

Die systematische Analyse der ATP binding cassette subfamily B im Nierenzellkarzinom identifiziert ABCB8 als prognostischen Biomarker mit malignitätsfördernden Eigenschaften im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Iulia Blajan

aus Cluj-Napoca/Rumänien

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Manuel Ritter
2. Gutachter: Prof. Dr. Ingo Schmidt-Wolf

Tag der Mündlichen Prüfung: 25.06.2024

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Manuel Ritter

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	10
1.3	Ergebnisse	19
1.4	Diskussion	23
1.5	Zusammenfassung	28
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	29
2.	Veröffentlichung	38
	Abstract	38
	Introduction	39
	Patients and Methods	39
	Results	40
	Discussion	44
	Conclusion	45
	References	45
3.	Anhang	47
4.	Danksagung	57

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette
<i>ACTB</i>	Actin Beta
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
ccRCC	clear cell renal cell carcinoma/ klarzelliges Nierenzellkarzinom
chRCC	chromophobe renall cell carcinoma/ chromophobes Nierenzellkarzinom
CSS	cancer specific survival/ krebsspezifisches Überleben
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
DNA	deoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Etylendiamintetraacetat
FBS	fetal bovine serum/ Fetales Kälbeserum
FGF	Fibroblast Growth Factor/ Fibroblasten-Wachstums
FSP1	ferroptosis suppressor protein 1
gDNA	genomic deoxyribonucleic acid/ genomische Desoxyribonukleinsäure
GLUT1	Glukosetransporter 1
GPX4	Glutathionperoxidase 1
HIF1A	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-alpha
HIF2A	Hypoxie-induzierbarer Faktor 2-alpha
IHC	Immunhistochemie
IMDC	International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium
KICH	chromophobe renall cell carcinoma/ chromophobes Nierenzellkarzinom
KIRP	papillary renal cell carcinoma/ papilläres Nierenzellkarzinom
LNA	locked nucleic acid
MHC	major histocompatibility complex/ Haupthistokompatibilitätskomplex

mRNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	mechanistic target of Rapamycin
NAT	native adjacent tissue/ normales paratumorales Nierengewebe
NTC	no template control
OS	Overall survival/Gesamtüberleben
PBS	phosphate-buffered saline/ Phosphatgepufferte Salzlösung
PFS	Progressionsfreies Überleben
PD1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death ligand-1
PDGF	platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
pRCC	papillary renal cell carcinoma/ papilläres Nierenzellkarzinom
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RCC	renal cell carcinoma/ Nierenzellkarzinom
RNA	ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure
RT	reverse transcription
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TAP	transporter associated with antigen processing
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMA	tissue microarray
TNM	Tumor, Nodus (Lymphknoten), Metastasen
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGFA	Vascular endothelial growth factor
VHL(-Gen)	Von-Hippel-Lindau-Gen

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Das Nierenzellkarzinom (RCC) stellt den weltweit häufigsten malignen Nierentumor des Erwachsenen dar. Mit einer stetig steigenden Inzidenz, mehr als 80.000 geschätzten Neudiagnosen und fast 15.000 Todesfälle für das Jahr 2023 in den USA macht das Nierenzellkarzinom 4,2% aller Krebserkrankungen aus (Siegel et al., 2023) . In Deutschland zeichnete das Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Institutes im Jahr 2018 9.350 Neuerkrankungen bei Männern und 5.480 Neudiagnosen bei Frauen auf. Somit stellte das Nierenzellkarzinom die neunthäufigste Tumorerkrankung in Deutschland dar (Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2021).

Rund 90% aller Nierenzellkarzinome werden drei histologischen Subtypen zugeordnet: Dazu gehören das klarzellige (ccRCC), das papilläre (pRCC) und das chromophobe (chRCC) Nierenzellkarzinom, wobei das ccRCC mit etwa 75% den häufigsten Subtypen darstellt (Chen et al., 2016). Charakteristisch für das sporadische ccRCC ist die somatische Mutation oder Deletion des Von-Hippel-Lindau-Gens und die damit einhergehende Akkumulation der Transkriptionsfaktoren Hypoxie-induzierter Faktoren HIF-1 α und HIF-2 α . Diese HIF-Transkriptionsfaktoren fördern die unkontrollierte Aktivierung unterschiedlicher Zielgene, die zum Beispiel den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet-derived growth factor (PDGF) oder den GLUT1 Glukose Transporter kodieren. Letztlich kommt dadurch eine Dysregulation verschiedener zellulärer Prozesse wie die Angiogenese, die Zellproliferation, die Glykolyse oder die Apoptose zustande (Hsieh et al., 2017; Linehan et al., 2019).

Das lokalisierte RCC kann durch eine Tumoroperation, partielle oder totale Nephrektomie, in kurativer Absicht behandelt werden.

Im metastasierten Stadium kann in bestimmten Fällen eine radikale Nephrektomie oder eine lokale Metastasektomie zur Reduzierung der Tumormasse und zur Linderung von Symptomen indiziert sein (Motzer und Russo, 2018; Dabestani et al., 2014). Die medikamentöse Systemtherapie steht jedoch im Vordergrund. Die aktuellen Studien und

Leitlinien empfehlen die Auswahl der geeigneten Medikamente oder Medikamentenkombinationen basierend auf den Risikogruppen des International Metastatic Renal Cell Cancer Database Consortium (IMDC) (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2023: S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms Langversion 4.0, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/nierenzellkarzinom/>, Zugriffsdatum 07/23, European Association of Urology, EAU Guidelines Office, Renal Cell Carcinoma, 2023 <https://uroweb.org/guidelines/renal-cell-carcinoma>, Zugriffsdatum 07/23). Zu den IMDC-Risikogruppen definierenden prognostische Faktoren zählen der Karnofsky-Performance Status (<80%), das Intervall zwischen Diagnosestellung und Therapiebeginn (<1 Jahr), das Hämoglobin (unterhalb des Normwertes), eine Hyperkalzämie sowie Neutrophile und Thrombozyten oberhalb des Normwertes. Daraus ergeben sich drei Risikogruppen; günstiges (0 Risikofaktoren), intermediäres (1-2 Risikofaktoren) und ungünstiges Risikoprofil (≥ 3 Risikofaktoren) (Heng et al., 2013).

