

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Institut für Pathologie**

**Direktor: Professor Dr. med Guido Sauter**

**PRÄVALENZ UND KLINISCHE RELEVANZ DES  
CHROMOSOM Y-VERLUSTES BEIM  
NIERENZELLKARZINOM**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der  
Universität Hamburg

vorgelegt von:

Seyedehmina Garmestani

Aus Sari, Iran

Hamburg, 2019

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.07.2020**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Michael Rink**

## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>1. Einleitung</b> .....	5
<b>1.1. Das Nierenzellkarzinom</b> .....	5
<b>1.2. Histologische Subtypen des Nierenzellkarzinoms</b> .....	6
<b>1.2.1. Klarzelliges Nierenzellkarzinom</b> .....	6
<b>1.2.2. Papilläres Nierenzellkarzinom</b> .....	7
<b>1.2.3. Onkozytom</b> .....	8
<b>1.2.4. Chromophobes Nierenzellkarzinom</b> .....	9
<b>1.2.5. Klarzellig-(tubulo)papilläres Nierenzellkarzinom</b> .....	10
<b>1.3. Genetische Veränderungen der häufigsten Subtypen der Nierenzellkarzinome</b> <b>11</b>	
<b>1.4. Verlust des Chromosoms Y bei Tumoren</b> .....	12
<b>1.5. Zielsetzung der Arbeit</b> .....	13
<b>2. Material und Methodik</b> .....	14
<b>2.1. Patientenkollektiv / Gewebemikroarray</b> .....	14
<b>2.2. Reagenzien und Kits</b> .....	16
<b>2.3. Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung (FISH)</b> .....	17
<b>2.4. Mikroskopische Auswertung</b> .....	18
<b>2.5. Statistische Auswertung</b> .....	18
<b>3. Ergebnisse</b> .....	19
<b>3.1. Auswertbarkeit der Chromosom Y in FISH-Analyse</b> .....	19
<b>3.2. Y-Verlust und histologische Typen des Nierenzellkarzinoms</b> .....	19
<b>3.3. Y-Verlust und Tumor-Phänotyp in klarzelligen und papillären Nierenzellkarzinome</b> .....	20
<b>3.4. Y-Verlust und Tumorgröße</b> .....	22
<b>3.5. Y-Verlust und Patientenalter</b> .....	23
<b>3.6. Y-Verlust und Prognose</b> .....	24
<b>3.6.1. Y-Verlust und die Prognose in allen Nierenzellkarzinomen</b> .....	24
<b>3.6.2. Y-Verlust und die Prognose der Patienten in den klarzelligen Nierenzellkarzinomen</b> .....	25
<b>3.6.3. Y-Verlust und Prognose in papillären Nierenzellkarzinomen</b> .....	26
<b>4. Diskussion</b> .....	27
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	30
<b>6. Abstract</b> .....	31
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	32
<b>9. Abbildungsverzeichnis</b> .....	37

<b>10. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>37</b>
<b>11. Lebenslauf.....</b>	<b>38</b>
<b>12. Danksagung .....</b>	<b>39</b>
<b>13. Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>40</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Nierenzellkarzinom

Jährlich erkranken weltweit ca. 214.000 Männer und 124.000 Frauen an einem Nierenkarzinom (RCC)<sup>1</sup>. Das Nierenkarzinom umfasst damit ca. 5% bzw. 3% aller bösartigen Tumorerkrankungen und ist somit die 7. bzw. 10. häufigste Karzinomerkrankung bei Männern und Frauen<sup>2,3</sup>. Laut „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) der WHO starben etwa 91.000 Männer im Jahr 2012 an einem Nierenkarzinom<sup>1,4</sup>. Somit ist das Nierenkarzinom weltweit auf Platz 9 der tumor-assoziierten Todesursachen bei Männern<sup>4</sup>. Der Begriff Nierenkarzinom umfasst eine Reihe von unterschiedlichen Tumortypen, wie die Nierenparenchymtumoren und das Urothelkarzinom des Nierenbeckens<sup>2</sup>. Das Nierenzellkarzinom macht ca. 80% aller Nierentumoren aus<sup>2</sup>. Risikofaktoren, die zur Entstehung eines Nierenzellkarzinoms beitragen sind zum Beispiel Tabakkonsum<sup>5-7</sup>, Adipositas<sup>6,8,9</sup>, Hypertonus und terminale Niereninsuffizienz<sup>2,6</sup>. Des Weiteren erkranken Männer zweimal häufiger als Frauen und der Häufigkeitsgipfel ist zwischen der 6. und 7. Lebensdekade zu beobachten.

In den frühen Stadien präsentieren die Nierenzellkarzinome oft keine Symptome. Je nach Größenwachstum des Tumors und Befall des Nierenbeckens können jedoch Beschwerden wie Hämaturie, Druckschmerzen im Flankenbereich und Pyelonephritis auftreten<sup>10,11</sup>. Systemische Symptome, wie zum Beispiel Hyperkalzämie bei paraneoplastischer Sekretion des Parathyroid-hormon-related-Proteins (PTHrP) treten oft erst bei metastasierenden Tumoren oder paraneoplastischen Ereignissen auf<sup>10</sup>. Häufig werden die Tumoren als Zufallsbefund während der Abdomensonographie oder durch andere bildgebende Verfahren wie Computertomographie oder Magnettomographie diagnostiziert<sup>10</sup>.

Für das lokale Staging und zur Resektionsplanung wird in den Leitlinien für Onkologie eine Computertomographie von der Leberkuppe bis zur Symphyse sowie der früharteriellen (Nieren bis Beckeneingang) und venösen Phase nach einheitlichen Standards empfohlen<sup>12</sup>. Die kurative Therapie des Nierenzellkarzinoms besteht primär aus der offen oder minimal-invasiv chirurgischen Resektion des Tumors. Lokal begrenzte Tumoren in der klinischen Kategorie T1 sollen nierenerhaltend operiert werden, dabei stellt die offene Nierenteilresektion den Standard bei der organerhaltenden Operation dar (Evidenzgrad 4), jedoch kann bei Patienten mit hoher Komorbidität und/oder begrenzter Lebenserwartung der kleine Nierentumor überwacht werden<sup>12</sup>. Für die Patienten, die ein rezidivierendes metastasiertes Nierenzellkarzinom aufweisen oder bei denen keine chirurgischen Optionen in Frage kommen, sollte eine systemische Therapie in Betracht gezogen werden. Derzeit existieren mehrere aktive Mittel zur Behandlung von metastasierten Nierenzellkarzinomen, deren allgemeine Unfähigkeit, dauerhaftes vollständiges Ansprechen zu erzeugen, bei den meisten Patienten eine chronische Langzeitbehandlung erfordert, und daher müssen die Vorteile gegenüber der Gesamtbelastung der Behandlung abgewogen werden; in Betracht zu ziehen sind akute und chronische Toxizität, Zeit und Kosten<sup>10</sup>. Nach Leitlinienprogramm der

Onkologie sollen die Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem klarzelligem Nierenzellkarzinom und niedrigem oder intermediärem Risikoprofil bezogen auf das Patientenalter und das Vorliegen von Komorbiditäten als Erstlinientherapie mit einer systemischen Kombinationstherapie bandelt werden <sup>12</sup>. Zum Beispiel sollen bei Patienten mit fortgeschrittenem und/oder metastasiertem klarzelligem Nierenzellkarzinom und niedrigem oder intermediärem Risiko in der Erstlinientherapie Sunitinib, Pazopanib oder Bevacizumab und INF verwendet werden und bei Patienten mit fortgeschrittenem und/oder metastasiertem klarzelligem Nierenzellkarzinom und ungünstigem Risikoprofil soll in der Erstlinientherapie Temsirolimus verwendet werden. <sup>12</sup> Eine Zytoreduktive Nephrektomie kann bei metastasierten Tumoren vor einer systemischen Therapie vorgenommen werden <sup>10,13</sup>.

Generell werden die Nierenzelltumoren in 16 Subtypen unterteilt, die sich in ihren klinischen, pathologischen, molekularen und genetischen Eigenschaften sowie in der Prognose und der Therapie der Krankheit unterscheiden. Dies macht deutlich, dass die exakte Klassifizierung der Tumoren von erheblicher Bedeutung ist <sup>14,15</sup>. Im Folgenden werden die 5 häufigsten Subtypen bezüglich ihrer histologischen und genetischen Eigenschaften kurz zusammengefasst.

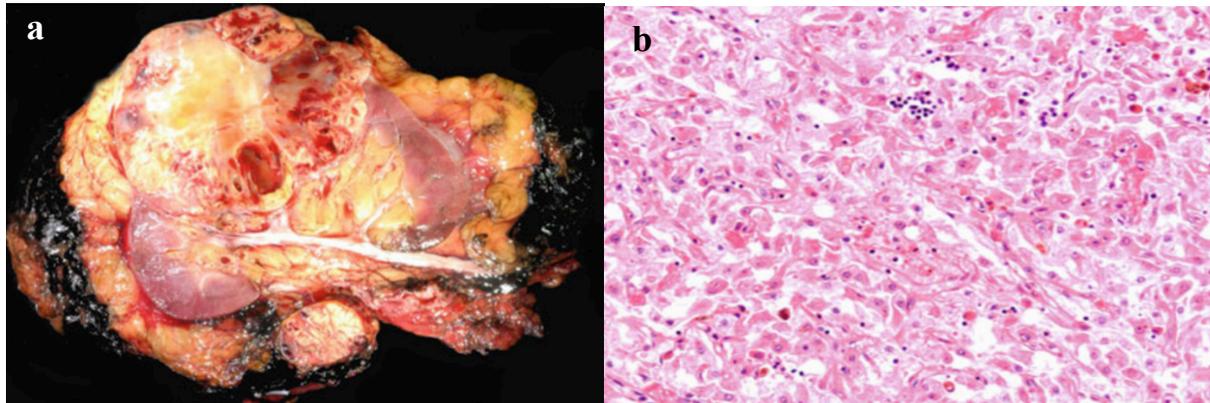
## **1.2. Histologische Subtypen des Nierenzellkarzinoms**

### **1.2.1. Klarzelliges Nierenzellkarzinom**

Das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC) ist mit etwa 60-70% der Fälle der häufigste Subtyp der Nierenzellkarzinome <sup>14</sup>. Dabei sind 2-4% der Fälle durch erbliche Tumorerkrankungen wie das Von-Hippel-Lindau Syndrom (VHL-Syndrom) und das Birt-Hogg-Dube Syndrom (BHD-Syndrom) verursacht <sup>14,16</sup>. Im Vergleich zu den anderen histopathologischen Subtypen scheint das klarzellige Nierenzellkarzinom eine schlechtere Prognose und 5-Jahre-Überlebensrate aufzuweisen <sup>17-19</sup>. Etwa 50% der klarzelligen Nierenzellkarzinomen sind in TNM-Stadium 1 und 2 und weniger als 5% in TNM-Stadium 4. Die Invasion des Tumors in perirenales Fett und /oder Vertiefung des Tumors in die Nierenvenen tritt in etwa 45% der Fälle auf <sup>20</sup>.

Das klarzellige Nierenzellkarzinom präsentiert sich makroskopisch häufig als einseitiger, unizentrischer, runder und gut abgrenzbarer Tumor mit einer fibrösen Kapsel. Die Schnittfläche ist gelb-gold und weist häufig Einblutungen, Nekrosen und zystischen Veränderungen auf <sup>14</sup>. Multizentrische oder bilaterale Tumoren kommen in weniger als 5% der Fälle vor <sup>18</sup>. Histopathologisch zeigen die Tumoren diverse Muster auf. Die häufigsten sind jedoch solide, alveoläre und azinäre Strukturen. Die Strukturen sind durch dünnwandige Blutgefäße getrennt <sup>14,15</sup>. Aufgrund des Verlustes von zytoplasmatischen Lipiden und Glykogen während der Vorbehandlung des Gewebes, weisen die Zellen in der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung ein klares Zytoplasma mit einer deutlich erscheinenden Zellmembran auf <sup>14,15</sup>(Abb.1).

