

# **Das Nierenzellkarzinom: Etablierung und Validierung von Primärzellkulturen als *in vitro*-Modell zur Patienten-individualisierten Therapietestung**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Adrian Georg Simon**

aus Berlin  
2021

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Marieta Ioana Toma
2. Gutachter: PD Dr. med. Stefan Hauser

Tag der Mündlichen Prüfung: 5. Oktober 2021

Aus dem Institut für Pathologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

Gewidmet meiner Familie,  
dem Zirkel,  
Maria  
und Rainer Vogt



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	6
<b>1. Deutsche Zusammenfassung</b>	7
1.1 Einleitung .....	7
1.2 Material und Methoden .....	11
1.3 Ergebnisse .....	15
1.4 Diskussion .....	18
1.5 Zusammenfassung .....	22
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung .....	23
<b>2. Veröffentlichung</b>	29
Abstract .....	30
Introduction .....	30
Materials and methods .....	31
Results .....	33
Discussion .....	37
References .....	38
Affiliations .....	39
<b>3. Anhang</b>	41
3.1 Histopathologische Parameter der kultivierten Nierenzellkarzinome (Supplementary file 1) .....	41
3.2 Immunhistochemische Antikörper (Supplementary file 2) .....	43
3.3 RNA-Sequenzierung: Gene (Supplementary file 4 und 6) .....	44
3.4 Primer für die <i>VHL</i> -Sequenzierung (Supplementary file 5) .....	58
<b>4. Danksagung</b>	59
<b>5. Lebenslauf</b>	60

## Abkürzungsverzeichnis

2-DG	2-Desoxy-D-Glukose
AMACR	alpha-Methylacyl-CoA-Racemase
CA9	Carboanhydrase 9
CD10/CD117	Cluster of differentiation 10/117
CK7	Zytokeratin 7
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DSRM	Definiertes Serum-reduziertes Medium
FBS	Fetales Kälberserum
FGF-b	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
G	Tumorgrad
ISUP	International Society of Urological Pathology
NEAA	Nicht-essenzielle Aminosäuren
NZK	Nierenzellkarzinom
- kNZK	- klarzelliges Nierenzellkarzinom
- pNZK	- papilläres Nierenzellkarzinom
- chNZK	- chromophobes Nierenzellkarzinom
PFA	Paraformaldehyd
pT	Tumorstatus nach TNM-Klassifikation, pathologisch bestätigt
rhEGF	rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Zellmedium
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
UICC	Union international contre le cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL(-Gen)	Von-Hippel-Lindau-Gen

## 1. Deutsche Zusammenfassung

### 1.1 Einleitung

Die Erforschung des Nierenzellkarzinoms (NZK) und die Herausforderungen seiner Therapie stehen seit Jahrzehnten im Fokus der Urologie und Onkologie. In dieser Arbeit wurden Primärzellkulturen diverser Nierenzellkarzinome etabliert: Ziel war es, neben dem klarzelligen Nierenzellkarzinom auch seltene histologische Subtypen zu kultivieren und anschließend zu evaluieren, inwiefern die individuellen, aus Patientengewebe kultivierten Zellen dem ursprünglichen Tumorgewebe entsprechen. Anschließend stand das Ansprechen der Zellkulturen gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), allein und kombiniert mit 2-Desoxy-D-Glukose (2-DG), im Vordergrund, um die patienten-individuelle Resistenz der Tumorzellen gegenüber einer Inhibierung der Glykolyse als potenziellen therapeutischen Ansatz zu testen.

#### 1.1.1 Das Nierenzellkarzinom

Mit mehr als 400.000 Erkrankungen weltweit im Jahr 2018 und mehr als 175.000 Todesfällen macht das NZK weltweit etwas mehr als 2 % aller Krebserkrankungen aus (Padala et al., 2020). In Deutschland war das NZK im Jahr 2016 mit 14640 Neuerkrankungen und 5354 Todesfällen bei Männern das neunthäufigste Tumorleiden, bei Frauen stand es auf Platz 11. Männer waren etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2019). Unter dem Begriff Nierenzellkarzinom werden nach der WHO-Klassifikation 2016 diverse maligne Tumoren zusammengefasst, die sich in histopathologischen, epidemiologischen, genetischen sowie therapeutischen Aspekten deutlich unterscheiden. Die drei häufigsten Subtypen sind das klarzellige Nierenzellkarzinom (kNZK) mit je nach Literatur bis zu 85 % aller NZK, das papilläre Nierenzellkarzinom (pNZK) mit etwa 10 - 20 % und das chromophobe Nierenzellkarzinom (chNZK) mit etwa 5 %, benannt nach der charakteristischen Histologie (Akthar et al., 2018; Moch et al., 2016; Inamura, 2017). Die Prognose des NZK ist abhängig vom Tumorstadium: Lag das 5-Jahres-Überleben 2015 bei 94 - 95 % (Männer und Frauen) für das UICC Stadium I, so betrug es für das Stadium III bereits nur noch 72 % (Männer) bzw. 74 % (Frauen) und in Stadium IV nur noch 14 % (Männer) bzw. 17 % (Frauen) (Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2019). Bei lokal

begrenztem Tumor wird, sofern möglich, eine partielle Nephrektomie gegenüber der radikalen totalen Nephrektomie bevorzugt: Hier zeigten sich bei ähnlichen onkologischen Ergebnissen (5-Jahres-Überleben und 10-Jahres-Überleben, krebsspezifisches Überleben) eine bessere postoperative Lebensqualität und länger erhaltene Nierenfunktion (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie), 2020; MacLennan et al., 2012b; MacLennan et al., 2012a). Die Behandlungsoptionen fortgeschrittener oder metastasierter NZK sind aufgrund ihrer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Radiotherapie limitiert. Die bisher veröffentlichten Studien und Therapieleitlinien unterliegen einem ständigen Wandel und erzielen nach wie vor wenig zufriedenstellende Ergebnisse: Aktueller Therapiestandard des metastasierten NZK sind Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab oder Avelumab, kombiniert mit zielgerichteten Therapeutika wie TKI (z.B. Axitinib, Pazopanib und Cabozantinib). Bei Therapieversagen folgt eine individuelle Sequenz von Therapeutika, in der Regel ebenfalls bestehend aus Immuncheckpoint-Inhibitoren oder TKI (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie), 2020; Motzer et al., 2019; Rini et al., 2019; Motzer et al., 2018).

### 1.1.2 Dysregulationen des Stoffwechsels im Nierenzellkarzinom

Für das klarzellige Nierenzellkarzinom besonders charakteristisch ist die Mutation des *Von-Hippel-Lindau-Gens (VHL)* (in bis zu 90 % der Fälle), welche über die Dysregulation der HIF1 $\alpha$ /HIF2 $\alpha$ -Hypoxie-Kaskade im Tumorgewebe eine pseudo-hypoxische Reaktion mit weitreichenden Folgen hervorruft: So weisen *VHL*-mutierte kNZK als Reaktion auf die Pseudohypoxie eine Steigerung der Angiogenese und der Glykolyse auf (Linehan et al., 2019). Gerade die Dysregulation der Glykolyse ist so charakteristisch, dass sie unter der Bezeichnung des Warburg-Effekts in den Fokus umfassender wissenschaftlicher Untersuchung gerückt ist und zudem als mögliches therapeutisches Ziel Gegenstand diverser Studien geworden ist (Choueiri und Kaelin, 2020; Srinivasan et al., 2015; Shuch et al., 2013; Chan et al., 2011). Auch für das papilläre NZK (insbesondere Typ 2) ist eine fehlregulierte Glykolyse charakteristisch, wohingegen das chromophobe NZK besonders häufig eine Dysregulation von Genen der oxidativen Phosphorylierung aufweist (Ricketts et al., 2018). Als Konsequenz standen die alternierte Expression von VEGF-basierten

Signalwegen und die gesteigerte Glykolyse im NZK auch im Fokus dieser Arbeit und wurden *in vitro* gezielt inhibiert.

### 1.1.3 Primärzellkulturen in der biomedizinischen Forschung

Die Repräsentativität von Zelllinien *in vitro* im Vergleich zum Tumor *in vivo* gibt seit langem Anlass zu Diskussion: Besonders immortalisierte Zelllinien menschlicher Tumoren sind umfangreich charakterisiert worden und weisen nach zahlreichen Passagen, verglichen mit dem Tumor *in vivo*, deutliche Unterschiede in der Genexpression, im Zellmetabolismus und der Mikroumgebung auf (Geraghty et al., 2014; Hughes et al., 2007). Als schnelles, einfaches und nahezu unbegrenzt verfügbares Modell werden sie dennoch in den meisten Laboren als Grundlage verschiedener Experimente genutzt (Masters, 2000). In der Erforschung des Nierenzellkarzinoms sind immobilisierte, kommerzielle Zelllinien seit Jahrzehnten in Nutzung. Die Unterschiede zu Tumoren *in vivo* sind jedoch gravierend: Mithilfe von Datensätzen des The-Cancer-Genome-Atlas (TCGA) konnte gezeigt werden, dass mit steigender Passagenzahl kommerzielle Zelllinien im Median mehr Mutationen aufwiesen als ein dem histologischen Subtyp entsprechender Tumor *in vivo* und zudem bei einigen Zelllinien die Zuordnung zum ursprünglichen Subtyp nicht mehr eindeutig erfolgen kann (Sinha et al., 2017).

Primärzellkulturen hingegen, die direkt aus dem Tumorgewebe kultiviert und nur für wenige Passagen in Kultur gehalten werden, unterliegen aufgrund der kürzeren Zeit unter Kulturbedingungen weniger genetischen und metabolischen Alterationen und stellen daher ein repräsentativeres, wenn auch kein perfektes *in vitro*-Modell dar (Gillet et al., 2013; Geraghty et al., 2014). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Primärzellkulturen ihre klonale Heterogenität über mehrere Passagen beibehalten können, im Gegensatz zu vielfach passagierten kommerziellen Zelllinien, in denen sich meist ein Zell-Klon durchgesetzt hat (Bolck et al., 2019).

### 1.1.4 Zielsetzungen dieser Arbeit

Aufgrund der Resistenz gegen Bestrahlung und konventionelle Chemotherapeutika stellt das Nierenzellkarzinom nach wie vor, besonders in inoperablem oder metastasiertem Stadium, eine große Herausforderung in der Behandlung dar. Neue, auch Patienten-individualisierte Therapieansätze sind dringend vonnöten. Um ein Modell zur Entwicklung

neuer therapeutischer Ansätze zu generieren, war das erste Ziel der vorliegenden Arbeit (und der mit ihr im Zusammenhang stehenden Publikation) die Erstellung von Primärzellkulturen aus Patientengewebe unmittelbar nach chirurgischer Resektion. Insbesondere sollten auch Primärzellkulturen von selteneren histologischen Subtypen des NZK etabliert werden. Im zweiten Schritt dieser Arbeit wurden die Primärzellkulturen validiert, um ihre Nähe zum Ursprungsgewebe und damit ihre Repräsentativität beurteilen zu können. Hierzu wurden immunhistochemische Methoden sowie Exon-Sequenzierung des *VHL*-Gens und RNA-Sequenzierung angewandt. Im letzten Abschnitt der Arbeit wurden die Primärzellkulturen mit einem experimentellen Therapeutikum, dem Glukoseinhibitor 2-Deoxy-D-Glukose, allein oder in Kombination mit bereits therapeutisch verwendeten Tyrosinkinase-Inhibitoren, behandelt: Ziel war es, einerseits die Eignung des etablierten *in vitro*-Modells für wissenschaftliche Experimente zu evaluieren und andererseits die spezifisch im NZK gesteigerte Glykolyse als möglichen therapeutischen Angriffspunkt zu untersuchen.

## 1.2 Material und Methoden

### 1.2.1 Patientenkollektiv

Alle Patienten befanden sich von 2017 bis 2020 in medizinischer Behandlung in der Klinik und Poliklinik für Urologie am Universitätsklinikum Bonn. Die Ethikkommission bewilligte die Experimente an dem entnommenen Nierenpräparaten (17.8.2017, EK 219/17). Insgesamt wurden 35 Patientenproben eingeschlossen, 23 Patienten (65,71 %) waren männlich, 12 (34,29 %) weiblichen Geschlechts. Das mediane Alter lag zum Zeitpunkt der operativen Entnahme bei 66 Jahren (Spannweite 47 bis 87 Jahre). Es wurden 22 kNZK, sechs pNZK und vier chNZK kultiviert, des Weiteren ein beniges Onkozytom und zwei retroperitoneale Metastasen zweier kNZK. Ein Tumor (kNZK17) war mittels Sunitinib und Nivolumab neoadjuvant vorbehandelt worden und in fortgeschrittenem Tumorstadium (ypT3).

### 1.2.2 Etablierung von Primärzellkulturen

Alle Nährmedien und Reagenzien, wenn nicht anders angegeben, wurden von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen. Alle Weblinks zu verwendeten Internetressourcen waren zum Zeitpunkt der Dissertation aktuell und wurden vor Einreichen der Endfassung überprüft.

Die Tumoren sowie beniges Nierengewebe wurden in DPBS gewaschen, mittels Skalpells in kleinstmögliche Fragmente zerteilt und in 10 mL Verdaulösung (RPMI 1640 mit 2 % Penicillin, 250 U/mL Kollagenase II, 100 U/mL Hyaluronidase V, 37 °C) überführt. Der Verdau des Gewebes erfolgte über zwei Stunden in einem Wasserbad bei 37 °C und 100-150 rounds per minute (rpm). Anschließend wurden die Zellen durch einen 70 µm-, dann durch einen 40 µm-Filter (VWR International (Radnor, USA)) filtriert, die Zelllösung bei 800 rpm zentrifugiert (8 min) und das Zellpellet mehrfach mit DPBS gewaschen. Zuletzt wurde das Zellpellet je nach Zellkulturflasche in 10 bis 25 mL Nährmedium überführt. Als Nährmedium wurde ein definiertes Serum-reduziertes Medium (DSRM) etabliert: DMEM/F12-Medium mit 5 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 ng/mL rhEGF (R&D Systems, Minneapolis, USA) 10 ng/mL FGF-b (ReproTech, Hamburg), B27 (1x), Lipid Mix 1 (1x), 1 mM N-Acetyl-Cystein, 4mM L-Glutamin, NEAA (1x), 10 mM HEPES-Puffer (GE Healthcare, Chicago, USA). Eine Zelldichte von 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> wurde für

die Kultivierung gewählt. Alle Zellkulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte alle drei bis vier Tage. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 80 % mittels Trypsin-EDTA in einem Verhältnis von 1:6 passagiert. Kulturen, die nach 30 Tagen (Tumor) bzw. 20 Tagen (benignes Gewebe) keine Konfluenz erreicht hatten, wurden als Wachstumsarrest gewertet und verworfen. Die Primärzellkulturen wurden alle zwei Wochen mittels PCR auf eine Kontamination mit Mykoplasmen getestet.

#### 1.2.3 Immunhistochemische Verifizierung der Primärzellkulturen

Zur Verifizierung der Herkunft der Zellen wurden diese den Herstellerangaben folgend in einen Richard-Allan Scientific HistoGel-Block überführt. Der Zellblock wurde in 4 % PFA fixiert, zertrennt und in eine Einbettkassette überführt. Die Paraffinierung und Anfärbung erfolgten nach Protokollen des RoutineLabors am Institut für Pathologie. Die Färbungen für CD10, CD117 und AMACR wurden auf dem Ventana BenchMark Ultra Autostainer (Ventana-Roche, Tucson, USA) durchgeführt (Antikörperliste siehe Supplementary file 2 in Simon et al., 2020 Anhang 3.2), als Sekundärantikörper wurden das OV HRP Multimer oder UltraView-HRP-Universal Mutimer-System von Roche, als Färbemittel das DAB-OptiView-Detektionssystem bzw. das DAB-UltraView-Detektionssystem mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet (Hoffmann – La Roche (Basel, Schweiz)). Die Färbungen von PAX8, Vimentin, CA9 und CK7 erfolgten an einem Medac Autostainer 480S (Medac (Wedel)) mit einem C-DPVB-HRP-500-Mutimer-Detektionssystem (Medac (Wedel)) als Sekundärantikörper.

#### 1.2.4 Sanger-Sequenzierung des *VHL*-Gens

Zur Sanger-Sequenzierung des *VHL*-Gens wurde aus 10-25 mg Tumorgewebe sowie den daraus abgeleiteten Primärzellkulturen DNA gewonnen (Qiamp DNA Minikit (Qiagen (Hilden))). Die drei Exons (Exon 1, Exon 2 und Exon 3) des *VHL*-Gens wurden amplifiziert, wobei die Fast Start Taq Polymerase (Hoffmann – La Roche (Basel, Schweiz)) verwendet wurde. Nach erfolgter PCR und Kontrolle der Bandenlänge auf 2 % Agarose-Gel wurden die DNA-Proben mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean UP-Kit (Macherey-Nagel (Düren)) aufgereinigt. Die amplifizierten Exons des *VHL*-Gens wurden zur Sequenzierung an GATC (Eurofins Scientific (Luxemburg)) geschickt (Service-Option „LightRun Tube“, Primer siehe Supplementary file 5 in Simon et al., 2020, Anhang 3.4). Alle Exons wurden

doppelt sequenziert (Sense, Anti-Sense), um vorhandene Mutationen zu verifizieren. Die Auswertung der Sanger-Sequenzen erfolgte mittels ApE Plasmid Editor (<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>) und FinchTV (Geospiza Inc. (Seattle, USA)). Die Mutationen wurden im Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) hinsichtlich der Datenlage und der Pathogenität überprüft. Außerdem wurde geprüft, ob die Mutation sowohl in Tumorgewebe als auch der daraus abgeleiteten Primärzellkultur vorlag.