Zu den eingesetzten Substanzklassen gehören Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sunitinib, Pazopanib, Axitinib, Cabozantinib, Lenvatinib und Tivozanib, die eine zielgerichtete Blockade der intrazellulären Tyrosinkinasen der PDGF-, VEGF- oder Fibroblast Growth Factor (FGF) Rezeptoren bewirken. Dadurch wird die Angiogenese, als bekannter Treiber des Tumorwachstums, der Entstehung von Metastasen und des Tumorprogresses, gehemmt (Chowdhury und Drake, 2020). Des Weiteren finden Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) wie Ipilimumab, Nivolumab, Pembrolizumab oder Avelumab Anwendung in der Therapie des metastasierten RCC. Diese monoklonalen Antikörper blockieren bestimmte regulatorische Proteine auf der Oberfläche von T-Zellen, wie das Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) oder Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4). Durch die Blockade von PD-1 oder CTLA-4 wird deren inhibitorische Wirkung auf der T-Zell-vermittelten-Immunantwort aufgehoben. Es resultiert eine indirekte Aktivierung der T-Zelle und eine Potenzierung der Tumorabwehrreaktionen.

Ein weiterer Therapieansatz besteht aus der Inhibition der Serin/Theronin Kinase mechanistic target of Rapamycin (mTOR). mTOR ist eine intrazelluläre Komponente des PI3K/AKT-Signalweges und spielt eine Schlüsselrolle in der Steuerung verschiedener zellulärer Prozesse wie die Proteinbiosynthese, Zellproliferation und -wachstum,

Angiogenese, und die Hemmung der Apoptose. Bei RCC liegt häufig eine übermäßige Aktivierung des PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges durch Genmutationen einzelner Komponenten vor, sodass mTOR-Inhibitoren wie Everolimus und Temsirolimus das Wachstum und die Vermehrung der Tumorzellen verlangsamt und die Tumorprogression verhindert. (The Cancer Genome Atlas Network, 2013; Tian et al., 2019).

Der humanisierte monoklonale gegen VEGF-gerichtete Antikörper Bevacizumab wird ebenfalls als Kombinationstherapie mit Interferon alpha verabreicht.

Die aktuell empfohlene Erstlinientherapie besteht für alle IMDC Risikoklassen aus einer Kombination eines ICI mit einem TKI (Nivolumab/Cabozantinib, Pembrolizumab/Axitinib, Pembrolizumab/Lenvatinib oder Avelumab/Axitinib). Für die intermediären und ungünstigen Risikoprofile wird zudem die Kombination zweier ICIs (Ipilimumab/Nivolumab) empfohlen. Studien haben gezeigt, dass diese Kombinationstherapien gegenüber Monotherapien mit TKI überlegen sind, daher kommen Letztere nur bei ICI-Kontraindikationen oder Unverträglichkeiten zum Einsatz (Motzer et al., 2019a; Motzer et al., 2019b; Rini et al., 2019; Motzer et al., 2021; Choueiri et al., 2021).

Therapien mit mTOR-Inhibitoren und die Kombination Bevacizumab/Interferon alpha haben sich ebenfalls im Vergleich zu den ICI-basierten Kombinationstherapien als unterlegen erwiesen, sodass sie als Alternative gelten falls eine ICI Therapie nicht möglich ist, oder werden in der Zweitlinientherapie angewendet (Ljungberg et al., 2022).

Bei Versagen der Erstlinientherpien erfolgt eine individuelle Sequenztherapie, in Abhängigkeit der zuvor verabreichten Medikamente. Eingesetzte Substanzen sind Nivolumab, Cabozantinib, Sunitinib oder ein anderer TKI sowie die Kombination Lenvatinib/Everolimus (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF: S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 4.0, 2023, AWMF-Registernummer: 043-017OL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/nierenzellkarzinom/>; Zugriffsdatum 07/23).

Zwar führte der klinische Einsatz der Immun-Checkpoint- und Tyrosinkinaseinhibitoren zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose des metastasierten ccRCC, viele Patienten sprechen jedoch nicht auf diese Therapieschemata an, entwickeln therapielimitierende Nebenwirkungen oder letztendlich eine Chemoresistenz (Sharma et al., 2021).

Die Superfamilie der ATP-binding cassette (ABC) Transporter nimmt bekannterweise eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von Chemoresistenzen in unterschiedlichen Krebserkrankungen ein (Bak et al., 1990; Goldstein et al., 1989; Gottesman, 2002). Bestehend aus 7 Subfamilien, mit 49 bekannten Genen und mehr als 250 kodierten Proteinen, repräsentiert sie die größte Familie der transmembranären Proteine, die unter anderem auch die Fähigkeit besitzen, Chemotherapeutika aus der Zelle zu schleusen und somit deren effektive intrazelluläre Konzentration gering zu halten. Ein solcher Efflux antineoplastischer Wirkstoffe wird als Hauptmechanismus der Entwicklung von Chemoresistenzen angesehen (Pérez-De Marcos et al., 2021).

ABCB1 oder MDR1 (multidrug resistance protein 1) wurde als erster ABC-Transporter charakterisiert und gilt als einer der wichtigsten Vermittler einer Chemoresistenz in mehreren Tumorerkrankungen (Goldstein et al., 1989). Zudem scheinen manche Genpolymorphismen von ABCB1 die Pharmakokinetik verschiedener Chemotherapeutika bei Brustkrebs zu beeinflussen (Tulsyan et al., 2016). Weitere Studien berichten von einem Einfluss der ABCB1 Genpolymorphismen sowohl auf die hämatologische Toxizität als auch auf das Ansprechen auf Sunitinib in der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms (Chu et al., 2015; Chae et al., 2016). Es wurden zudem direkte Interaktionen zwischen ABC-Transporter wie ABCB1 mit TKIs wie Sorafenib, Sunitinib oder Pazopanib beschrieben und als Ursache für Resistenzmechanismen diskutiert (Beretta et al., 2017).

Es wird vermutet, dass die ausgeprägte intrinsische Chemoresistenz des Nierenzellkarzinoms auf die hohe Expression verschiedener ABC-Transporter, darunter auch ABCB1, zurückzuführen sei (Robey et al., 2018; Goldstein et al., 1989; Walsh et al., 2009; Gottesman, 2002). Die unterschiedlichen Ansprechraten auf die systemischen Therapien und die zugrundeliegenden Resistenzmechanismen sind noch nicht völlig geklärt und die Behandlung des Nierenzellkarzinoms in metastasiertem Stadium stellt eine klinische Herausforderung dar. Ein verbessertes Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen für Therapieresistenz, insbesondere gegenüber den intrazellulär wirksamen TKI, könnte ein Startpunkt für die Entwicklung effektiverer Therapiekombinationen sein.