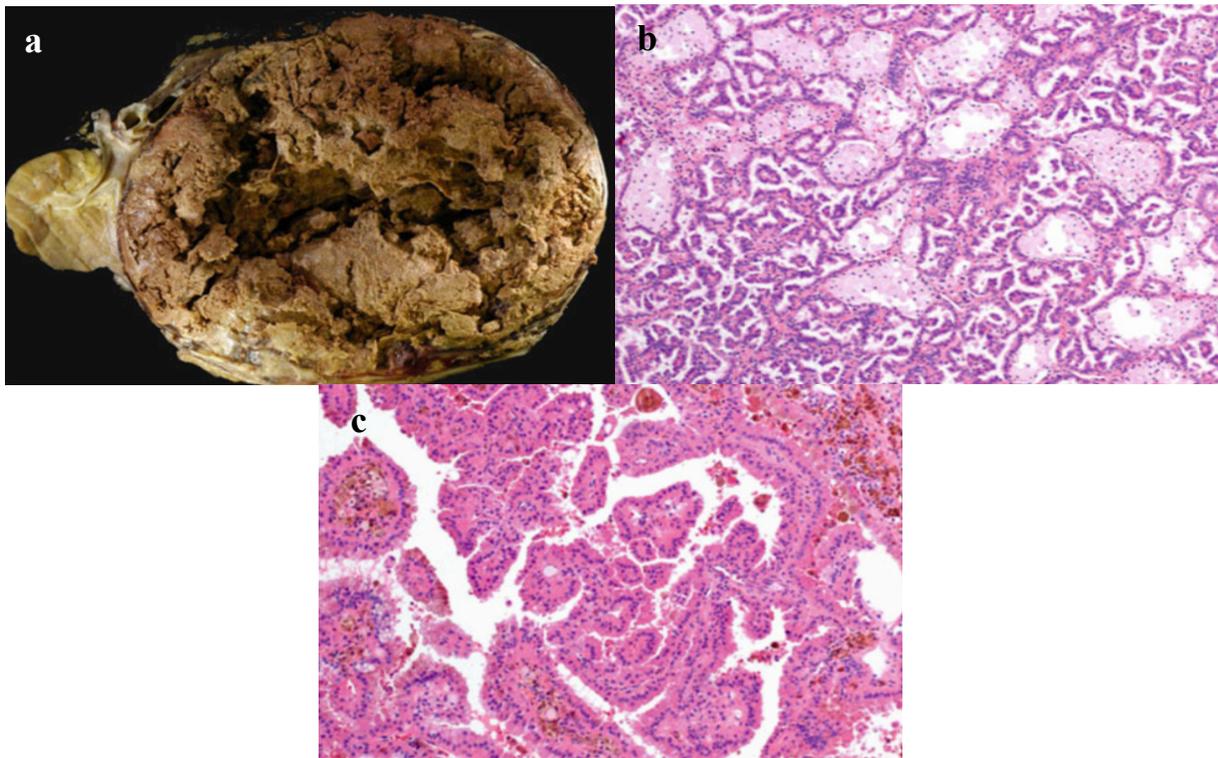
**Abbildung 1: Klarzelliges Nierenzellkarzinom, a) Makroskopische Ansicht, b) Mikroskopische Ansicht <sup>14</sup>.**



### **1.2.2. Papilläres Nierenzellkarzinom**

Das papilläre Nierenzellkarzinom (pRCC) ist der 2. häufigste Subtyp und macht etwa 10-15% aller Nierenzellkarzinome aus <sup>14</sup>. Diese Erkrankung hat eine gute Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von beinahe 90% <sup>18</sup>. Makroskopisch stellt sich der Tumor in der Regel als gut umschriebene Masse dar, die von einer Pseudokapsel umschlossen ist <sup>14,15</sup>. Histopathologisch besteht der Tumor aus Papillen, Tubulopapillen und Tubuli, die gelegentlich dicht gepackt sind und dem Tumor ein festes Aussehen verleihen <sup>14</sup>. Es wurden 2 verschiedene histopathologische Subtypen für papillären Nierenzellkarzinomen beschrieben, die sich in Zellen, die die Papillen und Tubuli auskleiden unterscheiden <sup>10,14,15,21</sup>. Typ 1 Tumoren bestehen aus Papillen und Tubuli, die von kleinen Zellen mit hellem Zytoplasma ausgekleidet sind. Die Zellen sind durch kleine ovale Kerne mit unauffälligen Nukleolen charakterisiert. Häufig kommen glomeruloide Papillen, ödematöse Papillen, Schaumzellen in Papillarkernen und Psammomkörperchen in diesem Subtyp vor <sup>10,14,15,21</sup>. In Typ 2 Karzinomen sind die Papillen von Zellen mit reichlich eosinophilem Zytoplasma und großen pseudostratifizierten Kernen und prominenten Nukleolen ausgekleidet <sup>10,14,15,21</sup>. Typ 2 Tumoren sind in der Regel größer als Typ 1 Karzinome, kommen häufiger bei jüngeren Patienten vor (< 40 Jahre) und sind häufig Stadium 3 oder 4 Tumoren <sup>21</sup> (Abb. 2).

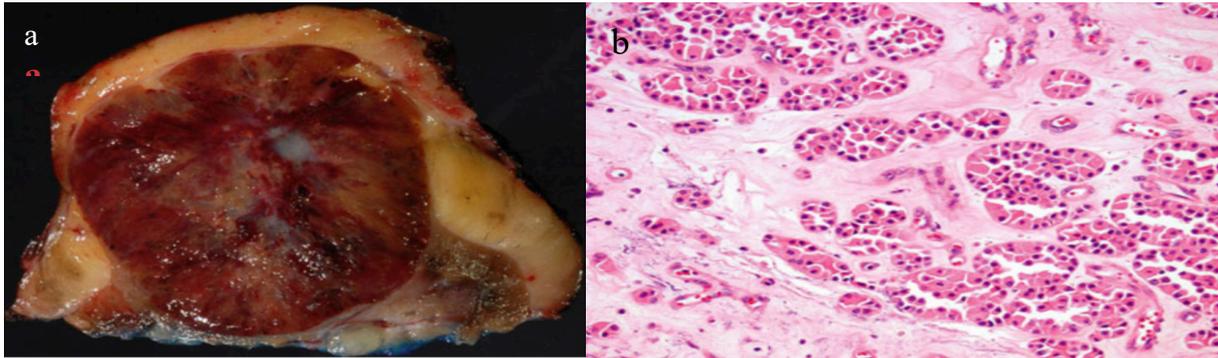
**Abbildung 2: Papilläres Nierenzellkarzinom, a) Makroskopische Ansicht, b) Mikroskopischer Ansicht (Typ 1), c) Mikroskopische Ansicht (Typ 2) <sup>14</sup>.**



### **1.2.3. Onkozytom**

Onkozytome sind benigne epitheliale Neoplasien der Niere, die etwa 5% aller Neoplasien der Nieren-Tubulusepithelien ausmachen <sup>14,15</sup>. Die meisten Tumoren sind symptomlos und werden zufällig entdeckt <sup>22-24</sup>. Makroskopisch sind die Tumoren typischerweise solitär und bekapselt. Die Schnittfläche weist eine charakteristische mahagonibraune Farbe auf und abhängig von der Tumorgroße ist eine zentrale Narbe im Tumor zu finden <sup>14,15,22</sup>. Histopathologisch ist das Onkozytom durch helle eosinophile Zellen charakterisiert, die als Onkozyten bezeichnet werden. Charakteristisch sind außerdem solide und kompakte Netze, Azini, Tubuli oder Mikrozysten. Oft ist ein hypozelluläres hyalinisiertes Stroma und eine Ausdehnung des Onkozytoms in das perinephritische Fettgewebe und seltener in den vaskulären Bereich zu finden <sup>14,15,22</sup> (Abb.3).

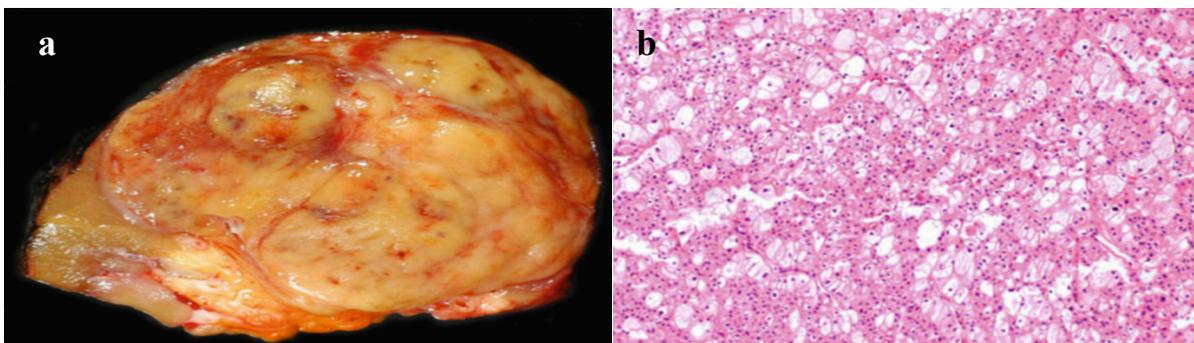
**Abbildung 3: Onkozytom, a) Makroskopische Ansicht , b) Mikroskopische Ansicht <sup>14</sup>.**



#### **1.2.4. Chromophobes Nierenzellkarzinom**

Das chromophobe Nierenzellkarzinom (chRCC) macht circa 5% der Nierenzellkarzinome aus <sup>14,15,25,26</sup>. Die Mortalität ist weniger als 10% <sup>14,27</sup>. Makroskopisch handelt es sich typischerweise um einen isolierten, gut umschriebenen, nicht-eingekapselten und gelegentlich leicht lobulierten Tumor mit homogener hellbrauner und fester Schnittfläche. Blutungen und Nekrosen treten selten auf und in großen Tumoren kann eine zentrale sternförmige Narbe zu finden sein <sup>14,27</sup>. Zumeist ist das mikroskopische Gewebemuster fest, zum Teil grandulär, mit fokalen Verkalkungen und breiten fibrotischen Septen <sup>15</sup>. Im Vergleich zum klarzelligen Subtyp sind die Blutgefäße dickwandig und nach außen hyalinisiert. Die perivaskulären Zellen sind oft vergrößert. In einigen Tumoren sind tubulozystische Bereiche zu finden <sup>15</sup>. Charakteristisch sind außerdem große polygonale Zellen mit einem transparenten, leicht netzartigem, Zytoplasma und einer prominenten Zellmembran <sup>15</sup>(Abb.4).

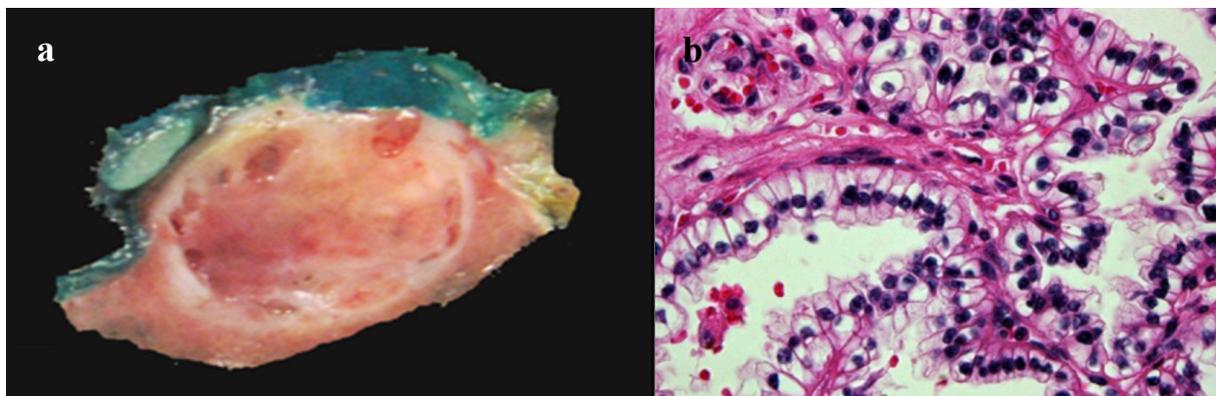
**Abbildung 4: Chromophobes Nierenzellkarzinom, a) Makroskopische Ansicht, b) Mikroskopische Ansicht <sup>14</sup>.**



### **1.2.5. Klarzellig-(tubulo)papilläres Nierenzellkarzinom**

Das klarzellig-(tubulo)papilläre Nierenzellkarzinom (cctpRCC) ist ein erst kürzlich beschriebener, low-grade Subtyp der Nierenzellkarzinome, der circa 4% dieser Tumorentität ausmacht<sup>28,29</sup>. Das cctpRCC umfasst etwa 9,3% aller Nierentumoren bei jungen Erwachsenen<sup>30</sup>. Die Prognose dieser Erkrankung wurde bislang in verschiedenen Studien als sehr günstig geschätzt<sup>31,32</sup>. Makroskopisch handelt es sich um einen stark zystischen und gut umschriebenen Tumor, der im Mittel eine Tumorgroße von circa 2,4 cm hat<sup>31,33</sup>. Die wichtigsten histopathologischen Merkmale sind eine dicke Kapsel, eine Papillararchitektur, verzweigte Tubuli und Azini sowie oftmals komplexe klare Zellbänder mit low-grade Zellkernen<sup>31,33</sup>(Abb.5).