#### 1.2.5 RNA-Sequenzierung

Für Genexpressionsanalysen mittels RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) wurde aus 10-25 mg Tumorgewebe RNA extrahiert, verwendet wurde das Universal Purification Kit (Roboklon (Berlin)). Die RNA-Sequenzierung erfolgte in der Next Generation Sequencing Core Facility am Uniklinikum Bonn. Die Auswertung der Rohdaten sowie die Identifizierung der hoch- oder herunterregulierten Gene erfolgte mittels R und den Software-Paketen Bioconductor software package DESeq2 und ggplot2 (siehe Simon et al., 2020, *materials and methods* S. 31). Die abweichend exprimierten Gene wurden mittels der Enrichr-Datenbank (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) biologischen Prozessen, Signalwegen und Zelfunktionen zugeordnet und mittels Gimp Software visualisiert (<https://www.gimp.org/>). Als korrespondierende Datenbanken wurden WikiPathways 2019 Human sowie Gene Ontology Biological Process 2018 verwendet. Ein Gen galt als herauf- bzw. herunterreguliert, wenn die Fold Change log<sub>2</sub> (1,0) bzw. log<sub>2</sub> (-1,0) betrug. Ein p-Wert von  $p \leq 0,05$  (nach Bonferroni-Korrektur) wurde als signifikant gewertet.

#### 1.2.6 Behandlung der Primärzellkulturen mit TKI und 2-DG

Die Primärzellkulturen wurden mit den Tyrosinkinaseinhibitoren Axitinib, Cabozantinib und Pazopanib allein und in Kombination mit dem Glykolyseinhibitor 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) behandelt. Letzterer hemmt selektiv die Glucose-6-Phosphat-Isomerase und somit die aerobe Glykolyse. Hierzu wurden die Zellen mit einer Dichte von 1000/Well auf einer 96-Well-Platte (Sarstedt AG (Nümbrecht)) ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die medikamentöse Behandlung in Triplikaten mit zielgerichteten Therapeutika in aufsteigenden Konzentrationen. Die

behandelten Zellen wurden anschließend 72 h inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nach 72 Stunden wurden die Zellkulturen mit CellTiter Glo®-Puffer (Promega (Madison, USA)) versetzt. Die Lyse der Zellen wurde unter dem Durchlichtmikroskop geprüft. Anschließend erfolgte die Auswertung der Lumineszenz und der Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen mittels Excel (Microsoft (Redmond, USA)) und GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. (San Diego, USA)). Um zu bestätigen, dass nicht nur ein Rückgang der Lumineszenz, sondern tatsächlich eine Verringerung der Zellpopulation vorlag, wurde außerdem ein Crystal Violet-Viabilitätsassay angefertigt. Nach der Behandlung mit Tyrosinkinasehemmern über 72 Stunden (s.o.) wurden die Zellen mit Crystal Violet-Lösung (0,5 %) angefärbt. Die Auslesung der Farbabsorption erfolgte bei 570 nm. Wie beim CellTiter Glo®-Viabilitäts-Assay wurde die Absorption mit unbehandelten Kontrollen verglichen und ins Verhältnis gesetzt. Die grafische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism.

### 1.3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 22 kNZK, 6 pNZK, 4 chNZK und 2 retroperitoneale Metastasen klarzelliger Nierenzellkarzinome eingeschlossen. Zusätzlich wurden benignes Nierengewebe aus dem Kortex und ein Onkozytom kultiviert. Die meisten Primärzellkulturen der kNZK, pNZK und chNZK konnten vier- bis fünfmal passagiert werden, bevor ein Wachstumsarrest eintrat (Minimum 2 Passagen, Maximum 14 Passagen). In drei Primärzellkulturen des kNZK (kNZK4, kNZK7, kNZK9) und in den Zellkulturen der retroperitonealen Metastasen wurde bereits in frühen Passagen ein starkes Wachstum von Fibroblasten mikroskopisch beobachtet. Die Kontamination wurde immunhistochemisch bestätigt (s.u.), diese Zellkulturen wurden verworfen. Das Onkozytom wurde nach immunhistochemischer Identifikation und somit Sicherung der Benignität (s.u.) ebenfalls nicht weiter kultiviert. Von allen 32 NZK konnten erfolgreich Primärzellkulturen des angrenzenden benignen Nierengewebes etabliert werden (100 %). Diese Zellkulturen konnten mindestens 14-mal passagiert werden, ein Wachstumsarrest trat nicht ein.

Analog zu ihrem Ursprungsgewebe exprimierten die Primärzellkulturen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms in 19 von 22 Fällen (86,4 %) PAX8 als epithelialen Marker sowie CD10 (18 von 22, 81,8 %) und/oder CA9 (18 von 22, 81,8 %) als Tumormarker des klarzelligen Nierenzellkarzinoms. In 3 der 22 Primärzellkulturen des kNZK (13,6 %) (kNZK4, kNZK7, kNZK9) wurde lediglich Vimentin exprimiert, die Kulturen waren negativ für PAX8, CD10 und CA9. Diese Zellkulturen zeigten zusätzlich mikroskopisch eine Fibroblastenkontamination und wurden daher verworfen. Insgesamt war somit die Kultivierung von 19 kNZK (86,4 %) erfolgreich. Alle sechs Zellkulturen des pNZK exprimierten PAX8, Vimentin, CK7 und AMACR, alle vier Zellkulturen des chNZK neben PAX8 und Vimentin zusätzlich c-kit (CD117) und CK7, jeweils analog zu ihrem Ursprungsgewebe. Die Zellkulturen des Onkozytoms exprimierten PAX8 und c-kit, jedoch kein CK7, die Kulturen des benignen renalen Gewebes PAX8 als Hinweis auf ihren renal-epithelialen Ursprung.

Aus sieben immunhistochemisch bestätigten Primärzellkulturen des kNZK sowie dem Ursprungsgewebe wurde DNA extrahiert. Die drei Exons des *VHL*-Gens wurden sequenziert. Vier der sieben kNZK wiesen Mutationen des *VHL*-Gens auf (siehe

Originalpublikation Simon et al., 2020, Table 2, *Results*, S. 35). Diese Mutationen konnten ebenfalls in der daraus abgeleiteten Zellkultur nachgewiesen werden. Die drei anderen kNZK wiesen einen *VHL*-Wildtyp auf, der sich auch in den Zellkulturen wiederfand. Es konnte somit bestätigt werden, dass die sieben Primärzellkulturen des kNZK nicht nur immunhistochemisch die für diesen Tumor typischen Gewebe- und Tumormarker exprimierten, sondern auch den gleichen *VHL*-Status aufwiesen wie ihr Ursprungsgewebe und somit von diesem abstammen. Die heterozygote Mutation in kNZK2 sowie die homozygote Mutation in kNZK wurden bereits in der COSMIC-Datenbank beschrieben und werden als pathogen eingestuft. Die in kNZK3 und kNZK5 gefundenen Mutationen (Exon 2a: p.N141fs25/+; Exon 1: p.I75del/+) wurden in dieser Arbeit nach Wissen des Autors erstmals entdeckt und beschrieben.

Das Gewebe von sieben kNZK wurde mittels RNA-Sequenzierung analysiert und die Ergebnisse mit der Enrichr-Datenbank (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) abgeglichen, um aberrante Signalwege im Tumorgewebe zu erfassen. Als Kontrolle diente die ebenfalls sequenzierte RNA des benignen Nierengewebes. Ein Abgleich mit der WikiPathways 2019 Human – Datenbank ergab eine Hochregulation des HIF1-Signalweges, des Cori-Zyklus, der Glykolyse sowie der Gluconeogenese (siehe Originalpublikation Simon et al., 2020, Figure 3 B und C, S.35), eine reduzierte RNA-Expression, verglichen mit benignem Gewebe, wurde für Gene der mitochondrialen Atmungskette und der extrazellulären Matrix-Organisation beobachtet (siehe Originalpublikation: Simon et al., 2020, Figure 3 B und C, S. 35).

Nach Verifizierung der Primärzellkulturen wurden diese mit den Tyrosinkinaseinhibitoren Axitinib (AXT), Pazopanib (PZP) und Cabozantinib (CBZ) behandelt, allein und kombiniert mit dem Glykolyse-Inhibitor 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG). Die Primärzellkulturen der Nierenzellkarzinome reagierten sehr individuell auf die Behandlung mit TKI und 2-DG, auch zwischen den einzelnen histologischen Subtypen wurden große Unterschiede hinsichtlich der Reaktion auf die Behandlung beobachtet.

Die Primärzellkulturen der kNZK zeigten im CellTiter Glo-Assay ( $n = 8$ ) besonders nach Behandlung mit CBZ einen Rückgang der Lumineszenz und somit der ATP-Produktion, in höheren Konzentrationen auch mit AXT oder PZP (bei 40  $\mu\text{M}$  bzw. 80  $\mu\text{M}$ ) (siehe Originalpublikation Simon et al., 2020, Figure 4, S. 36). Eine zusätzlich reduzierte ATP-

Lumineszenz nach Zugabe von 2-DG zeigte sich besonders in niedrigen Dosen bei Behandlung mit PZP. Das Crystal Violet-Viabilitätsassay ( $n = 5$ ) bestätigte, dass mit einer reduzierten ATP-Lumineszenz tatsächlich eine verminderte Zell-Viabilität einherging. Es zeigten sich auch in diesem Assay stark individuelle Unterschiede in der Reaktion auf die einzelnen Tyrosinkinaseinhibitoren. Ein besonders starker Rückgang der Viabilität wurde, wie auch im CellTiter-Glo-Assay impliziert, bei der Behandlung mit CBZ beobachtet (siehe Originalpublikation Simon et al., 2020, Figure 5, S. 37). Das neoadjuvant vorbehandelte Nierenzellkarzinom kNZK17 (Sunitinib und Nivolumab) zeigte *in vitro* ein gutes Ansprechen auf AXT und CBZ. Eine Wirkungsverstärkung der TKI durch 2-DG war für diesen Tumor jedoch nicht ersichtlich.

Die Primärzellkulturen des papillären Nierenzellkarzinoms pNZK5 reagierten unter Behandlung mit AXT oder PZP mit einer weiteren Reduktion der Zellpopulation, wenn 2-DG zusätzlich verabreicht wurde (siehe Originalpublikation Simon et al., 2020, Figure 4, S. 36). CBZ war in allen Konzentrationen höchst effektiv, eine zusätzliche Abnahme der Viabilität unter Zugabe von 2-DG zeigte sich nicht.

Primärzellkulturen der chromophoben Nierenzellkarzinome ( $n = 4$ ) reagierten ebenfalls variabel auf die Behandlung mit TKI. Der effektivste Rückgang der Viabilität zeigte sich für AXT oder CBZ (siehe Originalpublikation Simon et al., 2020, Figure 4, S. 36). Sensitivierende Tendenzen mit 2-DG wurden bei der Behandlung mit AXT oder PZP beobachtet. Aufgrund der geringen Fallzahlen wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

## 1.4 Diskussion

Als erster Schritt dieser Arbeit wurden Primärzellkulturen verschiedener NZK erfolgreich etabliert. Das in der Literatur beschriebene Vorgehen hierfür ist, ebenso wie für die Verifizierung der Primärzellkulturen, nicht einheitlich. Erfolgreich kultiviert wurden 19 von 22 kNZK (86,4 %) sowie alle sechs pNZK (100 %) und alle vier chNZK (100 %). Bolck et al. gelang die Kultivierung von 20 der 26 eingeschlossenen kNZK (77 %), Lobo et al. erreichten mit Optimierung ihrer Protokolle eine Erfolgsquote von 84,6 %, Bianchi et al. konnten 73 % aller eingeschlossenen NZK erfolgreich kultivieren (Bolck et al., 2019; Lobo et al., 2016; Bianchi et al., 2010). Das in dieser Arbeit etablierte Protokoll ist somit mindestens vergleichbar, wenn nicht sogar effektiver als in anderen Publikationen vorgestellte Verfahren. Besonders hervorzuheben ist, dass besonders das seltene papilläre und chromophobes NZK mit hoher Effizienz kultiviert werden konnten.

In der Literatur finden sich kaum Publikationen, die seltene histologische Subtypen des NZK einschließen, in der Regel aus Mangel an verfügbarem Gewebe. In den wenigen Studien, die papilläre oder chromophobe NZK kultivierten, blieb eine genauere Verifizierung der Primärzellkulturen aus: Krawczyk et al. etablierten ohne nähere Angabe von Anzahl und Erfolgsrate Zellkulturen des pNZK, der Forschungsschwerpunkt lag jedoch in der Interaktion mit Immunzellen im Tumorgewebe, weswegen keine Rückschlüsse auf die Effektivität ihres vorgestellten Verfahrens möglich sind (Krawczyk et al., 2017). Andere Studien kultivierten ebenfalls papilläre und gelegentlich sogar chromophobe NZK, genauere Charakterisierungen der Primärzellkulturen sind jedoch nicht beschrieben, da sie ebenfalls nicht Forschungsschwerpunkt waren (Baldan et al., 2015; Valente et al., 2011; Bianchi et al., 2010; Perego et al., 2005). Die hier vorliegende Arbeit ist somit eine der wenigen, in der auch die selteneren papillären und chromophoben NZK nicht nur eingeschlossen, sondern auch immunhistochemisch *in vitro* ausführlich verifiziert werden. Dies bekräftigt neben der Effizienz des Protokolls seinen Wert bei der Validierung der Zellkulturen.

Um die Abstammung der Zellkulturen vom Tumorgewebe nachzuweisen, wurden Gewebe wie Zellkultur immunhistochemisch angefärbt: Dabei wurde PAX8 als Marker für den renal-epithelialen Ursprung der Zellen gewählt (Tong et al., 2009; Bouchard et al., 2002).

Die Expression von CD10, CA9 und Vimentin weist zusätzlich auf die Abstammung vom kNZK hin (Avery et al., 2000; Tostain et al., 2010). Eine einzelne Publikation, die über eine erfolgreiche Anzüchtung papillärer Nierenzellkarzinome berichtete, nutzen Vimentin, CK7 und CD10 zur Verifizierung der Zellkulturen (Krawczyk et al., 2017; Skinnider et al., 2005). In dieser Arbeit wurde anstatt CD10 die alpha-Methylacyl-CoA-Racemase (AMACR) gewählt, die ebenfalls, nach Griffin und Lin sogar häufiger als CD10, von den meisten pNZK exprimiert wird (Griffin und Lin, 2020). Hiermit konnten alle sechs Primärzellkulturen des pNZK verifiziert werden. Für Verifizierungen von Zellkulturen des chNZK konnten keine Publikationen gefunden werden. Wir wählten PAX8 sowie c-kit (CD117) und CK7, die als Marker des chNZK beschrieben sind (Zhao et al., 2015; Huo et al., 2005).

Aus sieben kNZK und den daraus abgeleiteten Primärzellkulturen wurden die drei Exons des *VHL*-Gens sequenziert. In dieser Arbeit fanden sich bei vier der sieben untersuchten kNZK Mutationen im Ursprungsgewebe, die identisch in den Primärzellkulturen vorlagen. Die drei übrigen Tumoren sowie die daraus abgeleiteten Primärzellkulturen wiesen einen *VHL*-Wildtyp auf. Somit ist bewiesen worden, dass die Zellen *in vitro* nicht nur die immunhistochemischen Marker ihres Ursprungsgewebes, sondern auch dessen *VHL*-Status teilten. In der Literatur lässt sich dies nicht immer nachweisen: Bolck et al. berichteten, dass sich nur in 74 % der Fälle *VHL*-Mutationen im Tumorgewebe auch in den Primärzellkulturen wiederfinden ließen (Bolck et al., 2019). Lobo et al. beobachteten ebenfalls Abweichungen im *VHL*-Status zwischen Tumor und abgeleiteter Zellkultur, außerdem wurden zusätzliche chromosomale Alterationen nachgewiesen (Lobo et al., 2016).

Nicht alle 22 kNZK wurden in der hier vorliegenden Arbeit auf ihren *VHL*-Status untersucht, dennoch kann, gerade in Kombination mit dem Nachweis charakteristischer immunhistochemischer Tumormarker, von der Etablierung eines repräsentativen *in vitro*-Modells ausgegangen werden, in dem die Primärzellkulturen tatsächlich von ihrem korrespondierenden Tumorgewebe abstammen.

Die RNA-Sequenzierung der 7 kNZK ergab eine Hochregulation der für den klarzelligen Subtyp charakteristischen Signalwege, hierunter der HIF1-Signalweg und die aerobe Glykolyse: Auch in der Literatur wurden diese Aberrationen bereits in Patientenproben

sowie *in vitro* beobachtet: Lobo et al. berichteten, dass besonders Zellen mit Mutationen des *VHL*-Gens eine Hochregulation der *VHL*-assoziierten hypoxischen Signalachse sowie der Glykolyse aufwiesen. Außerdem konnte in dieser Studie ebenfalls eine Herunterregulation der mitochondrialen Zellatmung nachgewiesen werden (Lobo et al., 2016).