Das Ziel dieser Studie bestand darin, eine umfassende Genexpressionsanalyse der ABC-Transporter-Subfamilie B (ABCB) im Nierenzellkarzinom durchzuführen, um prognostisch relevante ABCBs zu identifizieren, die mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind. Die Genexpressionsprofile der Gene *ABCB1* bis *ABCB10* wurden mithilfe der verfügbaren Datensätze des ccRCC, pRCC (KIRP) und chRCC (KICH) aus der "The Cancer Genome Atlas" (TCGA)-Datenbank analysiert. Die Expressionsmuster wurden mit den Gesamtüberlebensdaten der Patientenkohorten korreliert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf *ABCB8* gelegt, das als bedeutsamer Vorhersagefaktor für eine schlechte Prognose identifiziert wurde.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 TCGA Daten

Die Datensätze der TCGA Transkriptom-Sequenzierung für *ABCB1-10*, *HIF1A*, *HIF2A*, *VEGFA*, *GPX4*, *FSP1* und die dazugehörigen klinischen Angaben wurden mittels des Genom-Browsers Xena der University of California, Santa Cruz (UCSC) heruntergeladen. Die Daten stammten von ccRCC, 290 KIRP, 66 KICH und 72 paratumoral entnommenen normalen Nierengeweben (NAT) (Weinstein et al., 2013; The Cancer Genome Atlas Network, 2013; Davis et al., 2014; Linehan et al., 2016). Für die Untersuchung des biallelischen Verlustes des VHL-Gens in der ccRCC TCGA-Kohorte wurde dessen Mutationsstatus mithilfe der cBioPortal Webseite überprüft (<http://cbioportal.org>) (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013). Gemäß der in der Literatur vorhandenen Empfehlungen wurden als Endpunkte der Überlebensanalysen das progressionsfreie (PFS), krebsspezifische (CSS) und Gesamtüberleben (OS) definiert und bewertet (Liu et al., 2018).

Die Microarray-Datensätze der VHL-exprimierenden und -defizienten RCC4 Zelllinien (RCC^{VHL+} und RCC^{VHL-}) unter Normoxie, nach schrittweiser Hypoxie (<0,01% Sauerstoff) und nach Reoxygenierung (Stanford Denko EOS Human 35K Genechip v1.1) wurden über die Gene Expression Omnibus Datenbank heruntergeladen (Papandreou et al., 2006).

1.2.2 Patientenproben

Die Gewebeproben wurden im Rahmen von partiellen oder radikalen Nephrektomien bei Patienten mit Nierentumoren entnommen und prospektiv in der Biobank des Zentrums für Integrierte Onkologie des Uniklinikums Bonn verarbeitet und archiviert. Es wurden 152 Proben verwendet, 102 davon stammend von Patienten mit einem ccRCC und 50 normale Nierengewebsproben. Die Präparate wurden schockgefroren und nach Makrodissektion bei -80°C gelagert. Die Begutachtung wurde nach Färbung mit Hematoxylin-Eosin-Färbung von einem Uro-Pathologen durchgeführt. Das Staging erfolgte anhand der 7. Edition der TNM-Klassifikation. Die klinisch-pathologischen Parameter der Patienten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Durchführung dieser Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn genehmigt (Lfd. Nr. 273/18).

1.2.3 RNA Isolierung

Die Isolierung der RNA aus Tumorgewebe wurde mit dem mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Foster City, CA, USA), gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 50 mg tiefgefrorenes Tumorgewebe zerkleinert und mit einer Mischung aus Lysis- und Bindungspuffer homogenisiert. Die Extraktion erfolgte durch Hinzugabe einer Lösung von Acid-Phenol und Chloroform sowie anschließender Zentrifugation zur Phasentrennung. Die wässrige, RNA beinhaltende Phase wurde nach Mischung mit Ethanol und mehreren Filtrationsschritten auf einer Glasfiltersäule aufgereinigt und im Anschluss eluiert. Um eine DNA-Kontamination auszuschließen wurden die RNA-Proben zweimalig mit einer DNase (DNA-free Kit, Ambion) behandelt und anschließend bei -80°C gelagert.

Die Isolierung der RNA aus Zelllinien erfolgte mit dem Total RNA Purification Mini Spin Column Kit (Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, DE). Dafür wurden tiefgefrorene Zellpellets unter kontinuierlicher Kühlung auf Stickstoffeis mit einem 1% β -Mercaptoethanol-haltigen Lysispuffer gemischt. Die Zugabe von Ethanol und die Überführung des Lysats auf einer Aufreinigungssäule bewirkte die Bindung der RNA an der Membran der Aufreinigungssäule. Durch drei sequenzielle Wasch- und Zentrifugierschritte mit zwei unterschiedlichen Reinigungspufferlösungen wurden

Verunreinigungen und Enzyminhibitoren entfernt. Im letzten Schritt wurde die aufgereinigte RNA mit einem Elutionspuffer aus der Membran gelöst. Auf einen DNase Verdau wurde bei der RNA Isolierung der Zelllinien verzichtet, da für die im Anschluss geplante reverse Transkription eine genomische DNA Eliminierung vorgesehen war.

Die Qualität und Konzentration der RNA Proben wurden mit dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) bestimmt.

1.2.4 cDNA Synthese

Die isolierte RNA der kryokonservierten Tumorproben der ccRCC Kohorte (Tabelle 1) wurde unter Verwendung des PrimeScript RT Reagent Kits mit gDNA Eraser (Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, France) in komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben. Dabei wurde eine Lösung von 1000 ng RNA mit 7 µl RNase-freiem Wasser gefertigt. Die Eliminierung der genomischen DNA erfolgte durch die Zugabe von 1 µl gDNA Eraser, 2 µl Eraser Puffer und anschließender Erhitzung der Mischung auf 42°C für 2 Minuten in einem Thermocycler (Professional Trio, Fa. Analytical Jena). Die Reverse Transkriptionsreaktion wurde nach Hinzugabe von 1 µl RT-Enzymmix, 4 µl Prime-Script-Puffer, 1 µl RT-Primer Mischung und 4 µl RNase-freiem Wasser durchgeführt. Die entstandene Lösung wurde für 15 Minuten auf 37° C inkubiert und nachfolgend für 5 Sekunden auf 85° C erhitzt. Das Gesamtvolumen einer cDNA-Probe betrug 20 µl mit einer Konzentration von 50 ng/µl. Eine Negativkontrolle der reversen Transkriptionsreaktion bestand aus einer noRT-Probe, bei der der RT-Enzymmix durch RNase-freies Wasser ersetzt worden ist.

Für die darauffolgende Polymerasekettenreaktion wurden die cDNA-Proben auf eine Endkonzentration von 5 ng/µl verdünnt und bei -20° C gelagert.