**Abbildung 5: Klarzellig-(tubulo)papilläres Nierenzellkarzinom, a) Mikroskopische Ansicht<sup>34</sup>, b) Mikroskopische Ansicht<sup>31</sup>.**



### 1.3. Genetische Veränderungen der häufigsten Subtypen der Nierenzellkarzinome

Für jeden Subtyp des Nierenzellkarzinoms sind eigene charakteristische genomische Veränderung beschrieben. Die klarzellige Nierenzellkarzinome sind zum Beispiel durch eine Deletion von Gensequenzen am kurzen Arm des Chromosoms 3 (3p) gekennzeichnet<sup>35,36</sup>. Dagegen weisen die papillären Nierenzellkarzinomen sehr selten 3p-Deletion auf und sind typischerweise durch eine Kopiezahlerhöhung (Trisomie/ Tetrasomie) der Chromosomen 7 und 17 sowie durch den Verlust des Chromosoms Y charakterisiert<sup>35-39</sup>. Die charakteristischen genetischen Veränderungen der klarzelligen und papillären Nierenzellkarzinome wurden jedoch wiederum in klarzellig-(tubulo)papilläre Tumoren nicht beobachtet<sup>33</sup>. Chromophobe Nierenzellkarzinome weisen ein größeres Spektrum an Kopienzahlveränderungen wie Deletionen auf den Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21 auf<sup>39,40</sup>. Die meisten Onkozytome bestehen aus einer gemischten Population von Zellen mit normalen und abnormalen Karyotypen<sup>41</sup>. Ein kombinierter Verlust der Chromosomen 1 und X/Y ist die häufigste Chromosomenanomalie in Onkozytomen<sup>14</sup>. Desweiteren sind für alle obengenannten Subtypen andere vereinzelt vorkommende genetische Veränderungen beschrieben. Alle bisher beschriebenen genetischen Veränderungen sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Genetische Veränderungen in Nierenzellkarzinomen**<sup>14,38,42-54</sup>.

<u>Subtyp</u>	<u>Deletion</u>	<u>Gain</u>	<u>Amplifikation</u>	<u>Translokation</u>	<u>Punktmutation</u>
<b>Klarzelliges Nierenzellkarzinom</b>	<u>1p, 3p</u> <u>4q, 6q, 8p, 9p</u> <u>9q, 10q, 13q,</u> <u>14q, 16, 17p,</u> <u>20, Y</u>	<u>5q, 7, 8,</u> <u>13q, 16</u>	<u>1q, 2q, 5q, 7q,</u> <u>8q, 12p, 20q</u>	<u>t(3;6)</u>	<u>3p (VHL)</u>
<b>Chromophobes Nierenzellkarzinom</b>	<u>1, 2, 6, 10, 13,</u> <u>17, 21, Y</u>				<u>17p11.2 (BHD)</u>
<b>Papilläres Nierenzellkarzinom</b>	<u>9p, Y</u>	<u>6, 7, 12,</u> <u>16, 17,</u> <u>20</u>			
<b>Klarzellig-(tubulo)papilläre Nierenzellkarzinom</b>	<u>begrenzte Daten, zeigt keine für klarzelliges Nierenzellkarzinom und papilläres Nierenzellkarzinom charakteristische Veränderung</u>				
<b><u>Onkozytom</u></b>	<u>1, 14, 21, X,</u> <u>Y</u>	<u>12</u>		<u>t(1;12)(p36;q1</u> <u>3)</u>	

## **1.4. Verlust des Chromosoms Y bei Tumoren**

Zahlreiche Studien haben sich bereits mit dem Verlust des Chromosom Y in unterschiedlichen Tumorentitäten befasst. So wurde ein Chromosom Y-Verlust in individuellen Studien zum Beispiel in 62% der Plattenepithelkarzinome des Ösophagus <sup>55</sup>, in 60% der Adenokarzinome des Magens <sup>56</sup>, in 36% der Pankreaskarzinome <sup>57</sup> und in 34% der Blasenkarzinome <sup>58</sup> beschrieben. Die Vergleichbarkeit dieser Studien ist allerdings eingeschränkt, da sehr unterschiedliche Methoden wie die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) <sup>59</sup> und Comparative Genomic Hybridization (CGH) <sup>56,60</sup> zur Detektion des Chromosoms Y verwendet wurden. Das tumorogene Potential der Y-Deletion ist bis heute unklar und wird immer wieder in Frage gestellt. Zum Beispiel in einer Studie von Minner et al., in der die Y-Verlust-Rate in verschiedenen Urothelkarzinomen der Blase untersucht wurde, wurde keinen Zusammenhang zwischen einem Y-Verlust und dem Phänotyp der Tumoren nachgewiesen <sup>61</sup>.

Beim Nierenzellkarzinom existieren bisher nur wenige Studien, die sich mit dem Verlust des Chromosoms Y befassen. Es wurde Beispielsweise beschrieben, dass eine Abhängigkeit der Y-Verlust-Rate von den verschiedenen Subtypen des Nierenzellkarzinoms bestehe. Zu dieser Annahme passen aus verschiedenen Studien zusammengebrachte Daten, welche ein Y-Verlust in 48% der klarzelligen Nierenzellkarzinome <sup>62</sup>, 92% der papillären Nierenzellkarzinome (n=25) <sup>63</sup>, 46% der chromophoben Nierenzellkarzinome (n=13) <sup>64</sup> und 45% der Onkozytome (n=9) <sup>65</sup> zeigen. Die klinische Relevanz des Y-Verlustes in Bezug auf die Prognose des Patienten und den Tumorphänotyp ist allerdings bisher noch unklar.

## **1.5. Zielsetzung der Arbeit**

Der Begriff Nierenzellkarzinom umfasst 16 Subtypen, die sich bezüglich der Pathologie, des klinischen Verhaltens sowie der molekularen und genetischen Eigenschaften unterscheiden dürften. Die Typisierung der Nierenzelltumoren erfolgt in der Regel anhand histomorphologischer Eigenschaften. Dies ist jedoch bei einigen morphologischen Subtypen schwierig. Die Bestimmung der exakten Diagnose bzw. des Subtypes ist allerdings von Bedeutung, um unter anderem die geeignete Therapie auszuwählen. Es ist daher wünschenswert, den einzelnen Tumorsubtypen charakteristische histologische, molekulare und genetische Merkmale zuzuweisen, welche in der Diagnostik zur sicheren Festlegung des Subtypes beitragen können.

Genetische Veränderungen sind ein Kennzeichen vieler Karzinomarten. Zu den häufigsten chromosomalen Veränderungen zählt der Verlust des Chromosoms Y in vielen Tumorentitäten. Auch beim Nierenzellkarzinom zählt der Y-Verlust zu den häufigsten Kopiezahlveränderungen. Die klinische Relevanz dieses Verlustes ist jedoch unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu klären, wie häufig der Y-Verlust beim Nierenzellkarzinom und dessen Subtypen tatsächlich vorkommt und ob dieser mit einem bestimmten Phänotyp der Tumoren zusammenhängt. Dazu wurde der Y-Verlust mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an über 1.000 Tumoren im Gewebemikroarray-Format (tissue microarray, TMA) untersucht. Die Ergebnisse wurden dann mit dem klinischen Verlauf (Rezidiv-freies Überleben, Tumor-spezifischer Tod, Gesamtüberleben) und den histopathologischen Parametern verglichen. Hintergrund war die Hoffnung, dass der Nachweis eines Y-Verlustes zur besseren Prognoseeinschätzung der Nierenzellkarzinome und / oder Klassifizierung eines bestimmten Subtypes geeignet ist.

## 2. Material und Methodik

### 2.1. Patientenkollektiv / Gewebemikroarray

Das Patientenkollektiv bestand aus 1.252 Männern und 557 Frauen, deren Nierentumoren zwischen den Jahren 1994 und 2016 diagnostiziert und am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf operativ entfernt wurden. Die Gewebe wurden nach einem standardisierten Verfahren in Formalin fixiert und Paraffin eingebettet <sup>66</sup>. Alle Tumoren wurden von zwei Pathologen (Dr. Franziska Büschek und Dr. Christoph Fraune) nach den Kriterien der WHO-Klassifikation 2015 beurteilt und eingestuft <sup>67</sup>. Zusätzlich dazu wurde das ISUP-Grading für jeden Tumor ermittelt. Für die Analyse des Chromosom Y-Status standen die Gewebe in Form von Gewebemikroarrays (tissue microarray, TMA) zur Verfügung. Analysiert wurden alle Tumorproben der männlichen Patientenkohorte. Zur Herstellung der TMAs wurde pro Patienten bzw. Tumor eine 0,6 mm durchmessende Stanze aus einem repräsentativen Tumorblock entnommen und in einen TMA-Block überführt. Um sicherzustellen, dass ausreichend Tumor für die Analyse in der Gewebestanze vorhanden war, wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt und beurteilt. Die klinisch-pathologischen Parameter, der histologische Subtyp und das Patientenalter standen in einer dem TMA zugehörigen Datenbank für die Studie zur Verfügung. Klinische Verlaufsdaten standen bezüglich des Gesamtüberlebens für 824 Patienten, des Tumor-spezifischen Todes für 824 Patienten und des Rezidiv-freien Überlebens für 766 Patienten für die Analyse zur Verfügung. Eine genaue Zusammensetzung des männlichen Patientenkollektivs kann der Tabelle 2 entnommen werden.

**Tabelle 2: Zusammensetzung des männlichen Patientenkollektiv des Nierentumor-Gewebe-Mikroarray (TMA).**

	Patientenzahl	
	TMA-Studienkohorte (n=1252)	Tumorrezidiv (n=202)
<b>Klinischer Verlauf (mo)</b>		
n	769 (61.4%)	202 (26.3%)
Mittelwert	61,6	-
Median	48,5	-
<b>Entität</b>		
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	827 (66.2%)	158 (19.1%)
Papilläres Nierenzellkarzinom	209 (16.7%)	21 (10.0%)
Onkozytom	87 (7.0%)	1 (1.1%)
Chromophobes Nierenzellkarzinom	66 (5.2%)	7 (10.6%)
Klarzellig-(tubulo)papilläre Nierenzellkarzinom	18 (1.4%)	/
ohne weitere Spezifizierung	14 (1.1%)	6 (42.9%)

Nephroblastom	10 (0.8%)	/
XP11.2 Translokationkarzinom	6 (0.5%)	4 (66.7%)
Sammelrohrkarzinom (bellini- karzinom)	4 (0.3%)	3 (75%)
Multilokuläre zystische Nierenzellneoplasie	3 (0.2%)	/
Zystisches Nephrom	1 (0.1%)	/
Medulläres Karzinom	1 (0.1%)	1 (100%)
Neuroendokrines Karzinom	1 (0.1%)	
<b>International society of urological pathology (ISUP)</b>		
1	256 (24.0%)	18 (7.0%)
2	401 (37.5%)	52 (13.0%)
3	340 (31.8%)	83 (24.4%)
4	72 (6.7%)	35 (48.6%)
<b>Fuhrmann-Klassifikation</b>		
1	44 (4.1%)	3 (6.8%)
2	599 (55.7%)	64 (10.9%)
3	358 (33.3%)	87 (24.3%)
4	73 (6.8%)	36 (49.3%)
<b>Thoenes-Klassifikation</b>		
1	321 (29.9%)	25 (7.8%)
2	636 (59.2%)	108 (17.0%)
3	117 (10.9%)	57 (48.7%)
<b>Tumorstadium</b>		
pT1	691 (60.1%)	57 (8.2%)
pT2	162 (14.1%)	36 (22.2%)
pT3	281 (24.4%)	96 (34.2%)
pT4	16 (1.4%)	10 (6.3%)
<b>Lymphknotenmetastasen</b>		
pN0	161 (78.2%)	58 (36.0%)
pN1	15 (7.2%)	9 (60.0%)
pN2	30 (14.5%)	26 (86.7%)
<b>Fernmetastase</b>		
pM0	145 (58.2%)	40 (27.6%)
pM1	104 (41.7%)	85 (81.7%)

## 2.2. Reagenzien und Kits

In der Tabelle 3 sind die verwendeten Materialien, Reagenzien und Kits für diese Studie aufgelistet.