Die gesteigerte aerobe Glykolyse als potenzieller therapeutischer Angriffspunkt bei der Behandlung von NZK, besonders vom klarzelligen Subtyp, wird bereits in einigen Studien untersucht: Chan et al. wiesen in *VHL*-defizienten Zelllinien des kNZK ein reduziertes Wachstum bei Inhibition des GLUT1-Transporters nach, verglichen mit *VHL*-Wildtyp-Tumorzellen (Chan et al., 2011). Weitere Enzyme der Glykolyse wurden bereits als potenzielle Zielstrukturen identifiziert (Akins et al., 2018). 2-DG wurde erfolgreich in ersten experimentellen Ansätzen gegen Zelllinien des Prostatakarzinoms und Lymphom-Zellen *in vitro* eingesetzt, jeweils in Kombination mit anderen zielgerichteten Therapeutika (Yamaguchi et al., 2011). Diese Arbeit ist die erste Studie, in der neben klarzelligen auch papilläre und chromophobe NZK mit TKI und dem Glykolyse-Inhibitor 2-DG behandelt wurden.

Die Therapie fortgeschrittener NZK erfordert ein multimodales Vorgehen und stellt die behandelnden Mediziner vor große Herausforderungen. Alle Studien zu den auch in dieser Arbeit eingesetzten TKI Axitinib, Pazopanib und Cabozantinib implizieren ein äußerst individuelles Ansprechen ohne längerfristige Erfolge in der Behandlung: Nahezu alle Patienten, die mit TKI behandelt werden, entwickeln früher oder später Resistenzen gegen die eingesetzten Therapeutika, im Median bereits nach 6 bis 15 Monaten (Mantia und McDermott, 2019; Rini und Atkins, 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden sehr variable Behandlungserfolge *in vitro* mit TKI, allein und kombiniert mit 2-DG, bei den individuellen Zellkulturen beobachtet. Wenngleich als *in vitro*-Modell begrenzt repräsentativ für eine *in vivo*-Situation, unterstützten diese Ergebnisse jedoch auch den Ansatz der Patienten-individualisierten Therapie. Es konnte beispielsweise festgestellt werden, dass im Fall des mit Sunitinib und Nivolumab vorbehandelten klarzelligen Tumors kNZK17 ein Ansprechen auf den second-line-TKI Axitinib *in vitro* beobachtet werden konnte. Für diesen Tumor ließ sich kein zusätzlicher Behandlungseffekt mit 2-DG erzielen, was gerade bei Axitinib und Pazopanib häufiger zu beobachten war. Ebenfalls sprachen

die Zellen auf Cabozantinib an, was eine weitere Behandlungsmöglichkeit in diesem patientenspezifischen Fall ergeben könnte.

Aufgrund ihrer Seltenheit konnten in dieser Arbeit nur wenige papilläre und chromophobe NZK getestet werden. Größer angelegte experimentelle Studien mit mehr Patientenproben sind zwingend notwendig, um eine höhere Aussagekraft hinsichtlich ihres Ansprechens auf TKI und 2-DG zu erzielen: Gerade für die Behandlung fortgeschritten oder metastasierter papillärer und chromophober NZK ist die Datenlage unzureichend. Ebenso wenig existieren umfassende pharmakogenetische Daten zu Resistenzentwicklung dieser histologischen Subtypen, die sich in ihren genetischen Alterationen deutlich vom kNZK unterscheiden (Brodziak et al., 2019). Dies ist gerade auch deshalb problematisch, weil besonders im Angesicht der rasanten Entwicklung neuerer Therapeutika die Tumoren vom nicht-klarzelligen Typ vernachlässigt werden, obgleich diese bis zu 25 % aller NZK ausmachen (Inamura, 2017). Bisher werden metastasierte papilläre Nierenzellkarzinome wie klarzellige Nierenzellkarzinome behandelt, obgleich neuere Studien implizieren, dass dies weniger erfolgreich ist als die Behandlung des klarzelligen Subtyps, und somit dieser speziellen Tumorentität nicht gerecht werden könnte (Staehler et al., 2020; Goebell et al., 2018; Vaishampayan, 2018).

## 1.5 Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom stellt, besonders in fortgeschrittenem oder metastasiertem Stadium, die Medizin vor eine große Herausforderung. Einheitliche, auf umfangreichen Daten basierende Therapiestandards existieren bislang nur für das klarzellige Nierenzellkarzinom, die anderen histologischen Subtypen machen daher gerade in fortgeschrittenem und metastasiertem Stadium einen Patienten-individualisierten Therapieansatz erforderlich. In dieser Arbeit wurde ein repräsentatives und effektives *in vitro*-Modell zur Anzüchtung verschiedener Subtypen des Nierenzellkarzinoms etabliert und validiert: Immunhistochemische Expressionsanalysen sowie VHL-Sequenzierung und Mutationsabgleich im Fall des klarzellen Nierenzellkarzinoms konnten zeigen, dass die Primärzellkulturen die Tumoidentität des Ursprungsgewebes beibehielten. Diese Arbeit ist eine von wenigen Studien, die explizit auch papilläre und chromophobe Nierenzellkarzinome einschloss und diese immunhistochemisch umfassend validierte. Um das *in vitro*-Modell auf seine Funktionalität zu testen, wurden die Zellen mit Tyrosinkinase-Inhibitoren behandelt. Zusätzlich wurde die gesteigerte Glykolyse, ein Charakteristikum besonders des klarzellen Nierenzellkarzinoms, mit 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) gezielt inhibiert. Hierbei zeigten sich ein sehr variables Ansprechen der Primärzellen auf die verschiedenen Tyrosinkinaseinhibitoren, teils allein, teils kombiniert mit 2-DG. Da dies die bislang erste Studie ist, die auch seltene histologische Nierentumoren mit den oben genannten Therapeutika allein oder kombiniert *in vitro* behandelt und zudem eine recht geringe Fallzahl vorliegt, lassen sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit keine Empfehlungen für patienten-individuelle Therapiestandards ableiten. Die Ergebnisse unterstreichen jedoch die hohe Individualität der Nierenzelltumoren auch unter Zellkulturbedingungen und weisen auf die Notwendigkeit eines patientenzentrierten, individuellen Ansatzes bei Therapieentscheidungen hin. Größere Studien, die auch die molekularpathologischen Charakteristiken der verschiedenen histologischen Tumorsubtypen miteinschließen, sowie weiterführende *in vitro*-Experimente größerer Umfangs könnten es ermöglichen, für den zunächst individuellen Tumor des Patienten zukünftig eine optimale Behandlungsstrategie zu entwickeln. Somit könnte die Therapie der klarzellen Tumoren wie auch der ungewöhnlicheren Tumorentitäten künftig optimiert werden.

## 1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

- Akins NS, Nielson TC, Le HV. Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer. *Current topics in medicinal chemistry* 2018; 6: 494–504
- Akther M, Al-Bozom IA, Al Hussain T. Molecular and Metabolic Basis of Clear Cell Carcinoma of the Kidney. *Advances in Anatomic Pathology* 2018; 3: 189–196
- Avery AK, Beckstead J, Renshaw AA, Corless CL. Use of Antibodies to RCC and CD10 in the Differential Diagnosis of Renal Neoplasms. *The American Journal of Surgical Pathology* 2000; 11: 203–210
- Baldan V, Griffiths R, Hawkins RE, Gilham DE. Efficient and reproducible generation of tumour-infiltrating lymphocytes for renal cell carcinoma. *British journal of cancer* 2015; 9: 1510–1518
- Bianchi C, Bombelli S, Raimondo F, Torsello B, Angeloni V, Ferrero S, Di Stefano V, Chinello C, Cifola I, Invernizzi L, Brambilla P, Magni F, Pitto M, Zanetti G, Mocarelli P, Perego RA. Primary Cell Cultures from Human Renal Cortex and Renal-Cell Carcinoma Evidence a Differential Expression of Two Spliced Isoforms of Annexin A3. *The American Journal of Pathology* 2010; 4: 1660–1670
- Bolck HA, Corrò C, Kahraman A, Teichman A von, Toussaint NC, Kuipers J, Chiovaro F, Koelzer VH, Pauli C, Moritz W, Bode PK, Rechsteiner M, Beerewinkel N, Schraml P, Moch H. Tracing Clonal Dynamics Reveals that Two- and Three-dimensional Patient-derived Cell Models Capture Tumor Heterogeneity of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *European urology focus* 2019
- Bouchard M, Souabni A, Mandler M, Neubüser A, Busslinger M. Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes & Development* 2002; 16: 2958–2970
- Brodziak A, Sobczuk P, Bartnik E, Fiedorowicz M, Porta C, Szczylak C, Czarnecka AM. Drug resistance in papillary RCC: from putative mechanisms to clinical practicalities. *Nature Reviews Urology* 2019; 11: 655–673

Chan DA, Sutphin PD, Nguyen P, Turcotte S, Lai EW, Banh A, Reynolds GE, Chi J-T, Wu J, Solow-Cordero DE, Bonnet M, Flanagan JU, Bouley DM, Graves EE, Denny WA, Hay MP, Giaccia AJ. Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Science translational medicine* 2011; 94

Choueiri TK, Kaelin WG. Targeting the HIF2-VEGF axis in renal cell carcinoma. *Nature medicine* 2020; 10: 1519–1530

Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie). Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 2.0 2020

Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, Lovell-Badge R, Masters JRW, Meredith J, Stacey GN, Thraves P, Vias M. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British journal of cancer* 2014; 6: 1021–1046

Gillet J-P, Varma S, Gottesman MM. The clinical relevance of cancer cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 2013; 7: 452–458

Goebell PJ, Staehler M, Müller L, Nusch A, Scheffler M, Sauer A, Verschuer U von, Tech S, Kruggel L, Jänicke M, Marschner N. Changes in Treatment Reality and Survival of Patients With Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma - Analyses From the German Clinical RCC-Registry. *Clinical genitourinary cancer* 2018; 6: 1101-1115

Griffin BB, Lin X. Cytomorphologic analysis of clear cell papillary renal cell carcinoma: Distinguishing diagnostic features. *Cancer cytopathology* 2020

Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *BioTechniques* 2007; 5: 575, 577-578, 581-582

Huo L, Sugimura J, Tretiakova MS, Patton KT, Gupta R, Popov B, Laskin WB, Yeldandi A, Teh BT, Yang XJ. C-kit expression in renal oncocytomas and chromophobe renal cell carcinomas. *Human pathology* 2005; 3: 262–268

Inamura K. Renal Cell Tumors: Understanding Their Molecular Pathological Epidemiology and the 2016 WHO Classification. *International journal of molecular sciences* 2017; 10:

Krawczyk KM, Nilsson H, Allaoui R, Lindgren D, Arvidsson M, Leandersson K, Johansson ME. Papillary renal cell carcinoma-derived chemerin, IL-8, and CXCL16 promote monocyte recruitment and differentiation into foam-cell macrophages. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2017; 11: 1296–1305

Linehan WM, Schmidt LS, Crooks DR, Wei D, Srinivasan R, Lang M, Ricketts CJ. The Metabolic Basis of Kidney Cancer. *Cancer discovery* 2019; 8: 1006–1021

Lobo NC, Gedye C, Apostoli AJ, Brown KR, Paterson J, Stickle N, Robinette M, Fleshner N, Hamilton RJ, Kulkarni G, Zlotta A, Evans A, Finelli A, Moffat J, Jewett MAS, Ailles L. Efficient generation of patient-matched malignant and normal primary cell cultures from clear cell renal cell carcinoma patients: clinically relevant models for research and personalized medicine. *BMC cancer* 2016; 485–499

MacLennan S, Imamura M, Lapitan MC, Omar MI, Lam TBL, Hilvano-Cabungcal AM, Royle P, Stewart F, MacLennan G, MacLennan SJ, Canfield SE, McClinton S, Griffiths TRL, Ljungberg B, N'Dow J. Systematic Review of Oncological Outcomes Following Surgical Management of Localised Renal Cancer. *European urology* 2012a; 5: 972–993

MacLennan S, Imamura M, Lapitan MC, Omar MI, Lam TBL, Hilvano-Cabungcal AM, Royle P, Stewart F, MacLennan G, MacLennan SJ, Dahm P, Canfield SE, McClinton S, Griffiths TRL, Ljungberg B, N'Dow J. Systematic review of perioperative and quality-of-life outcomes following surgical management of localised renal cancer. *European urology* 2012b; 6: 1097–1117

Mantia CM, McDermott DF. Vascular endothelial growth factor and programmed death-1 pathway inhibitors in renal cell carcinoma. *Cancer* 2019; 23: 4148–4157

Masters JRW. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2000; 3: 233–236

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. *European urology* 2016; 1: 93–105

Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, Venugopal B, Kollmannsberger C, Negrier S, Uemura M, Lee JL, Vasiliev A, Miller WH, Gurney H, Schmidinger M, Larkin J, Atkins MB, Bedke J, Alekseev B, Wang J, Mariani M, Robbins

PB, Chudnovsky A, Fowst C, Hariharan S, Huang B, Di Pietro A, Choueiri TK. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 2019; 12: 1103–1115

Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, Plimack ER, Barthélémy P, Porta C, George S, Powles T, Donskov F, Neiman V, Kollmannsberger CK, Salman P, Gurney H, Hawkins R, Ravaud A, Grimm M-O, Bracarda S, Barrios CH, Tomita Y, Castellano D, Rini BI, Chen AC, Mekan S, McHenry MB, Wind-Rotolo M, Doan J, Sharma P, Hammers HJ, Escudier B. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 2018; 14: 1277–1290

Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *World journal of oncology* 2020; 3: 79–87

Perego RA, Bianchi C, Corizzato M, Eroini B, Torsello B, Valsecchi C, Di Fonzo A, Cordani N, Favini P, Ferrero S, Pitto M, Sarto C, Magni F, Rocco F, Mocarelli P. Primary cell cultures arising from normal kidney and renal cell carcinoma retain the proteomic profile of corresponding tissues. *Journal of proteome research* 2005; 5: 1503–1510

Ricketts CJ, Cubas AA de, Fan H, Smith CC, Lang M, Reznik E, Bowlby R, Gibb EA, Akbani R, Beroukhim R, Bottaro DP, Choueiri TK, Gibbs RA, Godwin AK, Haake S, Hakimi AA, Henske EP, Hsieh JJ, Ho TH, Kanchi RS, Krishnan B, Kwiatkowski DJ, Lui W, Merino MJ, Mills GB, Myers J, Nickerson ML, Reuter VE, Schmidt LS, Shelley CS, Shen H, Shuch B, Signoretti S, Srinivasan R, Tamboli P, Thomas G, Vincent BG, Vocke CD, Wheeler DA, Yang L, Kim WY, Robertson AG, Spellman PT, Rathmell WK, Linehan WM. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell reports* 2018; 1: 313-326

Rini BI, Atkins MB. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *Lancet Oncology* 2009; 10: 992–1000

Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, Pouliot F, Alekseev B, Soulières D, Melichar B, Vynnychenko I, Kryzhanivska A, Bondarenko I, Azevedo SJ, Borchiellini D, Szczylik C, Markus M, McDermott RS, Bedke J, Tartas S, Chang Y-H,

Tamada S, Shou Q, Perini RF, Chen M, Atkins MB, Powles T. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 2019; 12: 1116–1127

Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten. *Krebs in Deutschland 2015/2016* 2019

Shuch B, Linehan WM, Srinivasan R. Aerobic glycolysis: a novel target in kidney cancer. *Expert review of anticancer therapy* 2013; 6: 711–719

Simon AG, Esser LK, Ellinger J, Branchi V, Tolkach Y, Müller S, Ritter M, Kristiansen G, Muders MH, Mayr T, Toma MI. Targeting glycolysis with 2-deoxy-D-glucose sensitizes primary cell cultures of renal cell carcinoma to tyrosine kinase inhibitors. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2020; 9: 2255–2265

Sinha R, Winer AG, Chevinsky M, Jakubowski C, Chen Y-B, Dong Y, Tickoo SK, Reuter VE, Russo P, Coleman JA, Sander C, Hsieh JJ, Hakimi AA. Analysis of renal cancer cell lines from two major resources enables genomics-guided cell line selection. *Nature Communications* 2017; 1

Skinnider BF, Folpe AL, Hennigar RA, Lim SD, Cohen C, Tamboli P, Young A, Peralta-Venturina M de, Amin MB. Distribution of cytokeratins and vimentin in adult renal neoplasms and normal renal tissue: potential utility of a cytokeratin antibody panel in the differential diagnosis of renal tumors. *The American Journal of Surgical Pathology* 2005; 6: 747–754

Srinivasan R, Ricketts CJ, Sourbier C, Linehan WM. New strategies in renal cell carcinoma: targeting the genetic and metabolic basis of disease. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015; 1: 10–17

Staehler M, Goebell PJ, Müller L, Emde T-O, Wetzel N, Kruggel L, Jänicke M, Marschner N. Rare patients in routine care: Treatment and outcome in advanced papillary renal cell carcinoma in the prospective German clinical RCC-Registry. *International journal of cancer* 2020; 5: 1307–1315

Tong G-X, Yu WM, Beaubier NT, Weeden EM, Hamele-Bena D, Mansukhani MM, O'Toole KM. Expression of PAX8 in normal and neoplastic renal tissues: an immunohistochemical

study. Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc 2009; 9: 1218–1227

Tostain J, Li G, Gentil-Perret A, Gigante M. Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment. European journal of cancer 2010; 18: 3141–3148

Vaishampayan U. Evolving Treatment Paradigms in Non-clear Cell Kidney Cancer. Current treatment options in oncology 2018; 1

Valente MJ, Henrique R, Costa VL, Jerónimo C, Carvalho F, Bastos ML, Pinho PG de, Carvalho M. A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens. PloS one 2011; 5

Yamaguchi R, Janssen E, Perkins G, Ellisman M, Kitada S, Reed JC. Efficient elimination of cancer cells by deoxyglucose-ABT-263/737 combination therapy. PloS one 2011; 9

Zhao W, Tian B, Wu C, Peng Y, Wang H, Gu W-L, Gao F-H. DOG1, cyclin D1, CK7, CD117 and vimentin are useful immunohistochemical markers in distinguishing chromophobe renal cell carcinoma from clear cell renal cell carcinoma and renal oncocytoma. Pathology, research and practice 2015; 4: 303–307

## **2. Veröffentlichung**

Reprinted by permission from: Springer Nature, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology: Simon et al.: Targeting glycolysis with 2-deoxy-d-glucose sensitizes primary cell cultures of renal cell carcinoma to tyrosine kinase inhibitors; first author: Adrian Georg Simon, 2020.

