Herzen für die Ermöglichung des Humanmedizinstudiums. Ich danke euch für eure immerwährende, treue Unterstützung und eure motivierenden Zusprüche.