1.2.5 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR für die Bestimmung der mRNA Expression in der ccRCC Kohorte erfolgte mit 5 ng cDNA, 1x SYBR Premix Ex Taq II with ROX Plus (Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, France) und Primer in Konzentration von 10 pmol/µl. Die Spezifität der Primer wurde mit cDNA Proben aus Tumorgewebe, Normalgewebe, einer no-template control (NTC), einer noRT-Probe und einer genomischen DNA-Probe

getestet. Die Effizienz der Primer wurde anhand einer Standardverdünnungsreihe ermittelt. Alle Proben wurden als Triplikate angesetzt und analysiert. Die PCR-Experimente wurden mit dem ABIPrism 7900 HT Fast Real-Time PCR-System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die Auswertung der relativen mRNA-Expression wurde mit dem Programm Qbase+ (Biogazelle) nach der $\Delta\Delta$ Ct Methode durchgeführt im Verhältnis zu den Referenzexpressionen der Gene *ACTB* und *PPIA*.

Für die Validierung der *ABCB8* Knockdowns und der davon potenziell beeinflussten Genexpressionen von *HIF1A*, *HIF2A* und *VEGF* wurde die quantitative real-time PCR mit dem QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific) ausgeführt. Dafür wurden 5 ng cDNA mit dem 1x SYBR Premix Ex Taq II with ROX Plus und Primer in Konzentration von 10 pmol/ μ l vermischt. Die Normalisierung erfolgte in Bezug auf die *ACTB* Genexpression und die Quantifizierung erfolgte nach der $\Delta\Delta$ Ct Methode. Es wurden folgende Primer Sequenzen benutzt: *ABCB8* forward: 5'-CTGTCAGGTACTCTGATGGCT-3' und reverse: 5'-TCCATCTGGGAGCTAGGGG-3', β -Actin forward: 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3' und reverse: 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3', *HIF1A* forward: 5'-TGGCTGCATCTCGAGACTTT-3' und reverse: 5'-GAAGACATCGCGGGGAC-3', *HIF2A* forward: 5'-GCTGACAAGGAGAAGAAAAGGAGT-3' und reverse: 5'-TGGGCCAGCTCATAGAACAC-3', *VEGFA* forward: 5'-AGCTGCGCTGATAGACATCC-3' und reverse: 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3'.

1.2.6 Western Blot

Die Überprüfung des *ABCB8* Knockdowns auf translationaler Ebene in den ccRCC Zelllinien erfolgte durch Western Blot Analysen. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, die Zellpellets mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und in 50 μ l Zellysepuffer (Cell Signaling, Cambridge, Vereinigtes Königreich) mit Complete Mini EDTA-freiem Proteaseinhibitor (Roche, Basel, Schweiz) homogenisiert. Die Proteinquantifizierung erfolgte mithilfe eines BCA-Protein-Assay-Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) gemäß den Angaben des Herstellers. Die spektrophotometrische Messung der Proteinabsorption erfolgte bei 562 nm und die

Konzentrationen wurden anhand einer Standardverdünnungsreihe berechnet. Nach Beladung der Proben in dem NuPAGE 4-12% Bis Tris Midi Gel erfolgte die Trennung in einem XCell4 SureLock Electrophorese System (Life Technologies) für eine Stunde unter einer konstanten Spannung von 200 V. Im nächsten Schritt wurden die in dem Gel aufgetrennten Proteine auf eine 0,2 µm dicken Nitrocellulose Membran nach der Semi-Dry-Blotting Methode transferiert (iBlot Gel Transfer Stacks und iBlot Dry Blotting System - Life Technologies). Der Transfer wurde anschließend mit der unspezifischen Ponceau-S-Färbung validiert und dokumentiert. Auf das Entfärben der Membran folgte die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit einer fünfprozentigen fettfreien Milchlösung in TBS-T-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5) für 60 Minuten. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit Primärantikörpern gegen ABCB8 1:1000 (PA5-49697, Thermo Fisher) und β -Actin 1:4000 (#A5316, Sigma-Aldrich) über Nacht, bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden die Membranen für eine Stunde mit den Meerrettichperoxidase-assoziierten Sekundärantikörpern (anti-rabbit POD, # 7074 Cell Signaling und anti-mouse-POD, # 170-6516, Bio-Rad) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend, nach wiederholtem Waschen, erfolgte die Visualisierung der Proteine mittels Chemilumineszenz. Dabei wurde das SuperSignal WestFemto Kit (Thermo Scientific) verwendet. Das Signal, das infolge der Umsetzung eines empfindlichen Chemilumineszenz-Substrates (ECL) durch die Meerrettichperoxidase entstanden ist, wurde mit dem LAS 3000 Image Reader (Fujifilm, Tokyo, Japan) dokumentiert. Die densitometrischen Analysen der ABCB8-Bande wurden mit dem Multi Gauge Version 2.3 (Fujifilm, Tokyo, Japan) durchgeführt und in Relation zu β -Actin gesetzt.

Der Western Blot zur Bestimmung der ABCB8-Proteinexpression in den acht entsprechenden ccRCC- und normalen Nierengewebe wurde in gleicher Weise ausgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde 50 mg tiefgefrorenes Gewebe mit in einem Precellys 24 Homogenisator (Peqlab, Erlangen, Deutschland) und 400 µl des obengenannten Zellysepuffers mit Proteaseinhibitor lysiert. Für die Homogenisierung wurden 500 mg kleine (1,2-1,4 mm Durchmesser) und 8 große (2,7-3,3 mm) Zirkonoxidkugeln verwendet mit einer Drehzahl von 5000 Umdrehungen für 30 Sekunden. Die weiteren Schritte verliefen wie oben beschrieben.

1.2.7 Immunhistochemie

Eine weitere Methode zur Untersuchung der ABCB8 Proteinexpression in ccRCC stellte die spezifische immunhistochemische Färbung (IHC) dar. Dafür wurde ein Tissue Microarray (TMA) bestehend aus 123 ccRCC Gewebeproben und 21 Proben an normalem angrenzendem Nierengewebe (NAT) eingesetzt. Die Kohorte und die dazugehörigen klinisch-pathologischen Parameter sind in der Tabelle 1 beschrieben. Die Bearbeitung und Färbung des TMA wurde in Kollaboration mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn wie folgt durchgeführt: Mit einem Mikrotom wurden TMA-Schnitte von einer 5 µm definierten Dicke präpariert und auf Objektträger aufgetragen. Die Färbung wurde mit dem vollautomatisierten Ventana Benchmark Färbesystem (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA) vorgenommen. Dafür erfolgte die Inkubation mit dem ABCB8 (Abcam ab182662) spezifischen Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:50 für 40 Minuten bei Raumtemperatur. Für die Detektion wurde das ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Roche, Basel, Switzerland) eingesetzt. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Bluing Reagenz.