License number: 5163560333254, license date: Oct 07, 2021



## Targeting glycolysis with 2-deoxy-D-glucose sensitizes primary cell cultures of renal cell carcinoma to tyrosine kinase inhibitors

Adrian Georg Simon<sup>1</sup> · Laura Kristin Esser<sup>1</sup> · Jörg Ellinger<sup>2</sup> · Vittorio Branchi<sup>3</sup> · Yuri Tolkach<sup>1</sup> · Stefan Müller<sup>2</sup> · Manuel Ritter<sup>2</sup> · Glen Christiansen<sup>1</sup> · Michael Helmut Muders<sup>1</sup> · Thomas Mayr<sup>1</sup> · Marieta Ioana Toma<sup>1</sup>

Received: 25 November 2019 / Accepted: 30 May 2020 / Published online: 12 June 2020

© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

### Abstract

**Purpose** To investigate the synergistic effect of glycolysis inhibition on therapy answer to tyrosine kinase inhibitors in renal carcinoma.

**Methods** Primary cell cultures from 33 renal tumors including clear cell RCC (ccRCC), papillary RCC and the rare subtype chromophobe RCC as well as two metastases of ccRCC were obtained and cultivated. The patient-derived cells were verified by immunohistochemistry. CcRCC cells were further examined by exon sequencing of the *von Hippel–Lindau* gene (*VHL*) and by RNA-sequencing. Next, cell cultures of all subtypes of RCC were exposed to increasing doses of various tyrosine kinase inhibitors (axitinib, cabozantinib and pazopanib) and the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose, alone or combined. CellTiter-Glo® Luminescence assay and Crystal Violet staining were used to assess the inhibition of glycolysis and the viability of the cultured primary cells.

**Results** The cells expressed characteristic tissue markers and, in case of ccRCC cultures, the *VHL* status of the tumor they derived from. An upregulation of *HK1*, *PFKP* and *SLC2A1* was observed, while components of the respiratory chain were downregulated, confirming a metabolic shift towards aerobic glycolysis. The tumors displayed variable individual responses for the therapeutics. All subtypes of RCC were susceptible to cabozantinib treatment indicated by decreased proliferation. Adding 2-deoxy-D-glucose to tyrosine kinase inhibitors decreased ATP production and increased the susceptibility of ccRCC to pazopanib treatment.

**Conclusion** This study presents a valuable tool to cultivate even uncommon and rare renal cancer subtypes and allows testing of targeted therapies as a personalized approach as well as testing new therapies such as glycolysis inhibition in an in vitro model.

**Keywords** Renal cancer · Clear cell renal cell carcinoma · Chromophobe renal cell carcinoma · Deoxyglucose · Papillary renal cell carcinoma · Tyrosine kinase inhibitors

### Abbreviations

RCC	Renal cell carcinoma
ccRCC	Clear cell renal cell carcinoma
pRCC	Papillary renal cell carcinoma
chRCC	Chromophobe renal cell carcinoma
TKI	Tyrosine kinase inhibitors
VHL	Von Hippel–Lindau gene/protein
2-DG	2-Deoxy-D-glucose

AXT	Axitinib
PZP	Pazopanib
CBZ	Cabozantinib

### Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) combines a heterogeneous group of malignant neoplasia responsible for 5% of all cancers in men and 3% in women (Capitanio et al. 2019). Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common subtype with 70–75% of all RCC, followed by papillary renal cell carcinoma (pRCC) with 15% and chromophobe RCC (chRCC) with 5% (Shuch et al. 2015). Apart from surgery, possible therapy options are extremely limited due to high

**Electronic supplementary material** The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s00432-020-03278-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marieta Ioana Toma  
Marieta.Toma@ukbonn.de

Extended author information available on the last page of the article

resistance of RCC against conventional chemotherapy and radiation (Buti et al. 2013). The combination of immune checkpoint inhibitors such as nivolumab, ipilimumab and pembrolizumab is the established first-line therapy (Angulo and Shapiro 2019; Albiges et al. 2019). First reports reveal a response rate in only 42% of patients with a median progression-free survival of 11.6 months (Motzer et al. 2018). In case of disease progression or intolerance to immune checkpoint inhibitors, tyrosine kinase inhibitors (TKI) such as cabozantinib, axitinib, sunitinib or pazopanib remain a second-line option. Tyrosine kinase inhibitors prolonged the overall survival 48 months in a low-risk group of patients with advanced RCC. However, only 30–40% of the patients responded to TKI such as sunitinib or pazopanib (Ljungberg et al. 2014; Motzer et al. 2007; Sternberg et al. 1990). Unfortunately, it has not been elaborated which sequences of immunotherapeutic agents and TKI are the most effective treatment for metastatic ccRCC. Even less data exist regarding the optimal therapy of advanced non-clear renal cell carcinomas since most of the published studies focused on ccRCC (Fernández-Pello et al. 2017; Keizman et al. 2016).

Testing TKI in patient-individualized cell cultures are a step towards personalized treatment of metastatic renal cancer. Moreover, this in vitro model might allow the development of new therapeutic approaches. Therefore, we exposed primary cell cultures of various RCC entities to the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose (2-DG) alone and

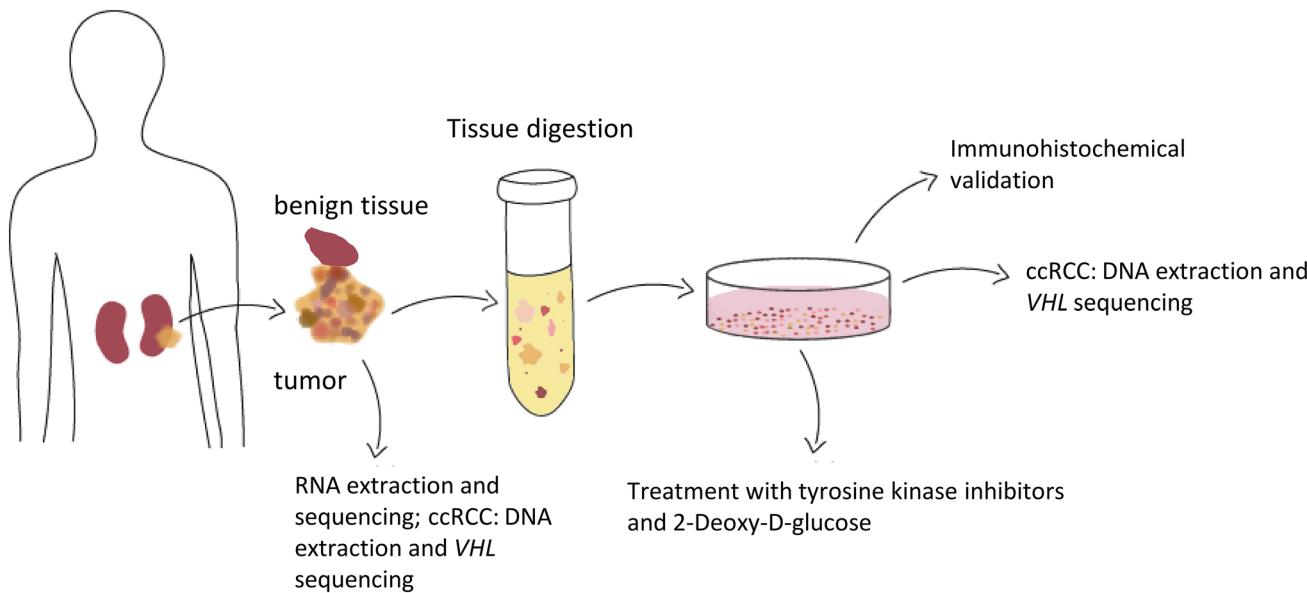
in combination with TKI. Especially, ccRCC depends on aerobic glycolysis even under normoxic conditions, which is referred to as Warburg effect (Akhtar et al. 2018; Linehan and Ricketts 2013). Early studies revealed that the inhibition of glycolysis leads to cell death in ccRCC (Chan et al. 2011). The efficiency of several inhibitors and small molecules targeting the glutamine metabolism and glycolysis is assessed in current clinical trials (Akins et al. 2018). In this study, we present a fast and reliable protocol for cultivating several subtypes of RCC and assess their susceptibility to TKI in combination with 2-DG, targeting glycolysis as a metabolic key feature.

## Materials and methods

### Ethical approval

The acquisition of patient material and experiments was performed with the patient's consent and the approval of the ethics committee of Bonn University Hospital (EK 219/17). All materials, if not stated otherwise, were acquired by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

Figure 1 summarizes and demonstrates the generation and processing of RCC primary cell cultures.



**Fig. 1** Generation of primary cell cultures of RCC specimens. After surgical resection, the tumor tissue of clear cell RCC, papillary RCC and chromophobe RCC was minced, digested, filtered and cultivated. The cell cultures were validated using immunohistochemical staining for characteristic tissue- and tumor markers. For ccRCC specimens and their corresponding cultures, the *VHL* gene was sequenced, matching the *VHL* status of the cell cultures with the tissue they

derived from. RNA was extracted from tumor and benign tissue for RNA-sequencing to identify central gene expression characteristics and alterations. All RCC subtypes were treated *in vitro* with tyrosine kinase inhibitors –/+2-deoxy-D-glucose (2-DG), using a CellTiter-Glo® Luminescence assay and a crystal violet assay to assess the decrease of glycolysis and the cell viability after treatment; *ccRCC* clear cell renal cell carcinoma, *VHL von Hippel-Lindau* gene

## Generation of primary cell cultures

Fresh tumor and non-neoplastic material from 32 patients who underwent partial or complete nephrectomy for ccRCC, pRCC and chRCC as well as two cases of adrenal metastasis (ccRCC) and one oncocytoma were included (histopathological parameters in Table 1). A piece of tissue, approximately 2 cm<sup>3</sup>, was obtained from the tumor mass. Necrotic, fibrotic and capsular regions were avoided. Visible blood vessel remnants were removed. The tissue was minced and transferred in 10-mL digestion solution (RPMI 1640) pre-warmed to 37 °C, containing 200-U/mL collagenase type II, 100-U/mL hyaluronidase type V (Sigma Aldrich, USA) and 2% penicillin/streptomycin. The tissue was incubated in a water bath (37 °C) under constant shaking (150 rpm). After 2 h of digestion, the cell solution was filtered using sterile 70-µm and 40-µm sieves (VWR International, Germany). The

cells were washed with DPBS and centrifuged (1000 rpm, 5 min); the supernatant was carefully discarded. Cells were then seeded at a density of approximately 10,000 cells/cm<sup>3</sup>. The serum-reduced cell culture medium (SRM) contained supplements as follows: DMEM/F12 medium + 5% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 10 ng/mL hrEGF (R&D Systems, USA), 10 ng/mL FGF-basic (PeproTech, Germany), 1×B27-supplement, 1×Lipid Mixture 1 (Sigma Aldrich), 1-mM N-Acetyl-Cysteine, 4-mM L-Glutamine, 1×Non-essential amino acids and 10-mM HEPES (GE Healthcare, UK). The cell cultures were tested for mycoplasma contamination every two weeks and were free of any contamination.

## CcRCC17: a patient pre-treated with nivolumab and sunitinib

One patient had a primary metastatic ccRCC (pulmonary and bone) and received neo-adjuvant treatment with nivolumab and sunitinib before nephrectomy. Radiological follow-up revealed a mixed response three months after neo-adjuvant therapy. The cells were cultivated and treated like the other ccRCC specimens.

## Immunohistochemical validation

For IHC staining of primary cell cultures, the cells were detached with trypsin–EDTA and washed in DPBS, the cell pellet was resuspended in 300-µL Richard-Allan Scientific HistoGel according to the manufacturer's instructions, fixed in 400-µL PFA (4%) and embedded in paraffin. IHC staining was performed using antibodies as follows (dilution in spaces; distributors in supplementary materials): PAX8 (1:100), vimentin (VIM, 1:5000), CD10 (pre-diluted), CA9 (1:8000), CK7 (1:500), AMACR (1:100), CD117 (c-kit, 1:200). IHC staining was performed on a Ventana Benchmark system for CD10, AMACR and CD117 and on a Medac 480S system for PAX8, VIM, CA9 and CK7. IHC staining was performed using established staining protocols of the routine laboratory. Immunohistochemical staining was assessed using a Leica DM 500 microscope (Leica, Germany). GIMP software v.2.10.12 was used to optimize the IHC pictures (brightness and clearness, if necessary) without altering the IHC staining characteristics or intensity.

## Sequencing of the *VHL* gene

Genomic DNA was extracted for *VHL* exon sequencing using the QIAamp DNA Minikit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. *VHL* exons (1, 2a, 2b, 3) were amplified using a GeneAmp PCR System 9700 (primer sequences: supplementary data). Fragment sizes were checked by agarose gel electrophoresis and purified using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey–Nagel,

**Table 1** Clinical and pathological parameters of the included patient specimens

	N	[%]
Gender		
Male	23	65.71
Female	12	34.29
Total	35	
Median age at surgery (years)	66	Range 47–87
Histology*		
ccRCC	22	62.85
pRCC	6	17.14
chRCC	4	11.34
Oncocytoma	1	2.86
Metastases (ccRCC)	2	5.71
Total	35	
pT stage**		
pT1	16	50.0
pT2	1	3.12
pT3	15	46.87
Total	32	
Grade***		
1	2	7.14
2	13	46.43
3	11	39.29
4	2	7.14
Total	28	

\*The histology was assessed according to the 2016 WHO Classification of tumors of the urinary system

\*\*The TNM status was assessed to the WHO/UICC Classification system and the tumor grade according to the WHO/ISUP Classification. The TNM classification was not used for oncocytoma and the metastases of ccRCC

\*\*\*The tumor grade was not assessed for chRCC, the metastases of ccRCC and the oncocytoma

Germany) according to the manufacturer's instructions. Sanger sequencing for the VHL gene sequences was performed by GATC sequencing service (Eurofins Genomics, Germany). Sequencing trace files were analyzed using ApE Plasmid Editor (Jorgensen Laboratory, USA) and FinchTV (Geospiza Inc., USA) to identify VHL alterations. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) was used as a reference database to check for known VHL mutations (Tate et al. 2019).

### RNA-sequencing (RNA-Seq)

RNA from eight ccRCC and corresponding benign tissue was extracted. Raw single-read sequencing results were mapped to the human genome (GRCh38) with hisat2-2.1.0 (Kim et al. 2015). The mapped reads were processed using samtools (Li et al. 2009) and featureCounts (Liao et al. 2014) to quantify reads. Read counts were statistically analyzed with the Bioconductor software package DESeq2 (Love et al. 2014). Differentially expressed genes were calculated for each of the groups by applying multiple testing corrections including Bonferroni correction method and FDR. A p value cut-off of 0.05 was accepted as significant. The PCA plot was generated using ggplot2 (Wickham 2016). The differentially expressed genes were called into the database Enrichr (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) using a fold change of log<sub>2</sub> (1.0) for upregulated genes and of log<sub>2</sub> (-1.0) for downregulation.