**Tabelle 3: Gewebemikroarray, Reagenzien, Kits, Material und Methodik**

<b>Reagenzien / Kits</b>	<b>Firma</b>
20x SSC	Abbot, Ludwigshafen
Deckgläser No.1 24 x 60 mm	Mariensfeld, Lauda-Königshofen
Dextransulfat (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 80% (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol 96% (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol Ph Eur (1 Liter)	VWR, Darmstadt
Fixogum	Marabu, Tamm
Heizplatte	MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster
Heizrührer RCT basic	IKA® Labortechnik
Immersol	Zeiss, Oberkochen
Lab Thermometer IP65LT-101	TFA Dostmann GmbH + Co. KG, Wertheim-Reicholzheim
Lichtmikroskop, Axio Imager.A1	Zeiss, Oberkochen
Mounting Medium with DAPI (VECTASHIELD)	Vector Laboratories
MS1 Minishaker	IKA® Labortechnik, Staufen
NP-40	Abbot, Ludwigshafen
ph-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Pretreatment Reagent 500 ml	Abbot, Ludwigshafen
Primus	ALS, Jena
Protease Buffer 500 ml	Abbot, Ludwigshafen
Protease I 500 mg	Abbot, Ludwigshafen
Reinigungsbenzin	Biesterfeld Chemiedistribution GmbH
Safe-Lock Reaktionsgefäße, amber	Eppendorf (Hamburg)
Thermobrite™	Abbot, Ludwigshafen
Wasserbäder	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH), Burgwedel
Xylol	J. T. Baker, Center Valley, USA
Zentrifuge, Biofuge 13	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
FISH-Sonde	Aneu VYSION® FISH probe (VIAL 1, Abbott, #05J38-010)

### **2.3. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)**

Die FISH erfolgte anhand eines am Institut für Pathologie etablierten und standardisierten Protokolls, dass im Folgenden kurz beschrieben ist.

- Vorbehandlung des Gewebes

Entparaffinieren des Gewebes

Xylolbad: 3x für 10 Minuten

Ethanolbad: 2x für 5 Minuten

Trocknung: bei 48 °C für 3 Minuten

Inkubation in Pretreatment-Lösung: 80 °C für 15 Minuten

Zweimaliges Waschen: je 1 Minute in dH<sub>2</sub>O

Inkubation in Proteaselösung: 37 °C für 150 Minuten

Zweimaliges Waschen: 1 Minute in dH<sub>2</sub>O

Dehydrierung mittels aufsteigender Ethanolreihe: 70 %, 80 % und 96 % für je 3 Minuten

Trocknung: bei 48°C für 3 Minuten

- Hybridisierung der FISH-Sonde

FISH-Sonde (Aneu VYSION® FISH probe) vortexen und bei 2.500 g für 10 Sekunden zentrifugieren

10 µl Hybridisierungsansatz auf das Gewebe pipettieren

Deckgläschen auflegen, mit Fixogum fixieren

Hybridisierung im Hybrite: 72 °C für 10 Minuten und 37 °C für 16 bis 18 Stunden

Waschen des Gewebes

- Herstellung des Hybridisierungswaschpuffers

100 ml 20xSSC

3 ml NP40

ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O

pH = 7,25

Äquilibrierung des Gewebes: lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 20-30 Minuten in

Hybridisierungswaschpuffer

Entfernen überschüssiger FISH-Sonde: bei 72 °C für 2 Minuten in

Hybridisierungswaschpuffer

Einmaliges Waschen: in dH<sub>2</sub>O spülen

Trocknung: 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur

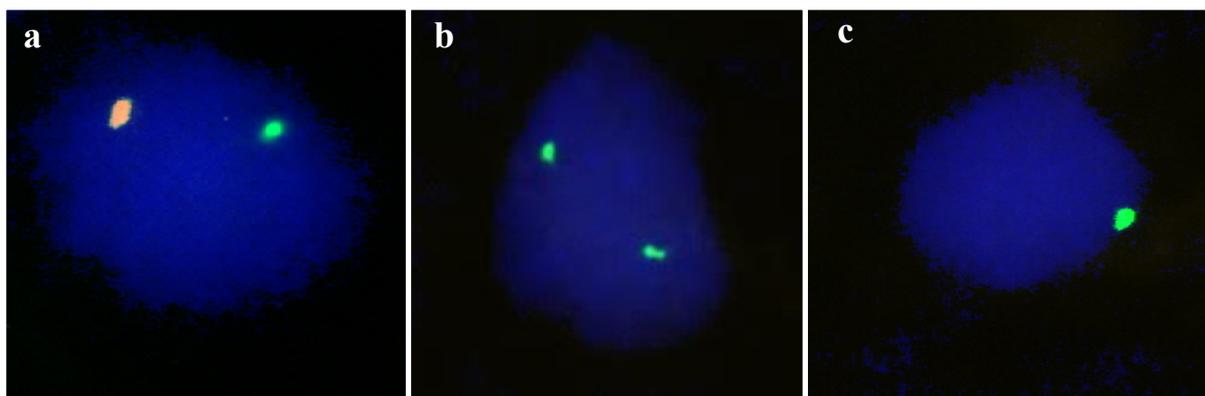
Zellkernfärbung: 1 Tropfen DAPI pipettieren und Deckgläschen auflegen

Lagerung der TMAs: - 20 °C

## 2.4. Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der FISH erfolgte mit einem Lichtmikroskop der Firma Zeiss mit den dazu passenden Fluoreszenzfiltern. Ausgeschlossen aus der Analyse wurden alle Gewebespots, die ein schwaches Fluoreszenz-Signal oder gar kein Signal in Tumor- und Stroma-Zellen aufwiesen oder keine Tumorzellen enthielten. Die männlichen Tumorzellen, die sowohl ein Signal für das Chromosom Y- und das Chromosom X (Referenzsignal) aufwiesen wurden als normal bewertet. Ein Verlust des Y-Chromosoms lag vor, wenn alle Tumorzellen kein Y-Signal besaßen, aber ein X-Signal vorhanden war. Wenn vorhanden, wurden die Stroma-Zellen im Gewebespot zusätzlich als Referenz-Zellen verwendet. Hier musste sowohl ein Y-Signal als auch ein X-Signal vorhanden sein. Zur Validierung der Analyse wurden einige der Gewebespots der weiblichen Patientinnen auf dem TMA ausgewertet. Hier waren deutlich 2 Signale für das X-Chromosom und kein Signal für das Y-Chromosom in den Tumor- und/oder Stroma-Zellen nachweisbar (Abb.6).

**Abbildung 6: Beispiele der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, a) X-Signal (grün) und Y-Signal (rot) in einer männlichen Nierenzelle, b) 2 X-Signale (grün) in einer weiblichen Nierenzelle, c) Fehlen der Y-Signal bei Vorhandensein der X-Signal in einer Tumorzelle**



## 2.5. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm JMP (Version 9.0.2) verwendet. Um die Assoziation des Chromosom-Y-Status mit den histologischen Subtypen und den klinisch-pathologischen Parametern zu prüfen, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Zur Überprüfung der prognostischen Relevanz des Y-Verlustes wurden die Ergebnisse der FISH-Analyse mit dem Gesamtüberleben der Patienten, dem Tumor-spezifischen Tod bzw. dem Rezidiv-freien Überleben mittels eines Log-Rank-Testes verglichen und in einer Kaplan-Meier-Kurve abgebildet.

## 3. Ergebnisse

### **3.1. Auswertbarkeit der Chromosom Y in FISH-Analyse**

Insgesamt konnte der Chromosom Y-Kopiezahlstatus für 1045 (83,5%) der 1252 männlichen Tumoren mittels FISH analysiert werden. 206 Tumorspots (16,5%) konnten auf Grund folgender Probleme nicht ausgewertet werden: Bei 78 Tumoren (6,2%) war nur sehr wenig oder gar kein Tumorgewebe in den TMA-Spots vorhanden. Bei 128 Gewebespots (10,2%) konnte auf Grund einer unzureichenden Hybridisierung, sowohl für das Y-Signal als auch für das X-Signal (Referenzsignal), kein Kopienzahlstatus für das Chromosom Y ermittelt werden. Ein Verlust des Chromosoms Y wurde in 496 (47%) der 1045 analysierbaren Tumoren nachgewiesen. Eine exemplarische Darstellung der FISH-Analyse befindet sich in Abbildung 6 im Material und Methodenteil.

### **3.2. Y-Verlust und histologische Typen des Nierenzellkarzinoms**

Die vergleichende Untersuchung von Tumor-Subtypen zeigte deutliche Unterschiede in der Häufigkeit des Y-Verlustes je nach histologischem Subtyp. Die papillären Nierenzellkarzinome zeigten mit 77% die höchste Y-Verlustrate. Diese war zum Beispiel signifikant höher als die Y-Verlustrate in den klarzelligen Nierenzellkarzinomen (39%;  $p < 0,0001$ ), als größte Subtypengruppe. Im Vergleich zu den klarzelligen Nierenzellkarzinomen zeigten die chromophoben Nierenzellkarzinomen mit 60% und die Onkozytomen mit 51% etwas höhere und die klarzellig-(tubulo)papilläre Nierenzellkarzinomen mit 19% ( $p = 0,0434$ ) etwas niedrigere Y-Verlustraten. Aufgrund der begrenzten Fallzahl ( $n = 1-12$ ) kann für die seltenen Subtypen keine weitere Schlussfolgerung aus der Häufigkeit des Y-Verlustes gezogen werden. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Y-Verlust und histologische Subtypen des Nierenzellkarzinoms**

Entität	Analysierbar (n)	Y-Verlust (%)
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	699	39
Papilläres Nierenzellkarzinom	170	77
Onkozytom	71	51
Chromophobes Nierenzellkarzinom	57	60
Klarzellig-(tubulo)papilläre Nierenzellkarzinom	16	19
Ohne weitere Spezifizierung	12	42
Nephroblastom	9	0
Xp11.2 Translokationskarzinom	4	25
Sammelrohrkarzinom	2	100
Multilokuläre zystische Nierenzellneoplasie	2	50
Zystisches Nephrom	1	0
Medulläres Karzinom	1	100
Neuroendokrines Karzinom	1	0

### **3.3. Y-Verlust und Tumor-Phänotyp in klarzelligen und papillären Nierenzellkarzinomen**

In den klarzelligen Nierenzellkarzinomen konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Y-Verlust und den klinisch-pathologischen Parametern nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den papillären Nierenzellkarzinomen eine klare Assoziation des Y-Verlustes zu einem günstigen Tumorphänotyp, wie einem niedrigen ISUP- ( $p=0,0027$ ) bzw. Thoenes-Grading ( $p=0,0032$ ), einem frühen Tumorstadium ( $p=0,0003$ ) und der Abwesenheit von Fernmetastasen ( $p=0,0009$ ). Zum Beispiel sank der Anteil der Tumoren mit einem Y-Verlust von 86% in den pT1 Tumoren auf 50% in den pT4 Tumoren. Die Ergebnisse der Analysen sind in der Tabelle 5 genauer dargestellt.