Die gefärbten Objektträger wurden mit dem Panoramic Midi (3D HISTECH, Budapest, Ungarn) eingescannt. Die Dateien wurden anschließend in das QuPath Bildanalyseprogramm importiert (Bankhead et al., 2017). Der Algorithmus der QuPath-Software wurde für die Erkennung der histologischen Morphologie des ccRCC und der gesunden Nierengewebe (NAT) vorausgehend aufgebaut. Somit erfolgte die automatische Bestimmung der Tumor- oder NAT-Regionen. Die Quantifizierung der ABCB8 Proteinexpression erfolgte nach Festlegung bestimmter Schwellenwerte anhand des H-Scoring Systems. ABCB8 Positivität wurde bei einem H-Score > 50 definiert (Huang et al., 2005).

1.2.8 Zellkultur

Die ccRCC-Zelllinien ACHN, CAKI1 und 786O wurden vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (Braunschweig, Deutschland) akquiriert. Die benutzten Kulturmedien bestanden aus RPMI1640 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, USA) für die ACHN und 786O und McCoy's 5A-Medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) für die CAKI1 Zellen. Die Medien wurden mit 10% fetalem Kälberserum (FBS Superior, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), 0,4% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin (Thermo Fisher Scientific, Inc., Darmstadt) ergänzt. Die Lagerung der Zellkulturen erfolgte bei 5% CO₂, 95% Luft und 37°C.

1.2.9 Antisense-LNA-vermittelte Knockdowns

Für die funktionelle Untersuchung der Rolle von ABCB8 in ccRCC wurde eine Herunterregulierung der mRNA und folglich der ABCB8 Proteinexpression in dem Zellkulturmodell erzielt. Dafür wurde die Methode der Antisense-LNA-GapmeR benutzt. Antisense-LNA-GapmeRs sind kurzkettige, einzelsträngige Oligonukleotide, bestehend aus einer mittigen DNA-Sequenz und zwei flankierenden RNA-Sequenzen, die Nukleotide mit einem starren Ribosering aufweisen (locked nucleic acids, LNA). Die LNA Teile verleihen dem Konstrukt eine erhöhte Stabilität und Bindungsaffinität zu der Ziel-RNA. Die zentrale DNA-Sequenz bindet komplementär an der zu hemmenden mRNA und aktiviert die RNase H, die die Spaltung und den Verdau der Ziel-mRNA verursacht.

Das spezifische ABCB8-GapmeR-Konstrukt wurde anhand des online verfügbaren GapmeR Design Werkzeugs von Exiqon (Vedbaek, Dänemark) kreiert. Die benutzte Sequenz des ABCB8 GapmeR war (5'-3'): G*C*A*G*T*T*G*A*A*G*G*C*G*A*T*G. Eine unspezifische, nicht bindende Negativkontrolle A (Neg Ctrl-A) wurde ebenfalls eingesetzt: A*A*C*A*C*G*T*C*T*A*T*A*C*G*C. Die Transfektionen wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers ausgeführt. Die Transfektionsmischung bestand aus dem Antisense LNA GapmeR (QIAGEN, Hilden, DE) in einer Endkonzentration von 10 pmol/μl und dem FuGENE HD-Transfektionsreagenz (#E2311, Promega Corporation, Madison,

WI USA) in einem Volumenverhältnis von 1:1. Die Zellen CAKI1 und ACHN wurden mit einer Menge von 10 µl/Well für 6-Well-Platten und 0,5µl/Vertiefung für 96-Well-Platten transfiziert. Die Inkubationszeiten für die Transfektion betragen 48 Stunden für die PCR und 72 Stunden für den Western Blot.

1.2.10 Zellproliferations- und Zytotoxizitätsassay

Um die Wirkung des ABCB8 Knockdowns auf die proliferative Aktivität der ccRCC Zelllinien zu evaluieren, wurde das EZ4U-Zellproliferationskit (EZ4U; Biomedica Group, Wien, Österreich) entsprechend des Protokolls des Herstellers eingesetzt. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten und 200 µl Medium ausgesät und nach Adhärenz mit der oben beschriebenen GapmeR-Mischung transfiziert. Dafür wurden $1,5 \times 10^4$ CAKI1 Zellen und $2,4 \times 10^4$ ACHN Zellen pro Well verteilt. Als Negativkontrolle und für die Blankbestimmung wurde je Platte ein Well mit nur 200 µl Medium bestückt. Alle Proben sind als Triplikate angesetzt worden. Die Messzeitpunkte wurden bei 48, 72 und 96 Stunden nach der Transfektion festgelegt. Durch Zugabe von 20 µl des aktivierten EZ4U-Substrates und anschließender dreistündiger Inkubation bei 37°C bewirkte eine mitochondriale Reduktionsreaktion lebender Zellen die Umwandlung der farblos bis gelblichen Tetrazoliumsalze in intensiv rot gefärbte Formazanderivate. Demzufolge stellte die Farbintensität und somit die Absorption ein Analogon für die Zellviabilität dar. Die Messung der Absorption erfolgte mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tecan Spectra Thermo, SLT Labinstrumente Deutschland GmbH) bei einer Wellenlänge von 450 nm und die Ergebnisse wurden in Relation zur Blankbestimmung gesetzt. Die Versuche sind drei Mal durchgeführt worden.

1.2.11 Zellmigrationsassays

Für die Beurteilung der Motilität und Migrationsfähigkeiten der Zellen nach der ABCB8 Depletion wurden Migrationsassays mit der quantitativen Boyden-Kammertechnik angewandt. Die vorangehenden Antisense-LNA-GapmeR-Transfektionen wurden in 6-Well-Platten durchgeführt. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die transfizierten Zellen trypsinisiert und jeweils 5×10^4 CAKI1 und ACHN in den oberen Kammern der

Boyden-Migrationseinsätze (VWR, Darmstadt, Deutschland) mit einem 2% FBS-haltigen Medium ausgesät. Um einen chemotaktischen Effekt zu erzielen wurde die untere Kammer mit einem 10% FBS-haltigen Medium gefüllt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4% Formaldehyd (PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und die Färbung mit Hämatoxylin (Vector Hematoxylin Counterstain H-3404, Vector Laboratories). Nach Entfernung der nicht migrierten Zellen auf der Innenseite der Membran mit einem Wattestäbchen wurden die Membranen aus den Kammereinsätzen ausgeschnitten und eingescannt. Die Zellen auf der Außenseite der Membran wurden automatisch mit der QuPath-Software mittels Kerndetektion gezählt. Die Versuche wurden drei Mal durchgeführt.