### Generation of a CellTiter-Glo®-Luminescent viability assay and -analysis

The primary cells of eight ccRCC cultures, four chRCC cultures and two pRCC cultures were seeded in a 96-well plate (Sarstedt, Germany) with a density of 1000 cells/well in SRM (100 µL/well). After 24 h, cells were treated with different concentrations of axitinib (AXT; 2.5 µM, 5.0 µM, 10.0 µM, 20.0 µM), cabozantinib (CZB; 4.5 µM, 9 µM, 18 µM, 36 µM) and pazopanib (PZP; 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM). Additionally, cells were treated with AXT, CZB and PZP as described above in combination with 50-µM D-deoxy-D-glucose (DDG) to assess the effect of additional glycolysis inhibition. After 72 h, the wells were provided with 100-µL CellTiter-Glo®-Luminescent reagent (Promega, USA) and incubated for 6 min to stabilize the signal. The cells were transferred to a nontransparent 96-well plate (Greiner bio-one, Austria) and luminescence was assessed on a Centro LB 960 microplate luminometer (Berthold Technologies, Germany). The viability data were referred to an untreated control and analyzed and visualized with Microsoft Excel (Microsoft, USA) and GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

### Crystal violet assay

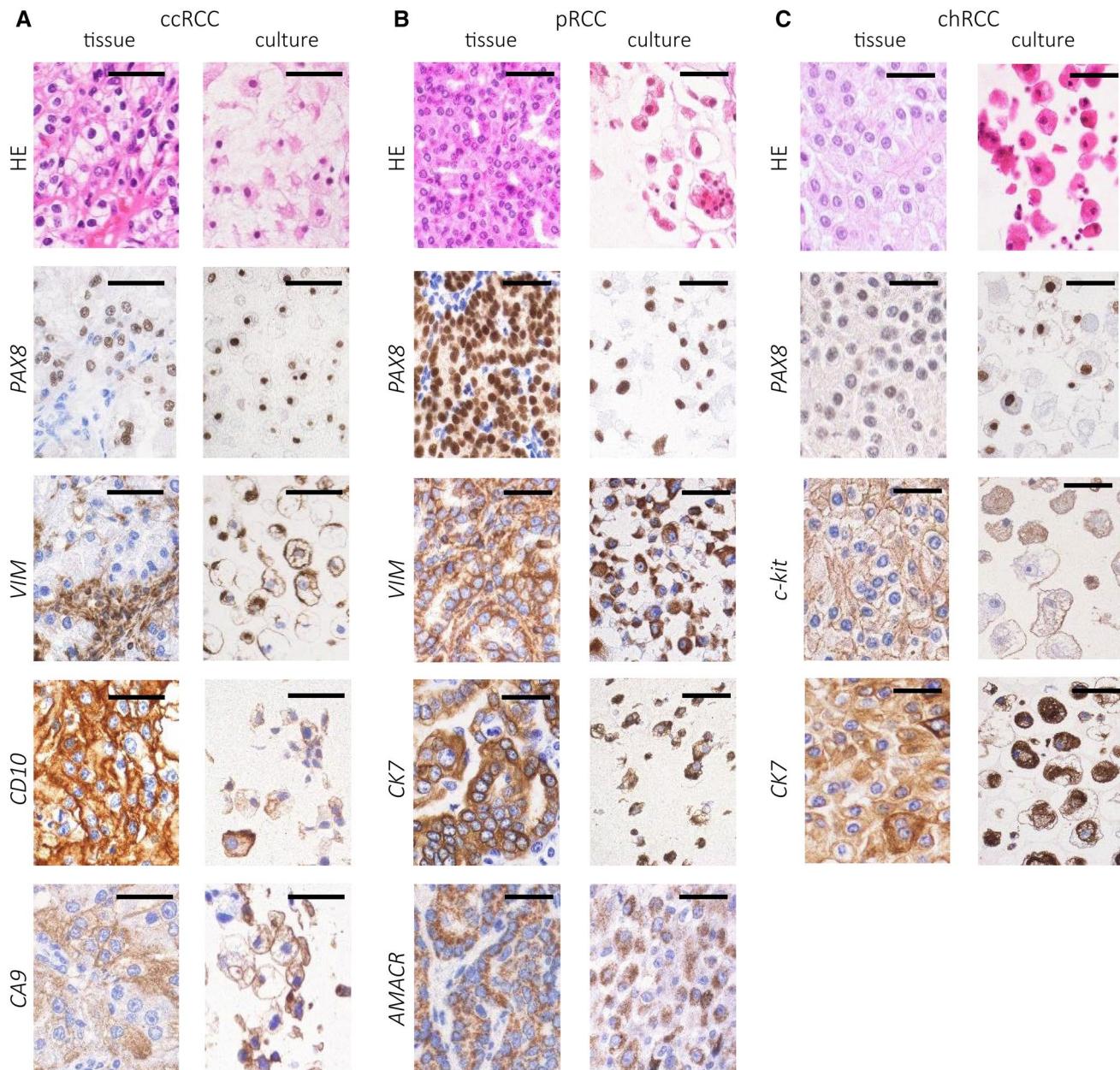
Since 2-DG blocks ATP production by inhibition of glycolysis and CellTiter-Glo is an ATP-based assay, we verified our results with the Crystal Violet assay. The therapy response assays were repeated with primary cells of four new cultivated ccRCC and one previous examined chRCC and pRCC, respectively. After 72 h, the medium was carefully removed, washed with PBS and fixed for 10 min with 4% PFA. 4%PFA was removed and the cells were incubated with 0.5% Crystal Violet solution for 10 min at room temperature. After that, the 96-well plates were washed two times with ddH<sub>2</sub>O. To solubilize the stain 1% SDS was added. The absorbance of each well was read at 570 nm. The viability data were normalized to the untreated control and graphs were generated using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). The data obtained for the CellTiter-Glo assay were compared with the data obtained from the Crystal Violet assay.

## Results

### Successful cultivation of several RCC entities including ccRCC, pRCC and chRCC

86.4% of ccRCC specimens (19/22), 100% of pRCC samples (6/6), 100% of chRCC specimens (4/4), one oncocytoma and 29 cases of normal renal tissue (100%) were successfully cultivated. Whereas RCC cell cultures were successfully passaged four–five times until growth arrest occurred (minimum two, maximum 14 times), benign cell cultures easily reached up to ten confliences. Histological characterization and IHC staining revealed a high similarity to the tissue of origin (Fig. 2). Three ccRCC cultures (13.6%) and the two cultures of ccRCC metastases were positive for vimentin but devoid of other characteristic markers of ccRCC, indicating fibroblast overgrowth. The oncocytoma displayed a growth in epithelial cell nests, similar to chRCC cell cultures, and expressed PAX8 and c-kit but was negative for CK7, matching the tissue of origin (data not shown). Benign primary cell cultures grew in a typical cobblestone-like pattern and expressed PAX8 as a marker of renal epithelial origin in all cases (data not shown).

In four of the seven ccRCC specimens (57.1%), mutations in one of the three VHL exons were observed. While three of them were heterozygous, one was homozygous (Table 2). The three other samples (ccRCC1, ccRCC6 and ccRCC8) were VHL wild type. Among the discovered mutations, a new frameshift deletion in exon 2a and an in-frame deletion in exon 1 were detected. In all cases, the VHL status of the tissue of origin matched the correspondent cell culture.



**Fig. 2** IHC staining of RCC tissue and derived primary cell cultures. The cells were detached, embedded in paraffin and stained for tissue- and tumor markers. **a** ccRCC expressed PAX8, vimentin (VIM), CD10 and CA9. **b** pRCC tissue and cell cultures expressed PAX8, VIM, CK7 and AMACR. **c** chRCC expressed PAX8, CK7 and c-kit

(CD117); HE=hematoxylin–eosin; bar = 100  $\mu$ m; The staining was assessed using a Leica DM500 microscope; ccRCC clear cell renal cell carcinoma, pRCC papillary renal cell carcinoma, chRCC chromophobe renal cell carcinoma

### RNA-sequencing reveals a metabolic shift in ccRCC specimens

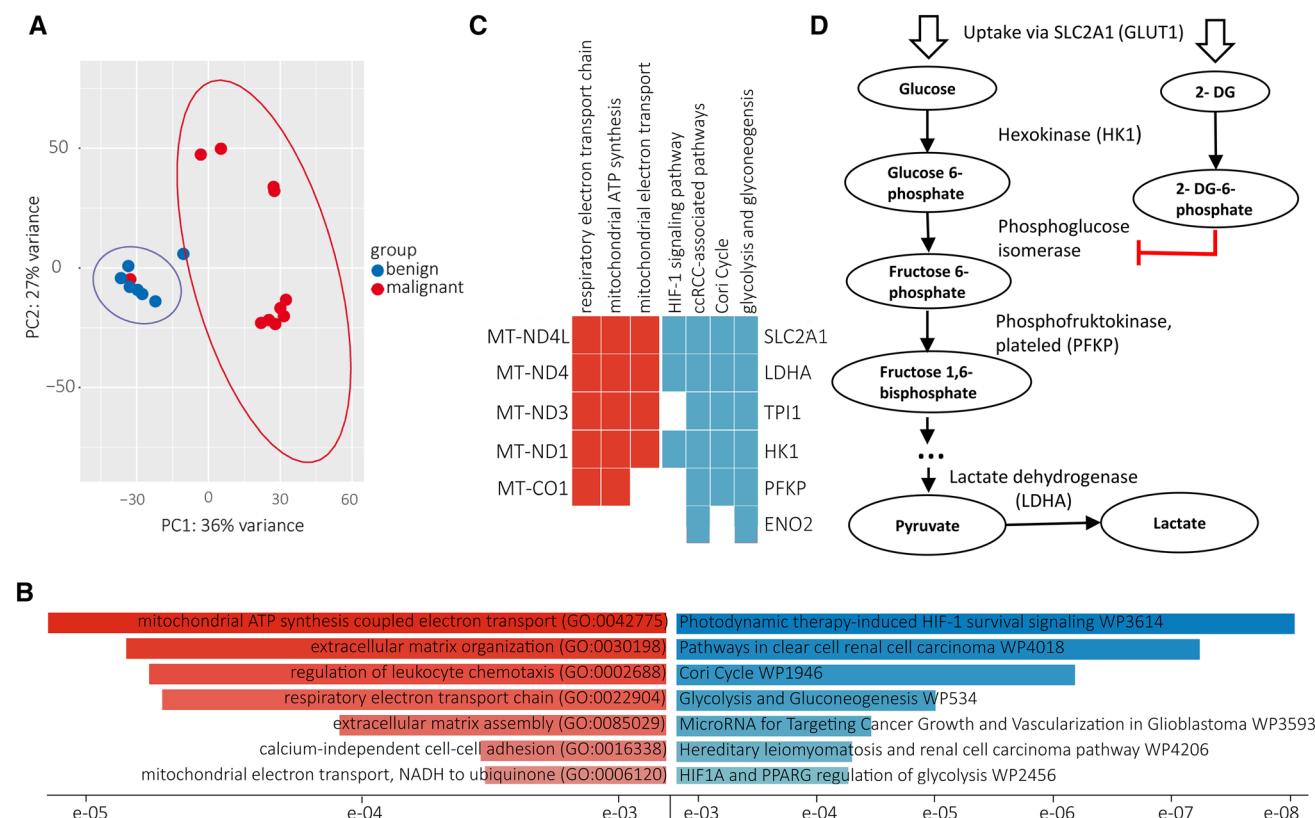
Seven ccRCC specimens were analyzed with RNA-Seq using benign tissue as a reference. The ccRCC specimens displayed a significant downregulation (FDR < 0.05) of several genes encoding respiratory chain components and mitochondrial electron transporters as well as pathways

involved in extracellular matrix organization, referring to the GO database 2018 for Biological Processes (Fig. 3b). Genes involved in glycolysis were significantly upregulated, including *hexokinase 1 (HK1)*, *phosphofructokinase, platelet (PFKP)* as well as the glucose transporter *SLC2A1 (GLUT1)* according to KEGG 2019 Human database (Fig. 3b, c).

**Table 2** Sequencing of VHL gene exons in ccRCC specimens

ID	Exon	VHL status (DNA)	VHL status (amino acids)	Mutation type	COSMIC-ID
ccRCC2	1	c.332G>T/+	VHLp.S111I/+	Missense substitution	COSM36341
ccRCC3	2a	c.420_439del20/+	p.N141fs25/+	Frameshift deletion	–
ccRCC5	1	c.223_225delCAT/+	VHLp.I75del/+	In frame deletion	–
ccRCC10	3	c.491 A>T	p.Q164L	Missense substitution	COSM30288

In four of the seven tested ccRCC primary cell cultures, mutations in the DNA exons coding for *pVHL* were detected. Three had a heterozygote mutation status (+), one sample (ccRCC10) had a homozygote mutation leading to missense substitution. Two of these mutations have been reported before in the COSMIC database (COSMIC-ID)



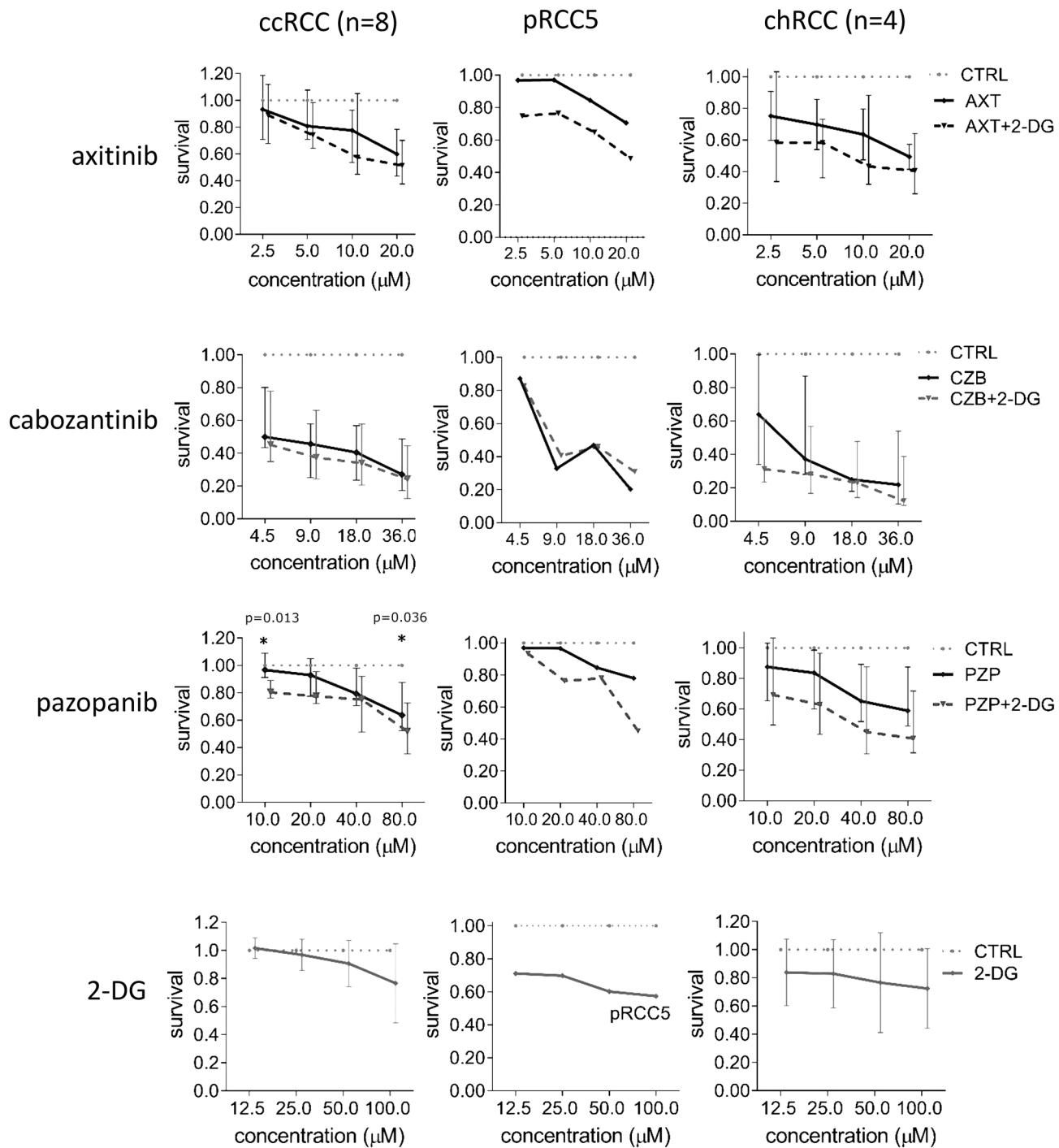
**Fig. 3** RNA-seq analysis and altered pathways in ccRCC samples. Seven ccRCC specimens were analyzed using the benign tissue as reference. **a** Within the distinct populations of malignant and benign tissue, a close genetic relationship was observed. **b** The biological processes (Gene Ontology) of mitochondrial ATP synthesis and respiratory electron transport chain were significantly downregulated in ccRCC tumors; whereas, the pathways (KEGG 2019 Human) of HIF-1 signaling, Cori cycle, glycolysis and gluconeogenesis were upregulated. **c** The genes *MT-ND4L*, *MT-ND4*, *MT-ND3*, *MT-ND1* and *MT-CO1* were downregulated in ccRCC tissue. The expression of several

genes involved in *HIF-1* signaling and glycolysis were upregulated. **d** Glycolysis and their inhibition by 2-deoxy-D-glucose (2-DG, simplified): After uptake via *SLC2A1*, glucose and 2-DG are phosphorylated to glucose 6-phosphate or 2-DG 6-phosphate, respectively. 2-DG 6-phosphate is a competitive inhibitor of the phosphoglucomutase, thus inhibiting further glycolysis; a full list of all genes significantly altered is provided in the supplementary data. Several corrections were used to identify significance, including FDR and Bonferroni corrections with a *p* value  $\leq 0.05$  being significant

## 2-DG sensitizes RCC primary cells to treatment with tyrosine kinase inhibitors

The cell cultures were exposed to the tyrosine kinase inhibitors (TKI) axitinib (AXT), cabozantinib (CZB) and pazopanib (PZP) at increasing doses. To assess the viability of the cells, the ATP-based CellTiter-Glo assay was used. Only

at a concentration of 80  $\mu$ M, ccRCC and pRCC5 responded to AXT in vitro. Cell cultures of chRCC were susceptible to AXT alone (Fig. 4). CBZ was effective against all RCC subtypes, reducing the viability up to 80% at higher levels (Fig. 4). In case of PZP, cell cultures of ccRCC and chRCC responded especially to higher doses (40  $\mu$ M and 80  $\mu$ M). Compared to the untreated control, all cell lines of ccRCC