**Tabelle 5: Y-Verlust und klinisch-pathologische Parameter**

Parameter	Klarzelliges Nierenzellkarzinom		P	Papilläres Nierenzellkarzinom		P
	analysierbar (n)	Y-Verlust (%)		analysierbar (n)	Y-Verlust (%)	
<b>ISUP</b>						
1	176	35	0,4828	26	96	0,7000
2	238	40		85	73	
3	229	43		54	76	
4	50	38		2	0	
<b>Fuhrmann-Klassifikation</b>						
1	32	34	0,4270	2	100	0,0581
2	375	38		108	81	
3	239	44		53	72	
4	52	35		4	25	
<b>Thoenes-Klassifikation</b>						
1	223	37	0,4873	35	91	0,0032
2	393	41		122	75	
3	82	38		10	40	
<b>Tumorstadium</b>						
pT1	412	42	0,1570	113	86	0,0003
pT2	80	29		37	68	
pT3	190	38		14	36	
pT4	12	42		2	50	
<b>Lymphknotenmetastasen</b>						
pN0	100	36	0,2682	18	83	0,0650
pN1	8	63		2	50	
pN2	17	47		6	33	
<b>Fernmetastasen</b>						
pM0	80	40	0,9181	24	88	0,0009
pM1	74	39		8	25	

### **3.4. Y-Verlust und Tumorgroße**

Es zeigte sich insgesamt eine inverse Korrelation zwischen dem Y-Verlust und der mittleren Tumorgroße ( $p=0,0052$ ). Die Tumoren ohne Chromosom Y waren im Durchschnitt kleiner als die Tumoren mit Chromosom Y. Diese umgekehrte Korrelation des Y-Verlustes mit der Tumorgroße konnte im Subtyp der klarzelligen Nierenzellkarzinome nachgewiesen werden ( $p=0,0075$ ). In den Subtypen der papillären und chromophoben Nierenzellkarzinome war diese Assoziation nicht mehr signifikant ( $p=0,0809$  bzw.  $p=0,0747$ ), aber tendenziell ebenfalls vorhanden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6: Y-Verlust und Tumorgroße**

Subtyp	Chromosom Y	Analysierbar (n)	Tumorgroße		P
			Mittelwert (cm)	SD	
<b>Alle Tumoren</b>	Verlust	482	5,0	0,1	<i>0,0052</i>
	Normal	546	5,5	0,1	
<b>Klarzelliges Nierenzellkarzinom</b>	Verlust	272	5,0	0,2	<i>0,0075</i>
	Normal	416	5,6	0,1	
<b>Papilläres Nierenzellkarzinom</b>	Verlust	127	5,0	0,3	0,0809
	Normal	39	6,2	0,8	
<b>Chromophobes Nierenzellkarzinom</b>	Verlust	33	6,2	0,5	0,0747
	Normal	23	4,5	0,6	

### **3.5. Y-Verlust und Patientenalter**

Insgesamt zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen einem höheren Alter der Patienten und dem Y-Verlust ( $p < 0,0001$ ). Diese Assoziation war ebenfalls im Subtyp der klarzelligen Nierenzellkarzinome nachweisbar ( $p < 0,0001$ ). In den Subtypen der papillären und chromophoben Nierenzellkarzinome konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Y-Verlust und dem Patientenalter festgestellt werden. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

**Tabelle 7: Y-Verlust und Patientenalter**

Subtyp	Chromosom Y	Analysierbar(n)	Patientenalter		
			Mittelwert (Jahre)	SD	P
<b>Alle Tumoren</b>	Verlust	493	64,8	0,5	<i>&lt;0,0001</i>
	Normal	555	59,4	0,6	
<b>Klarzelliges Nierenzellkarzinom</b>	Verlust	276	65,9	0,6	<i>&lt;0,0001</i>
	Normal	423	60,8	0,5	
<b>Papilläres Nierenzellkarzinom</b>	Verlust	131	62,4	1,1	0,1416
	Normal	39	58,9	2,5	
<b>Chromophobes Nierenzellkarzinom</b>	Verlust	34	58,9	2,2	0,5298
	Normal	23	60,9	2,2	

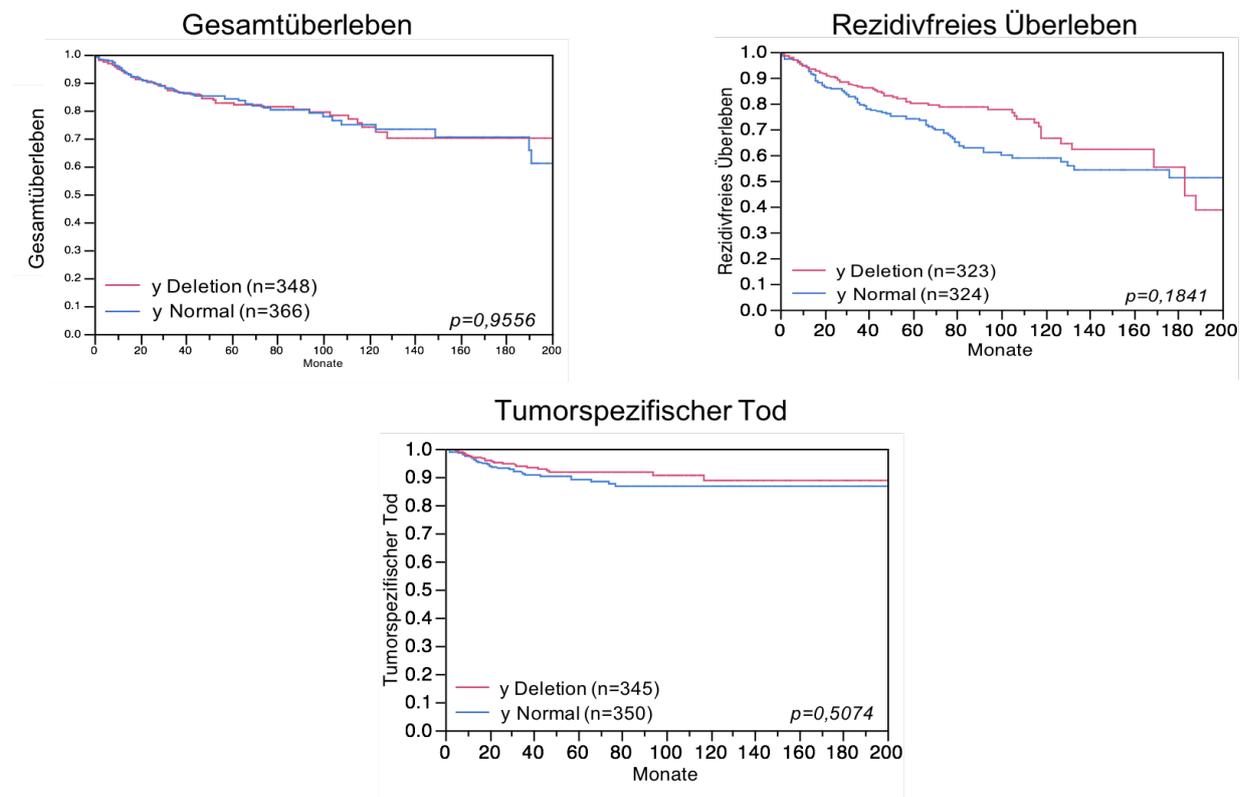
### 3.6. Y-Verlust und Prognose

Als klinische Endpunkte dienten für diese Untersuchungen das Gesamtüberleben, der Tumorspezifische Tod und das Rezidiv-freie Überleben. Die Analysen wurden zunächst in allen Nierenzellkarzinomen und dann in den Subtypen der klarzelligen und papillären Nierenzellkarzinome durchgeführt.

#### 3.6.1. Y-Verlust und die Prognose in allen Nierenzellkarzinomen.

Bei der Analyse aller Nierenzellkarzinome ergab sich keine signifikante Assoziation zwischen dem Y-Verlust-Status und dem Gesamtüberleben der Patienten ( $p=0,9556$ ), dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,1841$ ) und dem tumorspezifischen Tod ( $p=0,5074$ ). In Bezug auf das Gesamtüberleben und den tumorspezifischen Tod verliefen die Kurven für die Tumoren mit und ohne einen Y-Verlust sogar nahezu identisch. In Bezug auf das rezidivfreie Überleben zeigten die Tumoren mit einem Y-Verlust tendenziell einen besseren klinischen Verlauf.

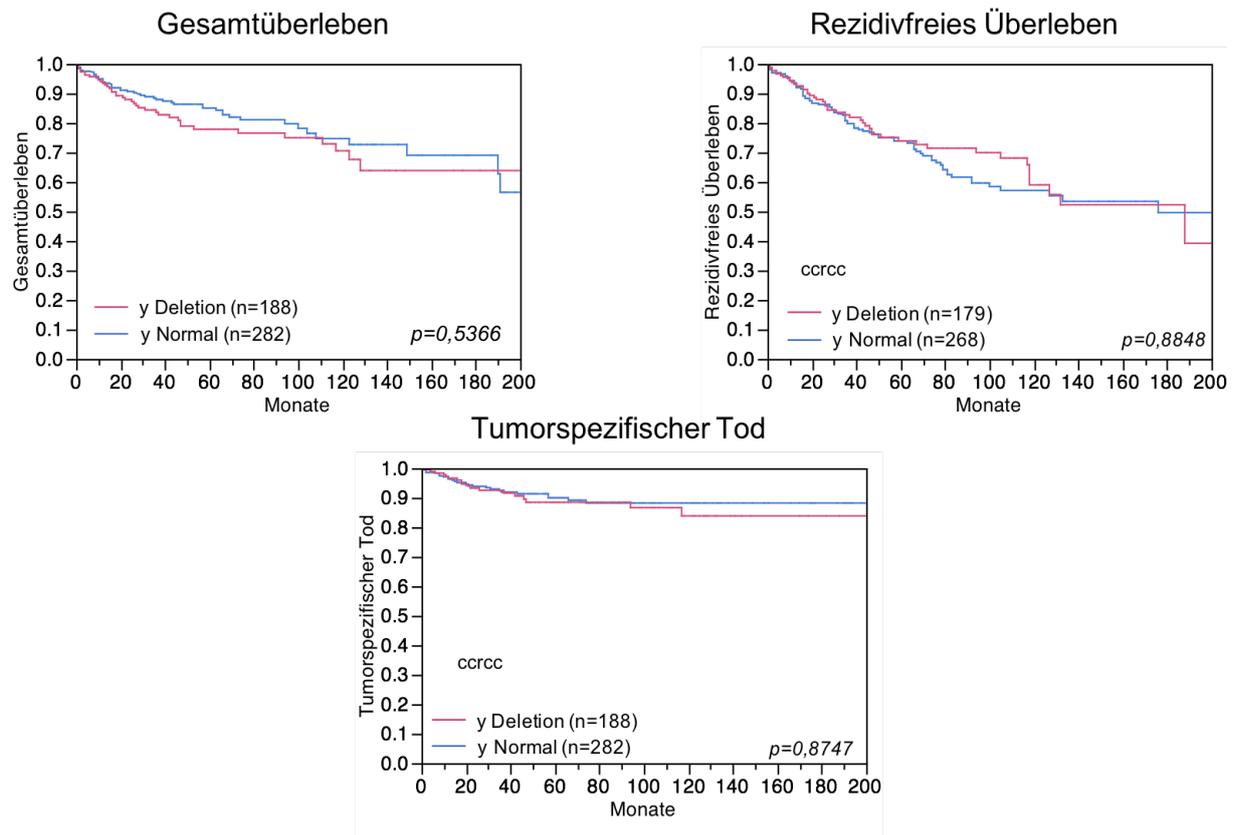
Abbildung 7: Y-Verlust und Patientenprognose in allen Patienten



### 3.6.2. Y-Verlust und die Prognose der Patienten in den klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Bei der Analyse der klarzelligen Nierenzellkarzinome ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Tumoren mit oder ohne Y-Verlust in Bezug auf das Gesamtüberleben der Patienten ( $p=0,5366$ , Abb. 8.a.), den tumorspezifischen Tod ( $p=0,8747$ , Abb. 8.b.) und dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,8848$ , Abb. 8.c.). In allen drei Analysen verliefen die Kurven für die Tumoren mit und ohne Y-Verlust nahezu identisch.