1.2.12 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Programme SPSS Statistics v25, Microsoft Excel und GraphPad Prism Version 8.2.1. Für die Vergleiche der *ABCB8* Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern wurden die Mann-Whitney-U und Kruskal–Wallis Tests angewandt. Für die Korrelation der Expressionen der *ABCB*-Mitglieder miteinander sowie für die Veranschaulichung der *ABCB8* Koexpression mit den *HIF1A*-, *HIF2A*-, *VEGF*-, *GPX4*- und *FSP1*-Genexpressionen wurden Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Die Überlebensanalysen erfolgten mittels der Kaplan-Meier Kurven, nach Dichotomisierung der Kohorten anhand der medianen *ABCB8* mRNA Expression. Mit der Cox-Regressionsanalyse (Tabelle 2) wurden die klinischen Kovariablen (TNM Status, Alter) in den Überlebensanalysen miteinbezogen. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert < 0,05 definiert.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 *In silico* Analyse des Genexpressionsprofils der ABC Transporterfamilie im Nierenzellkarzinom

Als Erstes erfolgte die Evaluierung der Subgruppe B der ABC Transporterfamilie hinsichtlich des prognostischen Potenzials in den drei häufigsten Entitäten des Nierenzellkarzinoms. Dafür wurde eine systematische Überlebensanalyse der TCGA-Datensätze für das klarzellige (ccRCC, n=532), papilläre (KIRP, n=290) und chromophobe (KICH, n=66) Nierenzellkarzinom durchgeführt. Die drei Datensätze wurden in einem explorativen Ansatz anhand der medianen mRNA-Expression der Transporter ABCB1 bis ABCB10 in jeweils einer Untergruppe mit hoher und in einer mit niedriger Expression eingeteilt. Mithilfe anschließender Log-Rank-Tests erwiesen sich mehrere Mitglieder der ABCB-Familie in den ccRCC- und KIRP-Datensätzen als prognostisch signifikante Marker für das OS. Im Gegensatz dazu wurden keine Zusammenhänge zwischen den Expressionsprofilen der ABCB-Transporter und dem OS in der Gruppe der KICH festgestellt.

In KIRP war eine Überexpression an ABCB3 und ABCB6 mit einem schlechtem OS assoziiert. In Bezug auf das ccRCC zeigte sich sowohl die Über- als auch die Unterexpression multipler ABCB-Transporter als prognostischer Faktor hinsichtlich des OS. Es zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen der verminderten Expression von ABCB1, ABCB4, ABCB7 und ABCB10 und einer schlechten Prognose. Im Kontrast dazu war die Überexpression an ABCB8 und ABCB9 mRNA in ccRCC mit einem ungünstigem OS assoziiert (Abb. 1A). Die dazugehörigen Kaplan-Meier Kurven sind in der Supplementary Figure 1 der Originalpublikation Blajan et al. (2021) (Anhang 3.2) dargestellt.

Als nächstes wurden gepaarte Spearman Korrelationsanalysen der mRNA-Expressionen der Transporter zueinander durchgeführt. In dem ccRCC Datensatz wurde die stärkste signifikante Koexpression der ABCB2 und ABCB3 mRNA (Spearman's-Korrelationskoeffizient ρ 0,742, $p < 0,0001$) aufgezeichnet. Die anderen Familienmitglieder wiesen hauptsächlich schwach negative Korrelationen (Spearman's ρ

von -0,1 bis -0,4) der Expressionen zueinander auf, was auf eine geringe bis fehlende gemeinsame Genregulation hindeutet.

Hinsichtlich des prognostischen Potenzials erreichte die differenzielle Expression von ABCB8 die höchste statistische Signifikanz als prognostischer Faktor ($p < 0.001$), sodass ABCB8 für die weitergehende Analyse ausgewählt wurde. Ein multivariates Cox-Regressionsmodell mit einer Angleichung der Kovariablen Alter und TNM-Stadium bestätigte die Rolle von ABCB8 als unabhängigen Prognosefaktor für das OS ($p = 0,044$; HR=1,45, 95% CI 1,01-2,09, Tabelle 2). Insgesamt war die ABCB8 Expression in Tumorgewebe verglichen mit gesundem Nierengewebe vermindert (Suppl. Fig. 2A, Anhang 3.3). Allerdings, unter Betrachtung der klinisch-pathologischen Merkmale, konnte man feststellen, dass besonders aggressive, durch höhere T-Stadien, fortgeschrittene lymphonodal sowie fernmetastasierte Tumore eine erhöhte ABCB8 mRNA Expression aufwiesen (Abb. 2A+B+C). Weiterhin ließ sich feststellen, dass eine hohe ABCB8 Expression mit höherem Grading korreliert war (Abb. 2D).

In Hinblick auf weitere klinische Endpunkte, wie dem PFS, OS und CSS nach kurativer chirurgischer Intervention, zeigten die ABCB8-überexprimierenden Tumore ebenfalls signifikant schlechtere Prognosen (Abb. 2E-G).

Um einen potenziellen Zusammenhang zwischen der ABCB8 Expression und der VHL-HIF-Achse zu untersuchen, wurde der TCGA ccRCC Datensatz in eine Gruppe der VHL-Wildtyp-Tumore ($n = 218$) und eine Gruppe der VHL-defizienten-Tumore ($n = 236$) unterteilt. Zur letzteren Gruppe zählten Tumore mit einer VHL-Mutation, Deletion oder mit einem biallelischem Verlust. Insgesamt zeichnete sich die VHL-Wildtyp-Untergruppe durch eine höhere ABCB8 mRNA Expression aus (Suppl. Fig. 5A, Anhang 3.6). In Übereinstimmung dazu, ergab die Analyse der VHL-HIF-Signalkette eine negative Korrelation der ABCB8 mRNA-Levels mit der Expression von *HIF-1 α* , *HIF-2 α* und *VEGF* (Suppl. Fig. 5B+C+D, Anhang 3.6). Überlebensanalysen zeigten, dass eine ABCB8 Überexpression für beide Tumor-Subgruppen (VHL-defizient vs. Wildtyp) mit einem schlechten krebsspezifischen Überleben assoziiert war (Suppl. Fig. 5E+F, Anhang 3.6).