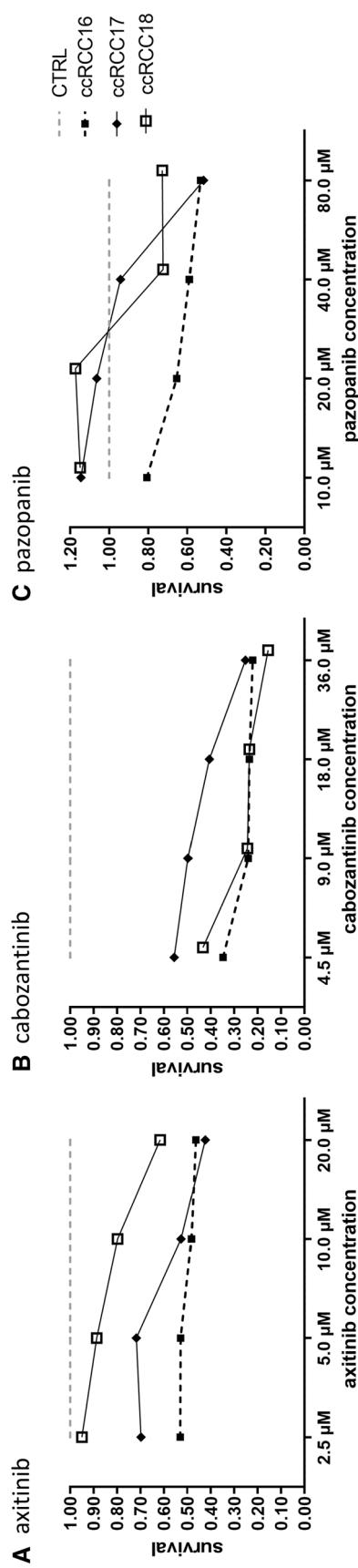


**Fig. 4** Treatment of RCC cell cultures with tyrosine kinase inhibitors and 2-DG. The primary cell cultures of eight ccRCC, two pRCC (here pRCC5 as example) and four chRCC were treated with tyrosine kinase inhibitors in combination with 2-DG (details see “Materials and methods”). The cell lines of ccRCC responded with a significant decrease of viability in the CellTiter-Glo assay. Additionally, the cells

were treated with 2-DG alone. For ccRCC and chRCC, the median with the interquartile range is displayed. *ccRCC* clear cell renal cell carcinoma, *pRCC* papillary renal cell carcinoma, *chRCC* chromophobe renal cell carcinoma; *CTRL* untreated control, *AXT* axitinib, *CBZ* cabozantinib, *PZP* pazopanib, *2-DG* 2-deoxy-D-glucose

responded to the different TKI with varying decreased cell viability depending on the concentration. Interestingly, the different cell lines of ccRCC, pRCC and chRCC as well as

the single cases of each histological subtype displayed a highly variable response to the treatment with TKI (Fig. 5). The tumor line ccRCC17, a primary metastatic ccRCC



**Fig. 5** Individual response of three exemplary ccRCC lines to treatment with tyrosine kinase inhibitors. The cell lines of all tumor entities displayed different responses to the treatment with tyrosine kinase inhibitors in the CellTiter-Glo assay. CcRCC17 belonged to a patient who was diagnosed with primary metastatic disease and underwent neo-adjuvant treatment with sunitinib and nivolumab before nephrectomy, showing an in vitro therapy response especially to axitinib and cabozantinib; ccRCC clear cell renal cell carcinoma

pre-treated with sunitinib and nivolumab, responded well to AXT and CBZ.

When added to the tyrosine kinase inhibitors (TKI), 2-DG further reduced the cell viability of pRCC5 cells under treatment with AXT and PZP by additional 20% (Fig. 4). Cell cultures of chRCC responded to all TKI with an additional viability reduction by 10–20%, when 2-DG was added (Fig. 4). In case of PZP, cell cultures of ccRCC displayed a dramatic decrease of cell viability when adding 2-DG to pazopanib at doses of 10  $\mu$ M and 80  $\mu$ M, respectively. A sensitizing effect of 2-DG to the tyrosine kinase inhibitors was not observed for ccRCC17 (data not shown).

The isolated treatment with 2-deoxy-D-glucose (2-DG) proved to be slightly effective against pRCC5 and chRCC. The cell viability was reduced by 20% in chRCC cultures and by 30–40% in pRCC5 (Fig. 4).

To assess, whether or not the reduced luminescence and, hence, ATP levels in vitro were caused by reduced cell population, we repeated the treatment with five cultivated ccRCC and performed a viability assay with Crystal Violet. We obtained results for the therapy response similar to the CellTiter-Glo experiments (Suppl. Fig. 1): The five tested ccRCC cell lines responded similar to the addition of 2-DG with a decrease of cell viability as they displayed a decrease of luminescence in the CellTiter-Glo assay. When 2-DG was added, the cell line of chRCC1 did not display any decrease of cell population in the crystal violet assay while showing no change in luminescence in the CellTiter-Glo assay as well. A statistical analysis was not performed due to the restricted number of samples.

Overall, a decrease of luminescence in the CellTiter-Glo assay correlated with a decreased cell population in the crystal violet assay for the tested cell lines of RCC when 2-DG was added to the tyrosine kinase inhibitors.

## Discussion

The cultivation of primary cell cultures of RCC remains challenging. The successful cultivation of previous studies ranges between 40 and 90%, most of them cultivating ccRCC, and depends on the procedure of validation (Yap et al. 2019; Lobo et al. 2016; Cifola et al. 2011; Perego et al. 2005; Bianchi et al. 2010). Common methods are IHC staining and, for ccRCC, VHL sequencing. Recent studies, however, reported that not all ccRCC cells maintain their VHL status in cell culture conditions, despite previous immunohistochemical confirmation of ccRCC (Lobo et al. 2016; Bolck et al. 2019). In our study, all ccRCC cultures except for three, expressed PAX8, VIM, CA9 and CD10 and the VHL status of all tested ccRCC cultures matched the tumor tissue. This indicates the successful and efficient generation of ccRCC cultures.

Most protocols concentrate solely on ccRCC, since this subtype is most commonly available. Due to the focus on ccRCC or other questions of interest, the very few existing studies including pRCC or chRCC did not characterize or validate the reliability of their protocol (Bianchi et al. 2010) (Krawczyk et al. 2017; Valente et al. 2011). Since up to 20% of all RCC cases are non-clear cell RCC, the lack of research of these subtypes becomes eminent. Therefore, specimens of pRCC and even chRCC were successfully included in this study and excessively verified by IHC markers, expressing the tumor markers of the tumors they originated from. This demonstrates the potential of our protocol.

In the ccRCC specimens, an upregulation of glycolysis-related genes and HIF-1 signaling was observed. The metabolic shift towards aerobic glycolysis is a characteristic feature especially of ccRCC, even under normoxic conditions, which leads to ccRCC being considered as a metabolic disease (Akhtar et al. 2018; Morais et al. 1861; Linehan and Ricketts 2013).

Thus, for the treatment of RCC cultures, the combination of frequently applied TKI and 2-DG was used to specifically target aerobic glycolysis. The potential use of glycolysis inhibitors is focus of several ongoing studies (Akins et al. 2018; Srinivasan et al. 2015). This is the first study targeting patient-derived individual cells of ccRCC, pRCC and even chRCC in an in vitro model combining common TKI and 2-DG. When 2-DG was added to TKI, we observed an additional reduction of cell viability.

Overall, the ccRCC cells responded well to cabozantinib and pazopanib treatment in vitro. Our results indicate an increase in susceptibility to pazopanib when the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose (2-DG) is added for most ccRCC cell lines. In the case of ccRCC17, in which the patient underwent neo-adjuvant treatment with nivolumab and sunitinib, the cells were successfully treated with axitinib and cabozantinib. Since this ccRCC was widely metastatic at the point of diagnosis, the therapeutic options are limited. A response to axitinib and cabozantinib in vitro might be the first step in identifying additional second-line reagents in a patient-individualized therapeutic approach. However, the therapy response on TKI ± 2-DG was individual for each tumor sample, which underlines the importance of personalized approaches for therapy testing. The results of the treatment of pRCC cultures indicate a susceptibility to cabozantinib alone or combined with 2-DG. One culture (pRCC5), which did not respond to AXT alone, showed reduced cell viability when exposed to axitinib and 2-DG, demonstrating a synergistic effect of 2-DG. The same was observed for pazopanib at high concentrations. Although we only exposed two cell cultures of pRCC and four of chRCC, our results justify further research for a potential use of 2-DG or other metabolism-targeting agents against these renal cancer subtypes. While there are therapy standards for

the treatment of advanced and metastatic ccRCC, for metastatic pRCC and chRCC, the data are extremely limited and inconclusive. At current state, there is only limited evidence for the efficiency of immune checkpoint inhibitors, which are the first-line approach for ccRCC (Tsimafeyeu 2017). When advanced, pRCC and chRCC are treated mainly with anti-angiogenetic agents like sunitinib or TKI; the benefit in progression-free survival and overall survival depends on the therapeutic setting and the combination of drugs. But none of these studies was able to include more than 109 patients due to the rarity of pRCC and chRCC (Fernández-Pello et al. 2017; Keizman et al. 2016; Ito 2019; Malouf et al. 2017). This demonstrates an urgent need for further data acquisition and clinical research. Our protocol allows the cultivation of these more infrequent tumors as well as the identification and evaluation of possible targets, as demonstrated with the sensitizing effect of 2-DG on TKI treatment in vitro.

The treatment standards for RCC change constantly and demonstrate a need for more therapeutic options. Since also new first-line therapies with avelumab and axitinib and other combinations still showed an objective response of about 55% (Motzer et al. 2019), in vitro therapy testing for second- or third-line option becomes more important. This might facilitate the identification of the most effective therapeutic regime and patient-individualized medicine.

In conclusion, we presented and validated a fast, reliable and simple protocol for the generation of individualized primary cell cultures of RCC entities. Especially, the uncommon pRCC and chRCC subtypes will require further research to investigate their characteristics and to identify possible targets for therapeutics such as cell metabolism. Our study provides the opportunity to design subtype-specific experiments in a patient-individualized in vitro model.

**Acknowledgements** We are thankful to Kerstin Fuchs, Susanne Steiner, Carsten Gölz and Cristina Göbbel for their excellent technical assistance. We furthermore are thankful to the Next Generation Sequencing Core Facility of Bonn University Hospital.

**Funding** This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** None.

## References

- Akhtar M, Al-Bozom IA, Al Hussain T (2018) Molecular and metabolic basis of clear cell carcinoma of the kidney. *Adv Anat Pathol* 25:189–196
- Akins NS, Nielson TC, Le HV (2018) Inhibition of glycolysis and glutaminolysis. An emerging drug discovery approach to combat cancer. *Curr Top Med Chem* 18:494–504

- Albiges L et al (2019) Updated European Association of Urology guidelines on renal cell carcinoma. Immune checkpoint inhibition is the new backbone in first-line treatment of metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Eur Urol* 76:151–156
- Angulo JC, Shapiro O (2019) The changing therapeutic landscape of metastatic renal cancer. *Cancers* 11:1227
- Bianchi C et al (2010) Primary cell cultures from human renal cortex and renal-cell carcinoma evidence a differential expression of two spliced isoforms of Annexin A3. *Am J Pathol* 176:1660–1670
- Bolck HA et al (2019) Tracing clonal dynamics reveals that two- and three-dimensional patient-derived cell models capture tumor heterogeneity of clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol Focus*. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2019.06.009>
- Buti S et al (2013) Chemotherapy in metastatic renal cell carcinoma today? A systematic review. *Anticancer Drugs* 24:535–554
- Capitanio U et al (2019) Epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 75:74–84
- Chan DA et al (2011) Targeting GLUT1 and the warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Sci Transl Med* 3:94ra70
- Cifola I et al (2011) Renal cell carcinoma primary cultures maintain genomic and phenotypic profile of parental tumor tissues. *BMC Cancer* 11:244
- Fernández-Pello S et al (2017) A systematic review and meta-analysis comparing the effectiveness and adverse effects of different systemic treatments for non-clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol* 71:426–436
- Ito K (2019) Recent advances in the systemic treatment of metastatic non-clear cell renal cell carcinomas. *Int J Urol* 26:868–877
- Keizman D et al (2016) Outcome of patients with metastatic chromophobe renal cell carcinoma treated with sunitinib. *Oncologist* 21:1212–1217
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL (2015) HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 12:357–360
- Krawczyk KM et al (2017) Papillary renal cell carcinoma-derived chemerin, IL-8, and CXCL16 promote monocyte recruitment and differentiation into foam-cell macrophages. *Lab Investig* 97:1296–1305
- Li H et al (2009) The sequence alignment/map format and SAM tools. *Bioinformatics* 25:2078–2079
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923–930
- Linehan WM, Ricketts CJ (2013) The metabolic basis of kidney cancer. *Semin Cancer Biol* 23:46–55
- Ljungberg B et al (2015) EAU guidelines on renal cell carcinoma. 2014 update. *Eur Urol* 67:913–924
- Lobo NC et al (2016) Efficient generation of patient-matched malignant and normal primary cell cultures from clear cell renal cell carcinoma patients. Clinically relevant models for research and personalized medicine. *BMC Cancer* 16:485
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550
- Malouf GG, Joseph RW, Shah AY, Tannir NM (2017) Non-clear cell renal cell carcinomas: biological insights and therapeutic challenges and opportunities. *Clin Adv Hematol Oncol* 15:409–418
- Morais M, Dias F, Teixeira AL, Medeiros R (2017) MicroRNAs and altered metabolism of clear cell renal cell carcinoma. Potential role as aerobic glycolysis biomarkers. *Biochim Biophys Acta* 1861:2175–2185
- Motzer RJ et al (2007) Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356:115–124
- Motzer RJ et al (2018) Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 378:1277–1290
- Motzer RJ et al (2019) Avelumab plus axitinib versus sunitinib for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 380:1103–1115
- Perego RA et al (2005) Primary cell cultures arising from normal kidney and renal cell carcinoma retain the proteomic profile of corresponding tissues. *J Proteome Res* 4:1503–1510
- Shuch B et al (2015) Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma Distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. *Eur Urol* 67:85–97
- Srinivasan R, Ricketts CJ, Sourbier C, Linehan WM (2015) New strategies in renal cell carcinoma: Targeting the genetic and metabolic basis of disease. *Clin Cancer Res* 21:10–17
- Sternberg CN et al (2013) A randomised, double-blind phase III study of pazopanib in patients with advanced and/or metastatic renal cell carcinoma. Final overall survival results and safety update. *Eur J Cancer* 49:1287–1296
- Tate JG et al (2019) COSMIC: The catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res* 47:D941–D947
- Tsimafeyeu I (2017) Management of non-clear cell renal cell carcinoma. *Curr Approaches Urol Oncol* 35:5–13
- Valente MJ et al (2011) A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens. *PLoS ONE* 6:e19337
- Wickham H (2016) ggplot2—Elegant graphics for data analysis, 2nd edn. Springer, New York
- Yap NY et al (2019) Establishment of epithelial and fibroblast cell cultures and cell lines from primary renal cancer nephrectomies. *Cell Biol Int*. <https://doi.org/10.1002/cbin.11150>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Affiliations

Adrian Georg Simon<sup>1</sup> · Laura Kristin Esser<sup>1</sup> · Jörg Ellinger<sup>2</sup> · Vittorio Branchi<sup>3</sup> · Yuri Tolkach<sup>1</sup> · Stefan Müller<sup>2</sup> · Manuel Ritter<sup>2</sup> · Glen Kristiansen<sup>1</sup> · Michael Helmut Muders<sup>1</sup> · Thomas Mayr<sup>1</sup> · Marieta Ioana Toma<sup>1</sup> 

Adrian Georg Simon  
s4adsimo@uni-bonn.de

Laura Kristin Esser  
laura.esser@ukbonn.de

Jörg Ellinger  
joerg.ellinger@ukbonn.de

Vittorio Branchi  
vittorio.branchi@ukbonn.de

Yuri Tolkach  
yuri.tolkach@ukbonn.de

Stefan Müller  
stefan.mueller@ukbonn.de

Manuel Ritter  
manuel.ritter@ukbonn.de

Glen Kristiansen  
glen.kristiansen@ukbonn.de

Michael Helmut Muders  
michael.muders@ukbonn.de

Thomas Mayr  
thomas.mayr@ukbonn.de

<sup>1</sup> Department of Pathology, Institute of Pathology, University Hospital Bonn, Venusberg Campus 1, 53127 Bonn, Germany

<sup>2</sup> Department of Urology, University Hospital Bonn, Venusberg Campus 1, 53127 Bonn, Germany

<sup>3</sup> Department of General, Visceral, Thoracic and Vascular Surgery, Institute of General, Visceral, Thoracic and Vascular Surgery, University Hospital Bonn, Venusberg Campus 1, 53127 Bonn, Germany

### 3. Anhang

#### 3.1 Histopathologische Parameter der kultivierten Nierenzellkarzinome (Supplementary file 1)

Histopathologische Parameter der in dieser Arbeit kultivierten Nierenzellkarzinome, ursprünglich als „Supplementary file 1“ in der Originalpublikation Simon et al. 2020, Formatierung angepasst, englische Sprache belassen (Anmerkung des Verfassers).