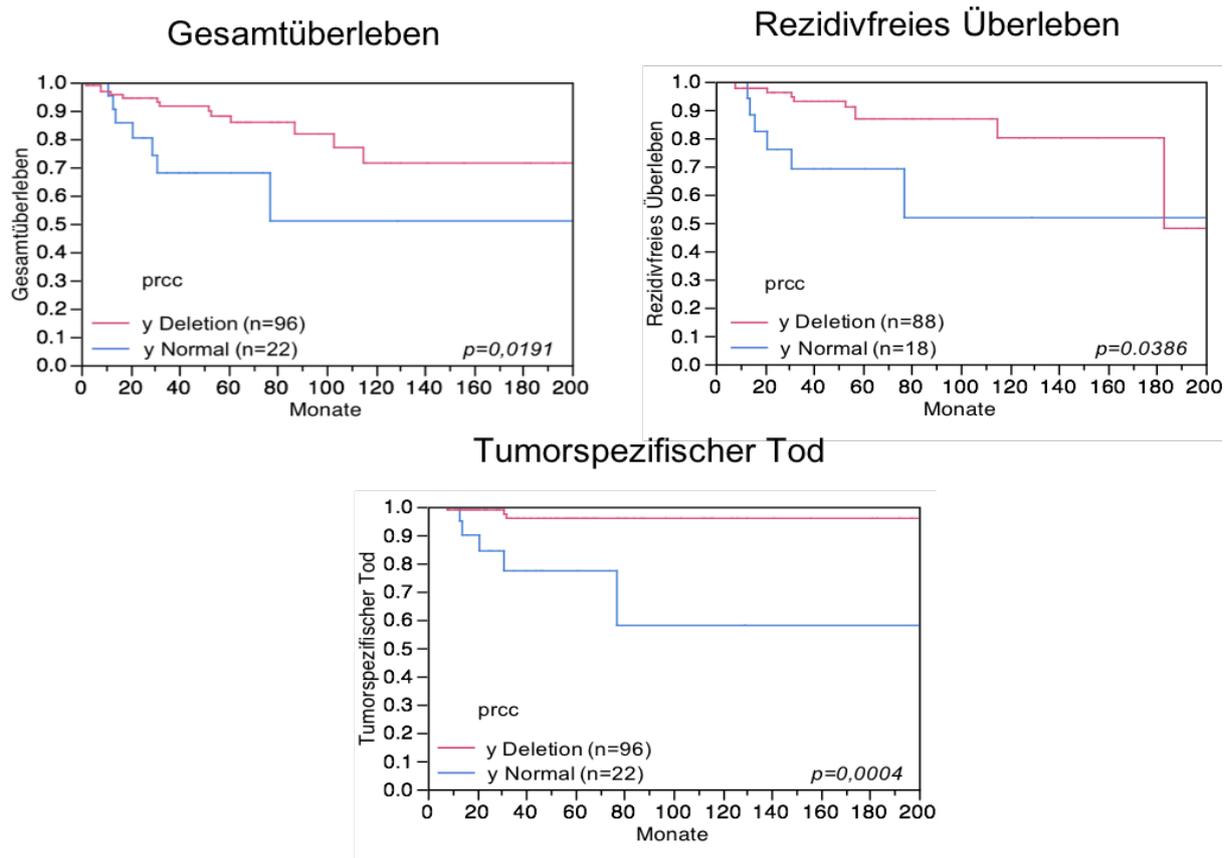
**Abbildung 8: Y-Verlust und Patientenprognose in Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen**



### 3.6.3. Y-Verlust und Prognose in papillären Nierenzellkarzinomen

Bei der Analyse der papillären Nierenzellkarzinome zeigte sich eine signifikante Assoziation des Y-Verlustes mit einem besseren Gesamtüberleben der Patienten ( $p=0,0191$ , Abb. 9.a.), einer höheren Wahrscheinlichkeit eines rezidivfreien Überlebens der Patienten ( $p=0,0386$ , Abb. 9.b.) und einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit des tumorspezifischen Todes ( $p=0,0004$ , Abb. 9.c.). Zum Beispiel verstarben weniger als 5% der Patienten mit einem Y-Verlust in den Tumorzellen 8 Jahre postoperativ an dem papillären Nierenzellkarzinom. Im Gegensatz dazu verstarben im gleichen Zeitraum mehr als 40% der Patienten ohne Y-Verlust in den Tumorzellen an ihrer Karzinomerkrankung. Von den Patienten mit einem Tumor ohne Y-Verlust erlitten außerdem im gleichen Zeitraum circa 50% ein Rezidiv, während Tumoren mit einem Y-Verlust nur in circa 15% der Fälle rezidierten.

Abbildung 9: Y-Verlust und Patientenprognose in Patienten mit papillären Nierenzellkarzinomen



## 4. Diskussion

Der Verlust des Chromosoms Y zählt zu den häufigsten genetischen Veränderungen in soliden Tumoren. Es ist daher erstaunlich, dass in vielen Tumorentitäten die klinische Bedeutung dieser genetischen Aberration bisher immer noch unklar ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Zusammenhang zwischen dem Y-Verlust und dem Phänotyp bzw. der Patientenprognose beim Nierenzellkarzinom zu klären. Dazu wurde eine große Kohorte aus über 1.000 Nierenzellkarzinomen mittels FISH auf den Y-Chromosomstatus hin untersucht.

Insgesamt konnte in 47% der 1045 analysierbaren Nierenzellkarzinome ein Y-Verlust nachgewiesen werden. Damit zählt das Nierenzellkarzinom zu den Tumorentitäten mit einem vergleichsweise sehr häufigen Y-Verlust. In früheren Studien der Arbeitsgruppe aus der UKE-Pathologie, welche ebenfalls an TMAs mit 0,6 mm durchmessenden Gewebeproben durchgeführt wurden, wurden deutlich niedrigere Häufigkeiten dieses Verlustes in Karzinomen des Kolons (31%), des Ösophagus (25%), der Lunge (24%), der Harnblase (22%), der Pankreas (12%) und der Prostata (0,6%) nachgewiesen<sup>61,68</sup>. Sowohl in der eigenen Studie als auch den vorherigen Studien wurde zur Bestimmung des Chromosoms Y-Status die FISH verwendet. Diese Methode gilt als der Goldstandard zur Bestimmung von genomischen Kopiezahlveränderungen. Der Grund dafür ist, dass diese Methode direkt am Gewebe angewendet wird<sup>69</sup>, während andere Methoden, wie zum Beispiel die komperative genomische Hybridisierung (comperative genomic hybridization, CGH) an isolierter DNA durchgeführt wird<sup>70</sup>. Hier kann es also zu einer Verfälschung der Ergebnisse durch eine „Verunreinigung“ der Probe mit DNA aus angrenzenden benignen Zellen kommen<sup>71,72</sup>. Als interne Kontrolle wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zur Chromosom Y Sonde eine Chromosom X Sonde verwendet. Ein Y-Verlust wurde nur dann angenommen, wenn alle Tumorzellen kein Y-Signal bei Vorhandensein eines X-Signals zeigten. Des Weiteren wurden – wenn vorhanden - die angrenzenden benignen Zellen als Referenz herangezogen. Basierend auf diesem Grenzwert und der Verwendung der FISH kann davon ausgegangen werden, dass die Datenqualität dieser Studie hoch ist. Die Studie zeigt, dass der Y-Verlust zu den häufigsten genetischen Veränderungen beim Nierenzellkarzinom zählt.

Interessanterweise konnte in allen von der Arbeitsgruppe der UKE-Pathologie bisher untersuchten Tumorentitäten kein wesentlicher Zusammenhang zwischen dem Fehlen oder dem Vorhandensein des Y-Chromosoms und dem Phänotyp oder der Prognose des jeweiligen Tumortyps festgestellt werden<sup>61,68</sup>. Dies lege die Vermutung nahe, dass das Auftreten eines Y-Verlustes höchstens mit dem Tumortyp aber weniger mit der Aggressivität der Tumoren zusammenhängt. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Häufigkeit des Y-Verlustes sich in den unterschiedlichen histologischen Typen der Nierenzellkarzinome deutlich unterscheidet. Während fast 80% der papillären Nierenzellkarzinome einen Y-Verlust aufweisen, konnte dieser zum Beispiel nur in circa 20% der klarzellig-tubopapillären Nierenzellkarzinome gefunden werden. Dass der Y-Verlust vermutlich eher nicht mit einer Tumorprogression einhergeht, wird jedoch vor allem durch die hohe Rate des Y-Verlustes von 50% in den Onkozytomen deutlich. Dieser histologische Subtyp gilt klar als benigner Nierentumor<sup>14,15,22,73</sup>. Dass häufige Auftreten einer genetischen Veränderung, welche die

Tumoraggressivität fördert, wäre dementsprechend nicht nur unerwartet, sondern auch schwierig erklärbar. Es ist daher auch nicht erstaunlich, dass weder in allen noch in den Untergruppen der klarzelligen oder chromophoben Nierenzelltumoren eine Assoziation des Y-Verlust mit dem Tumorphänotyp, dem Gesamtüberleben, dem tumorspezifischen Tod oder dem Rezidiv-freien Überleben gefunden werden konnte.

Auch der gehäufte Verlust des Y-Chromosoms in papillären Nierenzellkarzinomen in der vorliegenden Arbeit war nicht komplett unerwartet. In einer früheren Studie wurde der Y-Verlust zusammen mit Trisomien der Chromosomen 7 und 17 bereits als eines der häufigsten und charakteristischen Merkmale der papillären Nierenzellkarzinome identifiziert<sup>59,63</sup>. Auffällig war allerdings, dass auch chromophobe Nierenzellkarzinome (60% Y-Verlust), Onkozytome (51% Y-Verlust) und klarzellige Nierenzellkarzinome (39% Y-Verlust) eine vergleichsweise hohe Y-Verlustrate aufwiesen. Der Verlust des Chromosoms Y war damit in diesen Tumorsubtypen deutlich häufiger vorhanden als in allen anderen bisher untersuchten Tumorentitäten (12%-31%), an denen ebenfalls mittels FISH im TMA-Format der Y-Verlust untersucht wurde<sup>61,68</sup>. Dies zeigt eine generell erhöhte Tendenz zum Verlust des Y-Chromosoms im Nierenepithelgewebe. In einer früheren Studie konnte ein Y-Verlust aber auch in nicht tumorösem Nierenepithelgewebe nachgewiesen werden<sup>74</sup>. Dies und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen damit klar daraufhin, dass der Nachweis eines Y-Verlustes keinen geeigneten Marker zur Subtypisierung der Nierenzellkarzinome darstellt.

Bemerkenswert ist jedoch, dass der Y-Verlust in den papillären Nierenzellkarzinomen mit einer besseren Prognose für die Patienten in Verbindung steht. Insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der Y-Verlust in diesem bestimmten Tumorsubtyp extrem häufig vorkommt. Bisher wurde kein anderer Tumortyp beschrieben, der in einer vergleichbaren Kohortengröße eine höhere Y-Verlustrate aufweist als in dieser Arbeit die papillären Nierenzellkarzinome. Generell gibt es nur wenige Tumortypen in denen eine derartig hohe Häufigkeit (>70%) einer rekurrenten molekularen Veränderung beschrieben wurde. Ein Beispiel wäre hier die Chromosomentranslokation zwischen den Chromosomen 9 und 22  $t(9;22)(q34;q11)$ , das sogenannte Philadelphia-Chromosom, das in circa 90% der Patienten mit chronisch myeloische Leukämie vorkommt und als Kennzeichen für diese Erkrankung beschrieben wurde<sup>75</sup>. Es könnte somit möglich sein, dass der Y-Verlust eine pathogenetische Wirkung in papillären Nierenzellkarzinomen besitzt. Die wenigen papillären Karzinome ohne Y-Verlust könnten somit vielleicht eine eigene Gruppe von Tumoren darstellen, welche durch eine besondere biologisch-bedingte Aggressivität charakterisiert ist.