1.3.2 Analyse der ABCB8 mRNA Expression in einer unabhängigen ccRCC Validierungskohorte

Für die Verifizierung der Ergebnisse der TCGA-Analysen wurde die ABCB8 mRNA Expression in einer unabhängigen Validierungskohorte (Tabelle 1) mittels PCR untersucht. Wie auch in den TCGA-Datensätzen zeigte sich die ABCB8 Expression in ccRCC Tumorgewebe verglichen mit gesundem Nierengewebe insgesamt vermindert. Dies wurde auch mittels Western Blot Analyse von 8 gepaarten ccRCC und NAT-Proben deutlich (Suppl. Fig. 2C, Anhang 3.3). Unter Betrachtung der T-Stadien zeigte sich allerdings eine erhöhte ABCB8 in den lokal-fortgeschrittenen Tumorstadien T3 und T4 verglichen mit den lokal begrenzten Stadien (Abb. 3A). Die Gruppen der nodal-positiven und fernmetastasierten Tumoren wiesen ebenfalls erhöhte ABCB8 Expressionswerte auf, eine statistische Signifikanz wurde aber nicht erreicht (Tabelle 1. Abb. 3B und 3C). Zudem wurde eine positive Korrelation der ABCB8 mRNA Expression mit den höhergradigen, schlecht- oder undifferenzierten Tumoren, nach dem UICC Gradingssystem von 2002 aufgezeichnet (Abb. 3D). Nach Dichotomisierung der Kohorte anhand der medianen ABCB8 mRNA Expression zeigte sich in Überlebensanalysen, dass eine erhöhte ABCB8-Expression mit einem ungünstigen krebsspezifischen Überleben assoziiert ist. Aus der multivariaten Cox-Regressionsanalyse in dieser Validierungskohorte stellte sich zudem ABCB8 als unabhängiger Risikofaktor dar (Tabelle 2). Somit konnte das von den TCGA-Ergebnissen angedeutete prognostische Potenzial von ABCB8 in einer zusätzlichen Kohorte validiert werden.

1.3.3 Immunhistochemische Untersuchung der ABCB8 Proteinexpression in einem ccRCC Tissue Microarray

Um die prognostische Relevanz von ABCB8 auch auf translationaler Ebene zu überprüfen, wurde die spezifische immunhistochemische Färbung eines Tissue Microarray (TMA) bestehend aus ccRCC und normalem Nierengewebe etabliert. Exemplarische ABCB8 Expressionsmuster sind in der Abbildung 4A dargestellt.

Im Allgemeinen konnte die ABCB8 sowohl im malignen als auch benignen Gewebe nachgewiesen werden. Auf subzellulärer Ebene wurde ABCB8 im Zytoplasma und der Zellmembran identifiziert, in Übereinstimmung mit der erwarteten Lokalisierung und den in The Human Protein Atlas verfügbaren ABCB8 IHC Daten (Uhlén et al., 2015). Im

normalen Nierengewebe zeigte insbesondere das Epithel der proximalen Tubuli eine starke ABCB8 Expression, während distale Tubuli, Henle-Schleifen und die Glomeruli verminderte oder fehlende Expressionsmuster aufwiesen. Die Ergebnisse der ABCB8 Expressionsanalysen auf transkriptioneller Ebene spiegelten sich auch auf dem Proteinlevel. ABCB8 wurde insgesamt in ccRCC weniger exprimiert als im normalen benachbarten Nierengewebe (Abb. 4B). Etwa ein Drittel der Tumore im ccRCC wiesen eine deutliche Expression von ABCB8 in der Zellmembran und im Zytoplasma auf, während bei ungefähr zwei Dritteln der Proben eine ABCB8-Negativität festgestellt wurde. Nach Dichotomisierung der Tumorkohorte anhand der medianen ABCB8 Proteinexpression und Korrelation zu den Überlebensdaten zeigte die ABCB8-positive Untergruppe von ccRCC ein signifikant vermindertes OS und CSS (Abb. 4C und D). Die multivariate Analyse mit dem Cox-Regressionsmodell zeigte nach Anpassung der Kovariablen TNM-Tumorstadium und Alter eine signifikant erhöhte Hazard-Ratio für Patienten mit ABCB8-überexprimierenden Tumoren in Bezug auf das krebspezifische Überleben (Tabelle 2). Wenngleich ohne statistische Signifikanz zeigte sich in der Korrelation zwischen den ABCB8 Expression und den Tumorstadien ein Trend der höheren Proteinexpression in lokal fortgeschrittenen und fernmetastasierten Tumoren (Suppl. Fig. 3 A+B+C, Anhang 3.4).

1.3.4 *In vitro* Charakterisierung der funktionellen Rolle von ABCB8 in ccRCC-Zelllinien

Um die Rolle, die ABCB8 bei der Tumorprogression und Metastasierung von ccRCC spielen könnte zu untersuchen, wurden *in vitro* Analysen in etablierten RCC Zellkulturmodellen durchgeführt. Nach einer Evaluation der ABCB8 mRNA und Proteinexpression mittels qRT-PCR und Western Blot (Abb. 5A) wurden die zwei ABCB8-positiven metastatischen ccRCC Zelllinien ACHN und CAKI1 für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Es folgte die Induktion spezifischer *ABCB8* Knockdowns in diesen Zelllinien durch Transfektion von Antisense-Oligonukleotiden (Antisense-LNA-GapmeR-System). Mithilfe der qRT-PCR wurde bestätigt, dass die relative ABCB8-mRNA-Expression somit auf 29% in den ACHN-Zellen und auf 16% in den CAKI1-Zellen, verglichen mit der Negativkontrolle, reduziert worden war. Angeschlossene Western-Blot Untersuchungen bestätigten die Knockdowns auch auf der Proteinebene (Abb. 5A+B).

Daraufhin wurde die Auswirkung der spezifischen ABCB8 Depletion auf die proliferativen Zellaktivität geprüft. Mithilfe eines Proliferations- und Zytotoxizitätsassay konnte eine zeitabhängige Hemmung der Zellproliferation beider Zelllinien über 96 Stunden nach der Transfektion gezeigt werden. Bei Betrachtung der ACHN-Zellen wurde eine schrittweise Reduktion der Zellviabilität auf 70% nach 48 Stunden, auf 50% nach 72 Stunden und auf 30% nach 96 Stunden im Vergleich mit der Negativkontrolle gemessen. Bei der CAKI-1 Zelllinie wurde eine relative Verminderung der Zellproliferation auf 53% nach 48 Stunden und auf 39% nach 72 und 96 Stunden registriert.

Darüber hinaus zeigte sich auch eine signifikant abgeschwächte Migrationsfähigkeit, die mithilfe von Boyden Chamber Migrationsassays registriert wurde (Abb. 5E+F). Im Vergleich zu der Negativkontrolle zeigte sich bei den ABCB8-depletierten ACHN-Zellen eine Reduktion der Migrationsfähigkeiten auf 74% und auf 54% bei den CAKI-1 Zellen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass ABCB8 eine bedeutende Funktion in der Zellproliferation und Migration, als wesentliche Merkmale der Tumorprogression, besitzt und dass eine Herunterregulierung von ABCB8 die malignen Eigenschaften der untersuchten Zelllinien reduziert.