**Supplementary table 1: Histopathological parameters of included renal tumor entities**

tumor ID	age [y]	sex	histology (WHO)	size [cm]	T	L	V	grade (ISUP)
ccRCC1	79	f	ccRCC	3.6	pT1a	0	1	2
ccRCC2	61	f	ccRCC	7.0	pT1b	0	0	2
ccRCC3	56	m	ccRCC	5.3	pT3a	0	0	3
ccRCC4	66	m	ccRCC	15.0	pT3a	0	1	3
ccRCC5	70	f	ccRCC	7.1	pT3a	1	1	3
ccRCC6	55	m	ccRCC	4.1	pT1b	0	0	1
ccRCC7	61	m	ccRCC	3.0	pT1a	0	0	3
ccRCC8	66	m	ccRCC	5.5	pT3a	0	2	3
ccRCC9	58	f	ccRCC	9.5	pT3a	0	1	3
ccRCC10	50	f	ccRCC	4.4	pT1b	0	0	2
ccRCC11	78	f	ccRCC	3.8	pT1a	0	0	2
ccRCC12	87	m	ccRCC	5.9	pT3	0	0	2
ccRCC13	80	f	ccRCC	11.9	pT3a	0	1	3
ccRCC14	75	m	ccRCC	2.7	pT1a	0	1	2
ccRCC15	68	f	ccRCC	6.5	pT3a	0	1	2
ccRCC16	85	m	ccRCC	5.5	pT3a	0	0	3
ccRCC17	47	m	ccRCC	9.0	ypT3a*	0	2	4
ccRCC18	64	m	ccRCC	5.9	pT3a	0	1	3

tumor ID	age [y]	sex	histology (WHO)	size [cm]	T	L	V	grade (ISUP)
ccRCC19	77	m	ccRCC	4.1	pT1b	0	0	4
ccRCC20	64	w	ccRCC	1.7	pT1a	0	0	2
ccRCC21	70	m	ccRCC	6.5	pT3a	0	0	3
ccRCC22	76	m	ccRCC	3.4	pT1a	0	0	3
pRCC1	62	m	pRCC	1.5	pT1a	0	0	2
pRCC2	53	m	pRCC	5.5	pT1b	0	0	2
pRCC3	66	m	pRCC	9.5	pT2a	0	0	3
pRCC4	50	f	pRCC	2.5	pT1a	0	0	2
pRCC5	72	m	pRCC	2.5	pT3	0	0	2
pRCC6	79	m	pRCC	1.7	pT1a	0	0	2
chRCC1	51	m	chRCC	2.0	pT1a	0	0	-
chRCC2	77	f	chRCC	5.7	pT3a	0	0	-
chRCC3	74	m	chRCC	1.5	pT3a	0	0	-
chRCC4	55	m	chRCC	4.9	pT1b	0	0	-
M1	57	m	M(ccRCC)	6.6	pT1a	n. a.	n. a.	3
M2	66	m	M(ccRCC)	1.0	pT1b	n. a.	n. a.	2
Onc1	68	f	oncocytoma	3.6	-	-	-	-

age: age at the time of surgery [years]; sex: m = male, f = female; histology (WHO-classification): ccRCC = clear cell renal cell carcinoma, pRCC = papillary renal cell carcinoma, chRCC = chromophobe renal cell carcinoma, M(ccRCC) = metastasis of ccRCC; size: size of the resected tumor in cm; n. a. not assessed; \*this patient (ccRCC17) received a neoadjuvant treatment with sunitinib before the surgical treatment of his ccRCC

### 3.2 Immunhistochemische Antikörper (Supplementary file 2)

Aus Simon et al. 2020 entnommen (Originalpublikation, Supplementary file 2). Formatierung angepasst, englische Sprache belassen.

Supplementary table 2: IHC antibodies used for cell culture verification

title	host	dilution	distributor
PAX8 (MRQ-50) Mouse monoclonal antibody	Mouse	1:100	Cell Marque (Rocklin, USA)
anti-Vimentin-antibody	Mouse	1:5000	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
anti-CA9-antibody	Rabbit	1:8000	Abcam (Cambridge, UK)
anti-CD10-antibody	Rabbit	pre-diluted by distributor	Hoffmann-La-Roche (Basel, CHE)
anti-CK7-antibody	Mouse	1:500	Agilent Technologies
anti-AMACR-antibody	Rabbit	1:100	BioLogo (Kronshagen, GER)
anti-CD117	Rabbit	1:200	Abcam

### 3.3 RNA-Sequenzierung: Gene (Supplementary file 4 und 6)

Auszug aus den Supplementary-Daten der Originalpublikation (Simon et al. 2020), aus Excel formatiert, englische Sprache belassen.

Supplementary file 4: (Hochregulierte Gene, Anm. des Verfassers)

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
ARHGAP31	114,2202624	1,005221279	0,001717	0,052072
RNF121	114,5970425	1,005479449	0,000119	0,011478
NRXN3	68,97570984	1,006397134	0,449069	0,742082
HK1	401,5774559	1,007587339	0,000953	0,036779
FOXJ3	198,2557591	1,009117224	0,00164	0,051022
P4HA1	202,4894492	1,0108944	0,001115	0,040731
BSG	623,3187113	1,014187822	0,002985	0,07216
FOXP2	82,16756203	1,015246711	0,00048	0,024237
TMCC1	273,0466948	1,024065651	0,00059	0,027413
POU5F1	118,6373444	1,029235458	0,002469	0,064957
METTL26	283,2991339	1,038218892	0,00012	0,011478
LPCAT1	77,94151692	1,038653433	0,002649	0,067427
RPL10P6	1954,972397	1,04224392	0,000895	0,035274
ZNF865	31,23556158	1,052110126	0,000858	0,034745
ST13P2	83,41320402	1,052873899	0,000144	0,012107
EPS8	611,9281762	1,055846523	0,000158	0,012962
B9D2	42,15511773	1,05868005	0,000163	0,013135
HIPK2	1979,595408	1,062039353	4,87E-06	0,001257
PANTR1	161,2959081	1,063196189	0,000597	0,027619
GRB10	312,1670502	1,063417625	0,000173	0,013807
GAS2L1	134,5015189	1,068178288	6,09E-05	0,007493
TPI1	2219,220564	1,069846492	0,000366	0,020953
ORAI3	97,17579185	1,071677329	4,83E-05	0,006468
BX679664.1	568,3699467	1,073686039	0,00058	0,027163
BX248409.1	536,5135823	1,101332905	0,000495	0,02458

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
ABCA1	236,4512944	1,107119246	8,10E-05	0,008895
PSMB9	331,0732025	1,109371054	0,00101	0,037977
PNMA6A	90,7914001	1,112469531	0,00261	0,066897
AGPAT5	268,6508528	1,113022546	1,10E-05	0,002259
ADCY1	31,63020435	1,113689849	0,787134	0,923869
DARS	1282,861559	1,116767727	4,42E-06	0,00118
ZC3HC1	67,71333887	1,123105035	6,21E-05	0,007561
SERINC2	538,9608412	1,138226053	0,001626	0,050656
RPS28	6157,308998	1,145702375	0,000169	0,01353
AC243732.1	19,24977864	1,148018552	0,001313	0,044588
KCNMA1	127,4413926	1,149919223	0,002601	0,066868
FAM162A	548,9114896	1,15542423	0,00091	0,035465
CCND1	779,3723676	1,167457175	0,0009	0,035316
FUNDC2P2	35,83897144	1,174840822	0,000224	0,015886
PPP1R3B	114,4787835	1,17514917	0,0002	0,014926
SLC29A4	54,36765663	1,175359124	0,002553	0,066257
EPB41L4A-AS1	269,0378002	1,190652485	0,000338	0,020147
CIT	233,4083448	1,191398781	0,000805	0,033537
MXI1	462,91692	1,19387731	0,000124	0,011637
RIMKLA	56,93699819	1,203488197	0,002152	0,059881
HLA-A	4201,076456	1,243586797	0,00014	0,012006
EDA2R	40,31200922	1,245976814	0,000973	0,03701
PARVB	181,3408418	1,246667098	0,000327	0,019726
CAV1	1150,104615	1,254097011	0,000423	0,022663
LEPROTL1	228,1246216	1,256814867	0,00013	0,011637
SEMA4B	133,0914324	1,262269676	0,158555	0,486463
TMEM38A	48,54109373	1,275458598	0,016357	0,175201
SNTA1	92,86055926	1,300146179	0,000352	0,020695
LINC02609	6,800363873	1,320343666	0,003475	0,077828

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
HLA-B	5465,21326	1,323947066	0,000393	0,021595
AC011529.1	112,4094442	1,325188819	6,74E-06	0,001632
LGALS3	1066,696156	1,338342139	0,001147	0,041223
TP53I11	84,7348128	1,34341271	0,000839	0,034217
HLA-C	1932,578684	1,347514952	0,001192	0,042153
FUT11	454,7996	1,348680216	0,000139	0,012006
PPFIA4	25,71059655	1,358596957	0,002917	0,071341
DYSF	141,3785686	1,362295445	0,002169	0,05995
NUPR1	452,4866625	1,379880969	0,00044	0,023235
LIN7A	146,2099113	1,379905308	0,001476	0,047818
KCNK3	181,0218861	1,383583126	0,003091	0,073659
AC016925.1	30,75085462	1,384718634	0,000608	0,028008
SEMA5B	132,2762325	1,390705336	0,003147	0,074436
HLA-H	8,596835199	1,40702481	0,001036	0,038687
RINL	36,37679605	1,410830789	9,87E-06	0,00207
VEGFB	267,5664433	1,417814872	3,45E-06	0,000943
GPER1	117,0762739	1,417999163	0,002437	0,064328
GRINA	567,4614786	1,418658517	1,46E-05	0,002904
AL731533.2	7,813654383	1,428039351	0,001379	0,046083
BHLHE41	273,8142552	1,430533609	0,001048	0,039006
HPCAL1	668,1438589	1,44790535	7,07E-05	0,008099
SLC15A4	228,677458	1,449603414	4,88E-05	0,00647
EFNA3	12,59309202	1,450873907	0,003095	0,073664
HIST1H4H	17,16772703	1,451588949	0,000872	0,035041
PFKFB4	23,50386872	1,46775032	0,001403	0,046752
SLC2A1	335,2855689	1,476921295	0,001617	0,050586
GAPDHP65	54,18589003	1,518958975	0,000818	0,033739
NLGN1	93,31864416	1,52198477	0,000249	0,016929
POU5F1B	106,2841647	1,525197471	0,00037	0,021053
RPLP1P6	6,561311335	1,539193514	0,000549	0,026384

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
LHFPL2	114,5160814	1,544709758	5,64E-06	0,001411
PPP1R3C	82,83838775	1,578335212	0,000141	0,012006
BNIP3P1	311,0976993	1,583626276	6,84E-05	0,008039
RNASET2	609,3997453	1,583928253	0,000551	0,026406
ADCY5	72,73461271	1,585766235	0,000213	0,015488
ANGPT2	424,2934948	1,587918803	0,001519	0,048776
PFKP	720,7985403	1,592241753	8,63E-05	0,009284
ITGA6	1012,563912	1,593553077	1,94E-06	0,000642
CYGB	114,2514562	1,609462834	0,000302	0,018974
TBX15	16,8232291	1,620394393	0,002506	0,065506
RBP7	149,0114015	1,622244649	8,24E-05	0,00901
SMPDL3A	55,45428728	1,628780773	7,97E-05	0,008829
HRH2	101,7247433	1,628974229	0,000719	0,03135
TPRG1	6,791987912	1,64988319	0,111248	0,421372
KCNE3	138,7666706	1,662641397	0,00145	0,047314
LDHA	4271,371862	1,669884674	0,000181	0,014022
USP3-AS1	4,964354236	1,67301487	0,003039	0,073091
PDK1	141,0441294	1,697838306	1,52E-07	9,38E-05
FBXL16	47,8967808	1,703844294	0,000252	0,017016
TMEM91	93,47927578	1,704873678	0,000413	0,022217
AC016405.3	3,121040843	1,72331503	0,003536	0,078524
GAS2L3	121,9054613	1,735897156	0,000163	0,013135
SDCBP2	18,5200795	1,740907969	0,606553	0,836699
TNFAIP8L3	6,963141795	1,749892929	0,28515	0,617132
HSF4	31,05315235	1,76120593	0,000601	0,027724
TFR2	3,043228805	1,761534012	0,622965	0,845759
GPR4	59,78952547	1,765832432	0,000356	0,020762
RPL3P12	2,471457174	1,775868705	0,003406	0,07709
GDF6	17,46496827	1,777675242	0,00241	0,063985
NNMT	1426,262435	1,778180433	0,001192	0,042153

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
GLDN	8,921225424	1,780067765	0,534659	0,796867
PKIA	113,245624	1,79818442	0,000896	0,035274
AC008132.1	69,43761845	1,800940504	0,5738	0,819491
BNIP3	972,3115771	1,808042693	3,18E-06	0,000899
APLN	135,8215527	1,808841073	0,00011	0,010969
TMC5	2,827435533	1,820540937	0,002134	0,059585
AC136616.1	35,32656927	1,823856261	3,79E-05	0,005599
HPR	6,811851376	1,842154463	0,043845	0,283085
ENO2	275,2667054	1,844512316	0,000252	0,017016
VEGFA	1407,191337	1,85241039	4,55E-05	0,00633
SAP30	85,50959204	1,858753729	0,000136	0,011952
CDCA2	98,26845971	1,874927422	0,001413	0,046781
SLCO4A1	78,52155127	1,885098727	0,817928	0,937014
SLC6A10P	32,75869713	1,891937193	8,53E-05	0,009278
CD36	217,9981512	1,911907441	0,001181	0,042032
NRN1	23,61991906	1,915153074	0,475444	0,758508
DOC2A	32,11200858	1,91594913	0,001487	0,047995
ADRB1	21,09305437	1,916258236	0,384605	0,697046
C2orf72	24,47762766	1,930970031	0,000127	0,011637
TMEM158	34,14814532	1,934676871	0,045816	0,288644
B3GNT4	24,57402843	1,953993191	0,001097	0,040244
ZNF395	927,0583743	1,963326656	1,68E-07	0,000101
AC022968.1	5,057012717	1,964060535	0,000611	0,028075
SEMA3F	110,3698231	1,974978644	1,24E-06	0,000469
APOLD1	475,1541233	1,980136823	0,000403	0,021808
UNC5D	10,09701663	1,983920303	0,235727	0,570853
LAMA4	393,4196851	1,988905285	5,93E-05	0,007451
ADCYAP1	6,614770026	1,994757	0,304782	0,634883
ENPP2	497,6847383	2,044057846	0,000813	0,033722
ACTG1P9	4,942348783	2,07064432	0,19463	0,527178

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
KRBA1	107,7061475	2,082258153	2,48E-06	0,000776
SCN1A-AS1	15,56575977	2,101021004	0,001417	0,046832
IRX3	641,0639399	2,101098426	0,000701	0,030847
APOC1P1	12,31985515	2,140200227	0,000858	0,034745
AC104958.2	6,957806564	2,16002598	0,321697	0,646461
SLC6A8	480,344346	2,166661985	5,47E-08	4,28E-05
C6orf223	56,19802995	2,17421202	0,001523	0,048776
POT1-AS1	51,82359301	2,186250158	0,000377	0,021053
CD8B2	32,5394781	2,199334951	0,002162	0,059905
SPINK13	17,21731133	2,201811044	0,001293	0,044162
ELAVL2	23,36150238	2,213483116	0,000788	0,033131
AC097534.2	64,44399903	2,219502298	3,53E-05	0,005381
SLC16A3	671,4838822	2,2622738	3,50E-06	0,000944
DARS-AS1	9,48231385	2,268295737	0,000644	0,029435
LINC01152	6,109385543	2,284725935	0,001471	0,047767
HHLA2	84,89766514	2,288604111	0,00039	0,021524
ADM	539,9553846	2,301453388	3,22E-09	5,41E-06
KRT223P	24,13506242	2,302395783	0,001152	0,041308
ACTBP2	5,792293507	2,308661372	0,405892	0,713518
GABRD	40,50634768	2,311891576	0,000769	0,032611
SPAG4	39,46455836	2,330326689	4,90E-05	0,00647
NMB	48,92258089	2,341609703	0,003117	0,073896
HEY1	81,91065315	2,341765392	8,32E-06	0,001873
TMEM45A	86,1932316	2,345078349	0,00052	0,02547
TIMD4	9,94571474	2,350237413	0,160166	0,488208
AC244107.1	252,3587289	2,356530499	6,69E-09	9,82E-06
HAPLN1	24,95513965	2,358704843	0,001123	0,040797
EBF2	32,08960096	2,36313537	0,000155	0,012841
NDRG1	7478,021522	2,399257616	2,74E-09	4,95E-06
LINC00887	31,08746345	2,468445066	0,000315	0,019353

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
ADSSL1	120,3546982	2,484941109	2,83E-05	0,004624
AC103760.1	3,670522281	2,49476608	0,001697	0,051771
HMOX1	216,3552674	2,529168545	3,56E-07	0,000182
COL23A1	90,94204169	2,564185957	0,00022	0,015789
IGFBP3	598,9165732	2,564735755	1,77E-06	0,000619
AC092354.2	4,339221369	2,660720244	0,000457	0,023553
MIR210HG	66,44581197	2,663031637	9,46E-07	0,000381
CPA6	2,890679278	2,667210598	0,001315	0,044588
GADD45G	50,35270152	2,723317786	0,343906	0,666009
PLIN2	2255,975834	2,732371622	1,27E-07	8,23E-05
AC005099.1	2,35623784	2,760734153	0,000859	0,034745
RPL21P5	2,609580388	2,762610093	0,00067	0,030092
MGARP	2,745985731	2,782151879	0,189546	0,522095
STXBP6	11,97132189	2,784810436	0,882371	0,959235
EIF1P3	3,314137227	2,789688901	0,000255	0,017135
GAL3ST1	126,8552125	2,793492032	6,88E-06	0,00165
ATP2B2	26,89414669	2,80566792	0,000372	0,021053
AL109615.3	27,46133058	2,806337179	6,97E-05	0,008069
SCARB1	163,5950736	2,825137832	1,01E-08	1,32E-05
CREG2	5,748264362	2,844800508	0,048849	0,29661
NXPH4	19,722536	2,865061358	7,48E-06	0,001706
DHRS2	15,24245988	2,878758884	0,612072	0,840135
AC018553.1	9,305779746	2,911437484	0,001536	0,049031
ENPP3	111,4705138	2,934593377	9,94E-05	0,010332
TNFAIP6	134,1043444	2,946594561	4,76E-05	0,006459
CP	187,2528067	2,947691347	0,000197	0,014801
MSX2	3,420394566	2,989476499	0,000437	0,023109
MYOCOS	71,43930579	2,999773406	7,34E-07	0,000345
IL20RB	26,40482844	3,010966438	0,000119	0,011478
CCL18	12,06964187	3,092272259	0,000547	0,026345