Der signifikante Zusammenhang zwischen dem Y-Verlust und einem hohen Patientenalter steht in Einklang mit früheren Studienergebnissen, die vermuten lassen, dass es sich bei einem Y-Verlust um ein altersabhängiges Phänomen handelt. Es wurde zum Beispiel eine Assoziation zwischen dem Y-Verlust und einem höheren Patientenalter in einigen hämatologischen Erkrankungen sowie beim Blasenkarzinom beschrieben<sup>58,76</sup>. In einer dieser Studien, die das Vorhandensein des Y-Chromosoms in neoplastischen und normalen Knochenmark untersuchte, wurde allerdings eine vergleichbar hohe Y-Verlust-Rate mit steigendem Alter des Patienten bei myeloproliferativen Erkrankungen wie auch im normalen Knochenmark festgestellt<sup>76</sup>. Zudem wurden Y-Verluste in benignen hämatologischen, renalen und urothelialen Zellen beschrieben<sup>74,76,77</sup>. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei dem Verlust des Y-Chromosoms um ein rein altersabhängiges Phänomen handelt, das dementsprechend keine diagnostische Relevanz besitzt. Des Weiteren wurde vermutet, dass

der Verlust des Y-Chromosoms - welches in einigen adulten Geweben vermutlich nicht erforderlich ist - für normale Zellen sogar vorteilhaft sein könnte, da die Menge der zu bearbeitenden DNA während der Replikation reduziert wird. Das ein Teil des kanzerösen Gewebes schlicht und einfach aus normalen „älteren“ Zellen mit bereits erfolgten Y-Verlust entstehen, passt auch zu der Beobachtung, dass bereits in niedrig- und hochgradigen Dysplasien wie auch Karzinom-angrenzenden intestinalen Metaplasien ein Y-Verlust nachgewiesen werden konnte <sup>60</sup>.

Eine alternative Erklärung für die eindeutige Verbindung des Y-Verlustes mit einem höheren Alter des Patienten und auch einer kleineren Tumorgroße zum Zeitpunkt der Diagnose wäre die fehlende Selbstaktivierung der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und dadurch fehlenden Anti-Tumor-Immunktivierung in Geweben mit einem Y-Verlust <sup>78</sup>. Es ist vorstellbar, dass der Verlust des humanem minor Histokompatibilität-Y-Alloantigen (minor H-Y Alloantigen), das durch das Smcy Gen auf dem Y-Chromosom codiert ist - die Aktivierung von NK-Zellen auslöst und dadurch das Wachstum und die Demaskierung von Nierenzellkarzinomen bei vorhandenen Y-Verlust verlangsamt. Somit könnte die Immuntherapie mit hochdosiertem Interleukin-2, das eine zusätzliche Reaktionserhöhung der NK-Zellen verursacht, eine besonders effektive Therapie von Patienten mit einem Nierenzellkarzinom mit nachgewiesenem Y-Verlust darstellen <sup>79</sup>.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass der Y-Verlust ein ungewöhnlich häufiges Phänomen in Nierenzellkarzinomen darstellt und dass ein Zusammenhang zwischen dem Y-Verlust und einer günstigeren Prognose bei papillären Nierenzelltumoren besteht. Obwohl signifikante Unterschied in der Häufigkeit des Y-Verlustes zwischen verschiedenen Tumorsubtypen nachgewiesen werden konnten, stellt die Analyse des Y-Chromosoms kein geeignetes Mittel zur weiteren Klassifikation der Nierenzellkarzinome dar.

## 5. Zusammenfassung

Der Verlust des Y-Chromosoms zählt zu den häufigsten genetischen Veränderungen in soliden Tumoren. Der klinische Stellenwert dieses Chromosomenverlustes ist jedoch in vielen Tumorentitäten immer noch unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die diagnostische und prognostische Bedeutung des Y-Chromosomverlustes (Y-Verlust) beim Nierenzellkarzinom zu untersuchen. Dazu wurde der Kopiezahlstatus des Chromosoms Y mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) an 1045 Nierentumoren männlicher Patienten in einem Gewebemikroarray-Format (tissue micro array, TMA) analysiert und mit den klinisch-pathologischen Parametern, dem histologischen Typ und der Prognose der Patienten verglichen. In der Studie wurde in 47% der untersuchten Tumoren ein Y-Verlust nachgewiesen, wobei die Häufigkeit des Verlustes stark zwischen den verschiedenen histologischen Tumorsubtypen variierte. Die papillären Nierenzellkarzinome zeigten mit 77% Y-Verlust die höchste Prävalenz, gefolgt von chromophoben Nierenzellkarzinomen (60%), Onkozytomen (51%), klarzelligen Nierenzellkarzinomen (39%) und klarzell-tubopapillären Nierenzellkarzinomen (19%). Eine besondere Bedeutung des Y-Verlustes in den papillären Nierenzellkarzinomen wird unterstützt durch die geringere Rezidivrate in der Gruppe der 88 Patienten mit Tumoren ohne Chromosom Y im Vergleich zu der Gruppe der 18 Patienten deren Tumoren ein Chromosom Y aufwiesen ( $p=0,0386$ ). In den klarzelligen und chromophoben Karzinomen bestand kein Zusammenhang zwischen dem Y-Verlust und dem Phänotyp bzw. der Krankheitsprognose. Weiter konnte eine erhöhte Y-Verlust-Rate in kleineren Tumoren und bei Patienten mit höherem Alter nachgewiesen werden. Patienten mit nachgewiesenem Y-Verlust im Tumor waren bei der Diagnose  $64,8 \pm 0,5$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) Jahre alt, während die Patienten ohne Y-Verlust im Tumor im Mittel  $59,4 \pm 0,6$  Jahre alt waren ( $p<0,0001$ ). Insgesamt weisen die gewonnenen Daten auf eine besonders wichtige Rolle des Y-Verlustes in papillären Nierenzellkarzinomen hin. Hier ist der Nachweis des Y-Verlustes ein potentiell relevanter prognostischer Biomarker zur Identifizierung von Tumoren mit einem günstigeren klinischen Verlauf.

## 6. Abstract

Loss of chromosome Y is a common event in solid tumors, but its clinical relevance is unclear in many tumor entities. In order to investigate frequency and relevance of Y-loss in kidney cancer, a cohort of 1045 male renal tumor was analyzed by fluorescence in situ hybridization in a tissue microarray format with clinic-pathological parameters, histological subtypes and patient prognosis. Y-loss was found in 47% of tumors in this study. Its frequency varied notably between kidney tumor subtypes. Y-loss was most prevalent in papillary renal cell carcinoma (77%), followed by chromophobe renal cell carcinoma (60%), oncocytoma (51%), clear cell renal cell carcinoma (39%) and clear cell papillary renal cell carcinoma (19%). A particularly relevant role of Y-loss for papillary renal cell carcinoma is further supported by the significantly lower recurrence rate in 88 patients with a Y-loss in their tumor as compared to 18 patients with retained Y chromosome ( $p=0.0386$ ). In clear cell and chromophobe carcinoma, Y-loss was largely unrelated to tumor phenotype and disease outcome. Y-loss was further linked to higher patient age and smaller tumor size. The patient age (mean  $\pm$  SEM) was 64.8  $\pm$  0.5 years in patients having a Y-loss in their tumor as compared to 59.4  $\pm$  0.6 years in patients without Y-loss ( $p<0,0001$ ). The collected data in this Study suggest a particularly strong role of Y-loss in papillary renal cell carcinoma, where it may represent a potentially relevant prognostic biomarker suggesting favorable disease outcome.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
2. Escudier, B. *et al.* Renal cell carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **27**, v58–v68 (2016).
3. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 7–30 (2016).
4. WHO. Globocan 2012 - Home. *Globocan 2012* (2012).
5. Cancer, I. A. for R. on. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *Monograph* **83**, Volume 83 (2004).
6. Chow, W.-H., Dong, L. M. & Devesa, S. S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat. Rev. Urol.* **7**, 245–257 (2010).
7. Hunt, J. D., Van Der Hel, O. L., McMillan, G. P., Boffetta, P. & Brennan, P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: Meta-analysis of 24 studies. *Int. J. Cancer* **114**, 101–108 (2005).
8. Bergström, a *et al.* Obesity and renal cell cancer--a quantitative review. *Br. J. Cancer* **85**, 984–990 (2001).
9. Van Dijk, B. A. C., Schouten, L. J., Kiemeny, L. A. L. M., Goldbohm, R. A. & Van Den Brandt, P. A. Relation of height, body mass, energy intake, and physical activity to risk of renal cell carcinoma: Results from the Netherlands Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* **160**, 1159–1167 (2004).
10. Rini, B. I., Campbell, S. C. & Escudier, B. Renal cell carcinoma. *The Lancet* **373**, 1119–1132 (2009).
11. American Cancer Society. Signs and Symptoms of Cancer. *Am. Cancer Soc.* 1–9 (2012). doi:10.1016/B978-0-7506-7404-1.50006-X
12. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), D. K. e. V. (DKG) und D. K. (DKH). S3-Leitlinie Diagnostik , Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms. *Leitlinienprogr. Onkol.* 1–52 (2015).
13. Petrelli, F. *et al.* Cytoreductive Nephrectomy in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated With Targeted Therapies: A Systematic Review With a Meta-Analysis. *Clinical Genitourinary Cancer* **14**, 465–472 (2016).
14. Zhou, M. & He, H. Pathology of renal cell carcinoma. in *Renal Cell Carcinoma: Clinical Management* 23–41 (2013). doi:10.1007/978-1-62703-062-5\_2
15. Eble, J. N., Sauter, G., Epstein, J. I. & Sesterhenn, I. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. (2004).
16. Cohen, D. & Zhou, M. Molecular genetics of familial renal cell carcinoma syndromes. *Clinics in Laboratory Medicine* **25**, 259–277 (2005).
17. Amin, M. B. *et al.* Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: An experience of 405 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **26**, 281–291 (2002).
18. Chevillet, J. C., Lohse, C. M., Zincke, H., Weaver, A. L. & Blute, M. L. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **27**, 612–624 (2003).
19. Amin, M. B. *et al.* Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: Histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **21**, 621–635 (1997).
20. Moch, H. *et al.* Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: A swiss experience with 588

- tumors. *Cancer* **89**, 604–614 (2000).
21. Delahunt, B. & Eble, J. N. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod. Pathol.* **10**, 537–44 (1997).
  22. Chao, D. H. *et al.* Changing concepts in the management of renal oncocytoma. *Urology* **59**, 635–642 (2002).
  23. Perez-Ordóñez, B. *et al.* Renal oncocytoma: a clinicopathologic study of 70 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **21**, 871–83 (1997).
  24. Lieber, M. M., Tomera, K. M. & Farrow, G. M. Renal oncocytoma. *J Urol* **125**, 481–5 (1981).
  25. Störkel, S., Steart, P. V., Drenckhahn, D. & Thoenes, W. The human chromophobe cell renal carcinoma: Its probable relation to intercalated cells of the collecting duct. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **56**, 237–245 (1988).
  26. Muglia, V. F. & Prando, A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol. Bras.* **48**, 166–174 (2015).
  27. Crotty, T. B., Farrow, G. M. & Lieber, M. M. Chromophobe cell renal carcinoma: clinicopathological features of 50 cases. *J. Urol.* **154**, 964–967 (1995).
  28. Mnatzakanian, G. N., Shinagare, A. B., Sahni, V. A., Hirsch, M. S. & Silverman, S. G. Early-stage clear cell tubulopapillary renal cell carcinoma: imaging features and distinction from clear cell and papillary subtypes. *Abdom. Radiol.* **41**, 2187–2195 (2016).
  29. Zhou, H. *et al.* Clear cell papillary renal cell carcinoma is the fourth most common histologic type of renal cell carcinoma in 290 consecutive nephrectomies for renal cell carcinoma. *Hum. Pathol.* **45**, 59–64 (2014).
  30. Lopez, J. I. *et al.* Renal cell carcinoma in young adults: A study of 130 cases and a review of previous series. *Urol. Int.* **84**, 292–300 (2010).
  31. Kuroda, N. *et al.* Clear cell papillary renal cell carcinoma: a review. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 7312–7318 (2014).
  32. Park, J. H., Lee, C., Suh, J. H. & Moon, K. C. Clear cell papillary renal cell carcinoma: A report of 15 cases including three cases of concurrent other-type renal cell carcinomas. *Korean J. Pathol.* **46**, 541–547 (2012).
  33. Aydin, H. *et al.* Clear cell tubulopapillary renal cell carcinoma: A study of 36 distinctive low-grade epithelial tumors of the kidney. *Am. J. Surg. Pathol.* **34**, 1608–1621 (2010).
  34. Alexiev, B. A. & Drachenberg, C. B. Clear cell papillary renal cell carcinoma: Incidence, morphological features, immunohistochemical profile, and biologic behavior: A single institution study. *Pathol. Res. Pract.* **210**, 234–241 (2014).
  35. Hagenkord, J. M., Gatalica, Z., Jonasch, E. & Monzon, F. A. Clinical genomics of renal epithelial tumors. *Cancer Genetics* **204**, 285–297 (2011).
  36. Cheng, L., Zhang, S., MacLennan, G. T., Lopez-Beltran, A. & Montironi, R. Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms. *Hum. Pathol.* **40**, 10–29 (2009).
  37. Jiang, F. *et al.* Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma: genetic differences between histological subtypes. *Am. J. Pathol.* **153**, 1467–1473 (1998).
  38. Höglund, M. *et al.* Dissecting karyotypic patterns in renal cell carcinoma: An analysis of the accumulated cytogenetic data. *Cancer Genet. Cytogenet.* **153**, 1–9 (2004).
  39. Hughson, M. D., Dickman, K., Bigler, S. A., Meloni, A. M. & Sandberg, A. A. Clear-cell and papillary carcinoma of the kidney: An analysis of chromosome 3, 7, and 17 abnormalities by microsatellite amplification, cytogenetics, and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* **106**, 93–104 (1998).
  40. Yusenko, M. V. *et al.* High-resolution DNA copy number and gene expression analyses distinguish chromophobe renal cell carcinomas and renal oncocytomas. *BMC*

- Cancer* **9**, (2009).
41. Brown, J. A. *et al.* Fluorescence in situ hybridization analysis of renal oncocytoma reveals frequent loss of chromosomes Y and 1. *J. Urol.* **156**, 31–35 (1996).
  42. Klatte, T. *et al.* Cytogenetic profile predicts prognosis of patients with clear cell renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 746–53 (2009).
  43. Arai, E. *et al.* Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-comparative genomic hybridization: its association with DNA methylation alteration and patient outcome. *Clin. Cancer Res.* **14**, 5531–9 (2008).
  44. Foster, R. E. *et al.* Characterization of a 3;6 translocation associated with renal cell carcinoma. *Genes Chromosom. Cancer* **46**, 311–317 (2007).
  45. Yamaguchi, S. *et al.* The allelic loss of chromosome 3p25 with c-myc gain is related to the development of clear-cell renal cell carcinoma. *Clin. Genet.* **63**, 184–191 (2003).
  46. Feil, G. *et al.* Loss of chromosomes in clear cell renal cell carcinoma and in corresponding renal parenchyma. in *Anticancer Research* **19**, 1477–1482 (1999).
  47. Beroukhi, R. *et al.* Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-Hippel Lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res.* **69**, 4674–4681 (2009).
  48. Kluzek, K. *et al.* Genetic characterization of Polish ccRCC patients: somatic mutation analysis of PBRM1, BAP1 and KDMC5, genomic SNP array analysis in tumor biopsy and preliminary results of chromosome aberrations analysis in plasma cell free DNA. *Oncotarget* **8**, 28558–28574 (2017).
  49. Kojima, T. *et al.* FOXO1 and TCF7L2 genes involved in metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Genes. Chromosomes Cancer* **49**, 379–89 (2010).
  50. Gutenber, A. *et al.* Predictive chromosomal clusters of synchronous and metachronous brain metastases in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Genet.* **207**, 206–213 (2014).
  51. Sanjmyatav, J., Schubert, J. & Junker, K. Comparative study of renal cell carcinoma by CGH, multicolor-FISH and conventional cytogenic banding analysis. *Oncol. Rep.* **14**, 1183–1187 (2005).
  52. Joshi, S. *et al.* The Genomic Landscape of Renal Oncocytoma Identifies a Metabolic Barrier to Tumorigenesis. *Cell Rep.* **13**, 1895–1908 (2015).
  53. Kouba, E. J. *et al.* High fidelity of driver chromosomal alterations among primary and metastatic renal cell carcinomas : implications for tumor clonal evolution and treatment. *Mod. Pathol.* **29**, 1–11 (2016).
  54. Kuroda, N. *et al.* Chromosomal abnormalities of clear cell renal cell carcinoma: Frequent gain of chromosome 7. *Pathol. Int.* **60**, 9–13 (2010).
  55. Hunter, S., Gramlich, T., Abbott, K. & Varma, V. Y chromosome loss in esophageal carcinoma: an in situ hybridization study. *Genes. Chromosomes Cancer* **8**, 172–177 (1993).
  56. Van Dekken, H. *et al.* Molecular cytogenetic evaluation of gastric cardia adenocarcinoma and precursor lesions. *Am. J. Pathol.* **158**, 1961–1967 (2001).
  57. Kowalski, J. *et al.* Chromosomal abnormalities of adenocarcinoma of the pancreas: identifying early and late changes. *Cancer Genet. Cytogenet.* **178**, 26–35 (2007).
  58. Sauter, G. *et al.* Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* **82**, 163–169 (1995).
  59. Brunelli, M., Eble, J. N., Zhang, S., Martignoni, G. & Cheng, L. Metanephric Adenoma Lacks the Gains of Chromosomes 7 and 17 and Loss of Y That Are Typical of Papillary Renal Cell Carcinoma and Papillary Adenoma. *Mod. Pathol.* **16**, 1060–1063 (2003).
  60. Walch, A. K. *et al.* Chromosomal imbalances in Barrett’s adenocarcinoma and the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Am. J. Pathol.* **156**, 555–566 (2000).

61. Minner, S. *et al.* Y chromosome loss is a frequent early event in urothelial bladder cancer. *Pathology* **42**, 356–359 (2010).
62. Kardas, I. *et al.* Cytogenetic and molecular findings in 75 clear cell renal cell carcinomas. *Oncol. Rep.* **13**, 949–956 (2005).
63. Kovacs, G., Fuzesi, L., Emanuel, a & Kung, H. F. Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes. Chromosomes Cancer* **3**, 249–255 (1991).
64. Speicher, M. R. *et al.* Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am. J. Pathol.* **145**, 356–364 (1994).
65. Lindgren, V. *et al.* Cytogenetic analysis of a series of 13 renal oncocytomas. *J. Urol.* **171**, 602–604 (2004).
66. Mirlacher, M. & Simon, R. Recipient Block TMA Technique. in *Tissue Microarrays - Methods and Protocols* **664**, 37–44 (2010).
67. Moch, H., Cubilla, A. L., Humphrey, P. A., Reuter, V. E. & Ulbright, T. M. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur. Urol.* **70**, 93–105 (2016).
68. Stahl, P. R. *et al.* Y chromosome losses are exceedingly rare in prostate cancer and unrelated to patient age. *Prostate* **72**, 898–903 (2012).
69. Hu, L. *et al.* Fluorescence in situ hybridization (FISH): An increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine. *Biomarker Research* **2**, (2014).
70. Kallioniemi, a *et al.* Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**, 818–821 (1992).
71. Jaksik, R., Iwanaszko, M., Rzeszowska-Wolny, J. & Kimmel, M. Microarray experiments and factors which affect their reliability. *Biology Direct* (2015). doi:10.1186/s13062-015-0077-2
72. Kroll, K. M., Barkema, G. T. & Carlon, E. Modeling background intensity in DNA microarrays. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* (2008). doi:10.1103/PhysRevE.77.061915
73. Pearse, H. D. & Houghton, D. C. Renal oncocytoma. *Urology* **13**, 74–77 (1979).
74. van den Berg, E., Dijkhuizen, T., Störkel, S., Molenaar, W. M. & de Jong, B. Chromosomal abnormalities in non-neoplastic renal tissue. *Cancer Genet. Cytogenet.* **85**, 152–154 (1995).
75. Hagemeyer, A. Chromosome abnormalities in CML. *Baillieres. Clin. Haematol.* **1**, 963–981 (1987).
76. Herens, C. *et al.* Loss of the Y chromosome in bone marrow cells: Results on 1907 consecutive cases of leukaemia and preleukaemia. *Clin. Lab. Haematol.* **21**, 17–20 (1999).
77. Hes, O. *et al.* End-stage kidney disease: Gains of chromosomes 7 and 17 and loss of Y chromosome in non-neoplastic tissue. *Virchows Arch.* **453**, 313–319 (2008).
78. Popli, R., Sahaf, B., Nakasone, H., Lee, J. Y. Y. & Miklos, D. B. Clinical impact of H-Y alloimmunity. *Immunologic Research* **58**, 249–258 (2014).
79. George, S., Pili, R., Carducci, M. A. & Kim, J. J. Role of immunotherapy for renal cell cancer in 2011. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network* **9**, 1011–1018 (2011).

## 8. Abkürzungsverzeichnis

BHD	Birt-Hogg-Dubé
Abb.	Abbildung
ca.	Zirka
ccRCC	Clear cell renal cell carcinoma, klarzelliges Nierenzellkarzinom
cctpRCC	Clear cell (tubulo-) papillary renal cell carcinoma, klarzellig-(tubulo)papilläres Nierenzellkarzinom
CGH	Comperative genomic hybridization
chRCC	Chromophobe renal cell carcinoma, chromophobes Nierenzellkarzinom
cm	Centimeter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes H <sub>2</sub> O, destilliertes Wasser
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
H-Y- Alloantigen	Histokompatibilität-Y-Alloantigen
ISUP	International society of urological pathology
mm	Millimeter
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
P	P-Wert, Signifikanz
Ph	Ph-Wert
pRCC	papillary renal cell carcinoma, papilläres Nierenzellkarzinom
PTHrP	Parathyroid hormone-related Protein
RCC	Renal cell Carcinoma, Nierenzellkarzinom
SD	Standardabweichung
SEM	Standard error of the mean
SSC	Sodium/ Sodium citrate, Natrium/ Natriumcitrat
TMA	Tissue-Mikroarray
VHL	Von-Hippel-Lindau
WHO	World Health Organisation
X-Signal	X-Chromosom-Centromersignal
Y-Signal	Y-chromosom-Centromersignal

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klarzelliges Nierenzellkarzinom

Abbildung 2: Papilläres Nierenzellkarzinom

Abbildung 3: Onkozytom

Abbildung 4: Chromophobes Nierenzellkarzinom

Abbildung 5: Klarzellig-(tubulo)papilläres Nierenzellkarzinom

Abbildung 6: Beispiele der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Abbildung 7: Y-Verlust und Patientenprognose in allen Patienten

Abbildung 8: Y-Verlust und Prognose in Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Abbildung 9: Y-Verlust und Prognose in Patienten mit papillären Nierenzellkarzinomen

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genetische Veränderungen in Nierenzellkarzinomen

Tabelle 2: Zusammensetzung des männlichen Patientenkollektiv Nierentumor-Gewebe-Mikroarray (TMA)

Tabelle 3: Gewebemikroarray, Reagenzien, Kits, Material und Geräte

Tabelle 4: Y-Verlust und histologische Subtypen der Nierenzellkarzinome

Tabelle 5: Y-Verlust und klinisch-pathologische Parameter

Tabelle 6: Y-Verlust und Tumorgroße

Tabelle 7: Y-Verlust und Patientenalter

## **11. Lebenslauf**

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

## **12. Danksagung**

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Prof. Dr. Guido Sauter für die Möglichkeit, am Institut für Pathologie zu promovieren.

Ich bedanke mich besonders bei Herrn PD Dr. R. Simon und Frau Dr. M. Kluth für die äußerst freundliche Aufnahme und ihre großzügige und konstruktive Betreuung.

Weiterhin richtet sich mein Dank an Frau Dr. med. Franziska Büscheck und Herrn Dr. med. Christoph Fraune, die mich mit ihrer fachlichen Kompetenz bereitwillig bei dieser Arbeit unterstützt haben sowie an die technischen Angestellten und Doktoranden des Instituts, die mir bei dieser Arbeit stets sehr behilflich waren.

Ebenso möchte ich meiner Familie danken, die mich im Rahmen des Studiums begleitet und moralisch unterstützt haben.

### **13. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....