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
UNC5B-AS1	4,335101079	3,106677901	0,891825	0,962095
KCNK9	16,24501435	3,135121906	0,000106	0,010802
DGCR5	41,05692296	3,147705994	3,21E-05	0,005054
ESM1	531,8564808	3,216303906	1,71E-05	0,003132
TMEM255A	30,00994631	3,2377989	0,02027	0,195742
CRTAC1	9,488531693	3,255548678	0,48387	0,764476
INHBB	268,4955649	3,265664454	3,12E-06	0,000899
BAALC	8,545449854	3,300871988	0,583539	0,825024
EGLN3	399,1370373	3,403871587	1,25E-08	1,34E-05
BIRC7	9,671873247	3,43333582	0,0224	0,204988
DNAH11	130,2820824	3,537557492	2,82E-06	0,000829
APOB	10,12021706	3,568754916	0,27954	0,611925
RAB3C	4,339004513	3,716171286	0,01055	0,143065
APOC1	317,0363961	3,74144769	4,14E-08	3,47E-05
MT3	31,49045423	3,749992772	0,000893	0,035274
B4GALNT1	4,97330834	3,778048327	0,02921	0,23425
PGF	234,1135981	3,79943661	7,46E-06	0,001706
SFTPB	6,640921468	3,804385955	0,23201	0,567111
ITGA6-AS1	4,260596718	3,892556349	0,00077	0,032611
FATE1	4,613859589	4,028286831	0,00024	0,016457
IGFBP1	39,51210382	4,084208926	0,00082	0,033739
AL033384.1	4,883058883	4,157836215	0,000128	0,011637
AC021744.1	37,69019583	4,256029364	0,000464	0,023797
PEG13	13,25902777	4,28244602	0,000216	0,015614
ANGPTL4	1514,075634	4,35955771	1,17E-11	6,85E-08
HILPDA	921,7002915	4,385147629	2,28E-12	1,79E-08
CYP2J2	88,45730829	4,512851651	9,56E-07	0,000381
TRAV30	21,47203251	4,550071019	3,25E-05	0,005083
KISS1R	25,95578013	5,17229123	0,002519	0,065623

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
EGFR-AS1	19,22666212	5,197907304	5,41E-07	0,000259
AC079760.2	11,31140108	5,213119684	4,63E-05	0,00633
NDUFA4L2	216,1186434	5,323497972	1,24E-08	1,34E-05
LINC00462	11,04966032	5,346968269	4,58E-05	0,00633
AL021328.1	7,85706824	5,979911315	0,000122	0,011522
SLC6A3	86,09557208	6,072941338	7,14E-06	0,001678
RF00601	3,738568223	6,467015982	0,000173	0,013807
PNCK	107,0207319	6,717967286	3,68E-08	3,31E-05
NPTX2	23,93724923	6,968771538	1,99E-06	0,000649

Supplementary file 6: Herunterregulierte Gene (Anm. Des Verfassers)

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
OLFM4	13,55821	-8,04974	3,11E-14	3,66E-10
TMPRSS4	45,26381	-5,31114	2,60E-18	6,10E-14
AGR2	12,88713	-4,93753	4,36E-10	1,03E-06
GRIK2	4,681182	-4,50482	1,88E-05	0,003319
AC022431.1	6,197263	-4,37153	3,14E-06	0,000899
SLPI	151,2852	-4,24352	1,21E-08	1,34E-05
AC007906.2	18,58053	-3,9653	2,15E-10	6,32E-07
KLK6	8,730544	-3,90984	0,007982	0,124355
CLDN16	58,64339	-3,90302	1,57E-09	3,36E-06
PTGER1	37,07626	-3,83508	4,36E-07	0,000216
AC093809.1	5,754833	-3,74492	0,086835	0,380208
FAM222A-AS1	4,106012	-3,63346	7,75E-05	0,008671
LCN2	52,90515	-3,54163	6,02E-05	0,007493
CR2	4,428424	-3,49198	0,000134	0,011832
CLDN19	43,12239	-3,43226	1,47E-05	0,002904
CDH3	55,9254	-3,39416	8,15E-07	0,000355
AC009879.1	5,050109	-3,34137	3,14E-05	0,005024

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
PROM1	182,4151	-3,24103	7,86E-07	0,000349
SFRP1	399,7348	-3,21367	2,15E-11	1,01E-07
NUDT10	5,881059	-3,19708	1,90E-07	0,000109
TCEAL2	42,06496	-3,19309	1,97E-10	6,32E-07
CXCL1	85,22844	-3,18983	1,81E-07	0,000107
AC008750.5	4,609398	-3,17565	0,000129	0,011637
AP000879.2	4,737288	-3,09919	0,000212	0,015459
ILK	7,025123	-2,90581	4,99E-05	0,006555
CLEC4M	4,914001	-2,87597	4,11E-05	0,005895
ITGB6	108,0312	-2,78381	9,41E-07	0,000381
FZD10-AS1	6,749442	-2,74122	3,20E-05	0,005054
LMX1B	7,631358	-2,56197	8,65E-05	0,009284
JPH4	5,93464	-2,44173	0,0001	0,010332
AL157938.3	7,57808	-2,43345	8,55E-06	0,001878
AC092718.7	6,500951	-2,42567	2,41E-05	0,004098
AIF1L	569,9566	-2,42416	3,68E-10	9,60E-07
COL16A1	25,13147	-2,3855	7,38E-06	0,001706
KIF6	9,526765	-2,38234	8,00E-05	0,008829
FMN2	12,01478	-2,36254	0,00041	0,022157
TSPAN2	32,29957	-2,32948	4,63E-06	0,001221
PROZ	15,29777	-2,31244	0,001259	0,043626
KLK10	6,7604	-2,25815	2,36E-05	0,004043
ZNF90P1	5,705273	-2,25057	0,00013	0,011656
AC090198.1	11,85624	-2,20012	0,000279	0,017994
HOGA1	70,06507	-2,18028	2,67E-06	0,000804
C2orf40	41,59485	-2,17711	0,000757	0,032327
FBLN5	233,9757	-2,16737	4,55E-05	0,00633
OR2B11	11,87163	-2,16078	0,000543	0,026325
AC130352.1	17,28605	-2,15434	0,00022	0,015789
AC008676.1	21,52841	-2,14092	1,57E-05	0,00302

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
MT-CYB	153610,2	-2,13604	6,64E-05	0,007883
CXCL2	18,47044	-2,10244	0,000256	0,017161
LONRF3	23,19432	-2,10152	0,00011	0,010969
GDF7	34,92011	-2,07087	0,000287	0,018278
MTND4P24	12,75118	-2,07001	0,000231	0,016102
MTCO2P2	9815,472	-2,04164	0,000106	0,010781
SSC4D	5,175708	-2,03873	0,00013	0,011637
AL138921.2	4,2495	-2,03727	0,001221	0,04289
PLAT	299,5563	-2,03273	2,59E-06	0,000791
AC079336.5	11,21584	-2,0072	0,000323	0,01954
AC027796.1	27,61708	-2,0012	0,000447	0,023464
GSTM5	15,19173	-1,98369	0,001323	0,044786
USP44	18,97752	-1,97596	0,000179	0,013981
SIM2	71,72035	-1,96939	9,67E-05	0,010142
MAP6	20,65002	-1,96491	0,000502	0,024786
TCIM	100,0732	-1,94454	9,81E-08	6,98E-05
IGFBP2	109,7877	-1,94087	1,50E-05	0,002925
ATF3	273,1687	-1,94009	0,000264	0,017449
AC092139.3	48,56282	-1,93516	0,001541	0,049031
SNORA68B	4,926644	-1,92273	0,000882	0,03524
MTND4P12	5115,271	-1,91544	4,82E-05	0,006468
VWA2	11,3455	-1,91521	0,0005	0,024786
CXCL3	10,16447	-1,90371	0,000185	0,014136
MMP7	374,3337	-1,9012	0,000862	0,034757
AC103810.5	18,38055	-1,89786	0,000481	0,024267
CYP1B1	322,1733	-1,88517	9,74E-07	0,000381
MTRNR2L10	794,1522	-1,86952	0,000116	0,01137
MOXD1	59,49671	-1,86588	0,000358	0,020779
RN7SKP9	7,688274	-1,86053	0,544417	0,802435
LAD1	75,67744	-1,83611	0,000703	0,030894

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
MT-ND4	181734,1	-1,82246	0,000111	0,011002
SH2D3A	39,92191	-1,82105	3,32E-05	0,005164
AL121895.1	15,31039	-1,80394	0,000887	0,03524
COL4A5	40,65189	-1,80135	1,72E-05	0,003132
ART4	18,24721	-1,80074	0,000781	0,03295
MT-ND1	135778,5	-1,79026	0,000348	0,020668
CLDN14	5,247925	-1,78732	0,000456	0,023553
SLC15A2	56,14876	-1,78499	0,000299	0,018826
ELF3	366,4282	-1,77872	1,28E-07	8,23E-05
AC084357.2	4,72581	-1,77171	0,000742	0,031983
MYO3B	43,94553	-1,77069	7,69E-05	0,008641
MT-ND3	239780	-1,75152	0,000576	0,027071
MTCO2P12	39633,78	-1,73489	0,000319	0,019495
BTG2	354,992	-1,71119	4,19E-05	0,00596
MT-TM	266,2087	-1,69692	7,01E-05	0,008075
SYT5	4,964364	-1,68139	0,000359	0,020798
REC8	56,85714	-1,67802	3,77E-05	0,005599
NPNT	149,3421	-1,66447	0,000178	0,013981
AC020656.2	39,14415	-1,62426	0,000224	0,015886
MT1F	440,077	-1,61862	0,000469	0,023982
AC009078.3	33,50118	-1,61821	0,000233	0,016153
GPM6B	61,80809	-1,56977	9,06E-05	0,009542
MT-TE	2041,654	-1,53777	0,000423	0,022663
ABCA6	54,94142	-1,53478	0,002175	0,06006
AL133245.1	26,12031	-1,48791	0,00011	0,010986
MAGI2-AS3	212,7388	-1,47718	4,63E-05	0,00633
AC019080.1	45,47657	-1,46315	0,001719	0,052072
MST1	125,0497	-1,44109	8,95E-05	0,009473
CPA4	5,102629	-1,43634	0,719371	0,893578
AJAP1	51,97377	-1,43273	0,00069	0,030656

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
MTRNR2L3	45,60772	-1,42036	0,001563	0,049428
WNT2B	30,10518	-1,41294	6,54E-05	0,007804
MTND4LP30	42,34732	-1,40195	0,001669	0,051557
SPOCK1	139,7408	-1,39743	0,001562	0,049428
KLF4	28,32545	-1,39567	0,000769	0,032611
AC027290.2	115,0232	-1,39396	0,000402	0,021808
MT-CO1	56300,75	-1,38862	0,000892	0,035274
CCDC173	32,36908	-1,38819	0,002245	0,061602
AFAP1L2	117,3179	-1,3788	5,61E-05	0,00716
AL589935.1	36,08465	-1,37797	0,002016	0,057356
AC118344.1	22,44925	-1,37221	0,00033	0,019872
MTND5P11	2034,976	-1,37211	0,001	0,037695
MTND6P3	540,8228	-1,37112	0,001058	0,039266
RF00012	98,37143	-1,37064	6,78E-05	0,00801
PRELP	112,5564	-1,3645	0,003628	0,079288
NOC2L	21,85558	-1,34929	0,000214	0,015488
AC116535.1	9,962901	-1,34113	0,000143	0,012097
NEGR1	56,53262	-1,34056	0,000198	0,014801
AL356534.1	29,86241	-1,33843	0,001018	0,038149
KIF26B	26,13448	-1,33544	0,000485	0,024372
CXADR	212,1207	-1,33165	0,000112	0,011052
PYGO1	12,9191	-1,31716	0,000339	0,020147
NEURL3	24,62326	-1,30388	0,000129	0,011637
ZFHX2	50,70973	-1,3018	0,000124	0,011637
TSTD2	21,31315	-1,29294	0,001275	0,044002
EPCAM	568,478	-1,29284	0,000178	0,013981
ATP8B1	50,67832	-1,26707	0,000114	0,01116
GRHL1	21,81766	-1,24387	0,000656	0,029838
AC125807.2	25,78155	-1,24213	1,75E-05	0,003158
PLXNB1	142,5359	-1,23423	7,13E-06	0,001678

gene	baseMean	log2FoldChange	p value	p adjusted
PLEKHH2	208,6939	-1,22136	0,001711	0,05201
AC245297.2	39,81068	-1,21948	0,003172	0,074444
GSTM3	95,15009	-1,1827	0,001057	0,039266
MT-ND4L	13106,26	-1,15083	0,001548	0,049164
AP2A1	47,19903	-1,11839	0,001429	0,047043
LOXL1	82,21974	-1,10555	0,00092	0,035794
PHLDB1	37,38745	-1,10409	0,000934	0,036207
LMCD1	124,8156	-1,09862	0,000228	0,015986
GALNT3	24,8609	-1,09851	0,002622	0,067024
FAM171A1	174,3794	-1,08375	0,001366	0,045913
MTCO1P12	26832,11	-1,07317	0,002581	0,066671
AC009118.3	16,70637	-1,07127	0,000693	0,030657
PRKRA-AS1	41,96379	-1,05276	0,000393	0,021595
AL136115.1	20,40243	-1,04692	0,003686	0,080148
MT-RNR1	101538,3	-1,04557	0,004031	0,084025
LIN52	66,02242	-1,03537	0,000413	0,022217
PRICKLE1	46,8196	-1,02559	0,002844	0,070406
DISP2	18,09916	-1,02389	0,001253	0,043626
HOTAIRM1	34,90226	-1,02001	0,000363	0,020892

### 3.4 Primer für die *VHL*-Sequenzierung (Supplementary file 5)

Aus: Simon et al. 2020, Supplementary file 5. Formatiert, englische Sprache belassen.

Amplification:

Exon 1:

VHLe1 FW GAGCGCGTCCATCCTCTA

VHLe1 RV GCGATTGCAGAAGATGACCT

Exon 2:

VHLe2a FW AGGACGGTCTTGATCTCCTG

VHLe2a RV CTTACCACAAACAACCTTATCTTTT

Exon 3:

VHLe3 FW CCTTGTACTGAGACCCTAGTCTGTCACT

VHLe3 RV CAAGACTCATCAGTACCATCAAAAGCTG

Sequencing:

Exon 1:

VHLe1 S GCGTTCCATCCTCTACCGAG

VHLe1 AS GCTTCAGACCGTGCTATCGT

Exon 2a:

VHLe2a S ACAACCTTGCTTGCCCCGATA

VHLe2a AS AGATTGGATAACGTGCCTGACAT

Exon 2b:

VHLe2b S GCTGCATCCTAACACCCCCA

VHLe2b AS GCTGCATCCTAACACCCCCA

Exon 3:

VHLe3 S GGCAAAGCCTTGTTCGTT

VHLe3 AS CACAATGCCTAGTGAAGTCAGTT

## 4. Danksagung

Hiermit möchte ich mich nun, nach fast vier Jahren, gern bei den zahlreichen Menschen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter, Professorin Dr. Marieta Toma, nicht nur für die freundliche Überlassung des Themas, sondern auch für die durchweg exzellente Betreuung und die menschliche Unterstützung zu jeder Zeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meiner Laborgruppe, Laura Eßer, Dr. Vittorio Branchi, Kerstin Fuchs und Carsten Golletz, die mir nicht nur bei der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, sondern auch mit mir die Weinberge im Ahrtal erklimmen und mein Verständnis von Whisky und Weihnachtsfeiern im Labor grundlegend erweitert haben.

Ebenfalls danke ich Frau Cristina Göbel für die Unterstützung in der Anfangsphase der Dissertation bedanken.

Zudem möchte ich, neben Professorin Dr. Toma, auch Herrn Professor Dr. Kristiansen großen Dank aussprechen, der es mir nicht nur ermöglicht hat, im pathologischen Institut meine Dissertation anzufertigen, sondern auch auf diversen Kongressen erste Erfahrung im wissenschaftlichen Vortragen und Präsentieren zu sammeln.

Ich danke Herrn PD Dr. med. Stefan Hauser für die freundliche Übernahme der Tätigkeit als Zweitkorrektor.

Unermesslicher Dank gilt zudem meiner Familie und Maria, die mir mit vielen ermutigenden Gesprächen und viel Geduld in diesen Jahren stets zur Seite gestanden haben.

## **5. Lebenslauf**

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf in der Onlinepublikation nicht veröffentlicht.