1.4 Diskussion

Ziel dieser Studie war, durch explorative Überlebensanalysen der TCGA-Datenbank klinisch relevante Gene innerhalb der Subgruppe B der ABC-Transporterfamilie für die drei häufigsten Nierenzellkarzinom Subtypen zu identifizieren. So wurde *ABCB8* als das *ABCB* Gen mit dem größten prognostischen Potenzial im ccRCC identifiziert. Diese negative prognostische Wertigkeit und die Korrelation des Expressionsprofils mit einem besonders malignen Tumorphänotyp konnte in zwei unabhängigen Kohorten, sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene validiert werden. Die Etablierung eines transienten, *ABCB8*-spezifischen Knockdowns verursachte eine signifikant reduzierte Proliferation und Migrationsfähigkeit in den beiden metastatischen ccRCC-Zelllinien ACHN und CAKI1, was weitere Hinweise für den malignitätsfördernden Charakter von ABCB8 im ccRCC liefert.

Bislang ist über die Rolle von ABCB8 in ccRCC nichts bekannt. Diese Studie belegt also zum ersten Mal, dass phänotypisch aggressive Tumore eine *ABCB8* Überexpression aufweisen, dass *ABCB8* einen unabhängigen prognostischen Wert auf Transkriptions- und Translationsebene besitzt und, dass ABCB8 zentrale maligne Eigenschaften von ccRCC-Zelllinien beeinflusst.

Die explorative Überlebensanalysen der TCGA-Datensätze identifizierte weitere prognostische relevante Mitglieder der ABCB-Familie: Eine Überexpression von *ABCB3* und *ABCB6* war beispielsweise mit einem schlechtem OS im KIRP assoziiert (Abb. 1A). *ABCB6* wurde bereits als prognostischer Prädiktor für schlechtes OS bei dem hepatozellulären Karzinom charakterisiert (Jiang et al., 2019) - eine Analyse dieser beiden Gene wurde allerdings bisher für das KIRP noch nicht durchgeführt. So könnten die Daten der explorativen Analyse als Ausgangspunkt für weitere Forschungsvorhaben dienen.

Um eine potenzielle gemeinsame Genregulation der ABCB-Transporter nachzuweisen, wurde die Expression der *ABCB* Gene miteinander korreliert. Es wird angenommen, dass die Bildung des prognostisch ungünstigen, chemoresistenten Phänotyps von Tumoren auf die Expression nicht nur einzelner sondern einer Gruppe von ABC-Genen zurückzuführen ist (Robey et al., 2018). Die stärkste signifikante mRNA-Koexpression im ccRCC wurde im Falle von *ABCB2* und *ABCB3*, auch als TAP1 und TAP2 bekannt, festgestellt. Die weiteren *ABCB* zeigten lediglich eine schwache Ko-Expression was auf eine individuelle Genregulation hindeutet. Die starke Korrelation zwischen *ABCB2* und *ABCB3* wird durch die Berücksichtigung ihrer strukturellen Merkmale und ihrer funktionellen Rolle erklärt. Diese zwei Proteine bilden einen heterodimeren Komplex zusammen, der für den Transport antigener Peptide aus dem Zytosol in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums und für die Beladung von MHC Klasse I Molekülen zuständig ist. Der *ABCB2/ABCB3* Proteinkomplex spielt somit eine zentrale Rolle bei der Antigenpräsentation (Lankat-Buttgereit und Tampé, 2002). Die Untersuchung von *ABCB2* in ccRCC zeigte bereits die Assoziation der tumoralen Überexpression mit einer schlechten Prognose, sowie eine potenzielle Funktion von *ABCB2* in der Förderung der Metastasierung (Wang et al., 2022).

In der TCGA-Kohorte war die *ABCB8*-Expression in ccRCC mit signifikant schlechteren Prognosen hinsichtlich des PFS, CSS und OS korreliert. *ABCB8* konnte als unabhängiger Prädiktor für ein kürzeres Überleben an zwei weiteren unabhängigen Kohorten validiert werden und weist somit ein Potenzial als prognostischer Biomarker für die Risikostratifikation auf. Zwar war die *ABCB8* mRNA Expression im ccRCC im Vergleich zu normalem paratumoralen Nierengewebe insgesamt vermindert, die fortgeschrittenen, undifferenzierten und metastasierten Tumore wiesen aber erhöhte *ABCB8* Expressionsprofile und schlechtere Prognosen als die lokal begrenzten Nierenzellkarzinome auf. Somit schien ein potenzieller Zusammenhang zwischen der *ABCB8* Expression und dem *VHL*-Mutationsstatus im ccRCC plausibel. Der Funktionsverlust des *VHL*-Tumorsuppressors ist eine der Hauptursachen für die Entstehung des ccRCC (Clark, 2009; Kim und Kaelin, 2004), jedoch wiesen Dagher et al. (2016) nach, dass die *VHL*-Wildtyp Untergruppe von Tumoren durch schlechtere Überlebensraten gekennzeichnet ist. Dieses Muster der geringen bis fehlenden Expression in weniger aggressiven Tumoren und der höheren Expression in den fortgeschrittenen, besonders malignen Tumoren, schien von *ABCB8* widerspiegelt zu werden. Interessanterweise konnte in der ccRCC Kohorte der TCGA eine niedrigere *ABCB8* mRNA Expression in der Gruppe von Tumoren mit mutiertem *VHL* verglichen mit der *VHL*-Wildtyp Untergruppe festgestellt werden (Suppl. Fig. 5A, Anhang 3.6). Bei Betrachtung der nachgeschalteten Komponenten der *VHL*-HIF-Achse zeigte sich eine negative Korrelation des Expressionsprofils von *ABCB8* mit der Genexpression von *HIF-1 α* , *HIF-2 α* und *VEGF* (Suppl. Fig. 5B+C+D, Anhang 3.6). Diese Ergebnisse konnten allerdings *in vitro* nicht reproduziert werden. Durch die Analyse des Microarray-Datensatzes GSE4186 ließ sich feststellen, dass eine *VHL* Re-Expression in der ursprünglich *VHL*-defizienten RCC4 Zelllinie zu keiner differenziellen *ABCB8* Expression führte. Die Expressionsprofile wurden in den Zuständen der Normoxie, schrittweiser Hypoxie und Reoxygenierung im Vergleich zu der *VHL*-defizienten RCC4 Zelllinie analysiert (Suppl. Fig. 5G, Anhang 3.6), (Papandreou et al., 2006). Es lässt sich zusammenfassen, dass *ABCB8* unabhängig vom *VHL*-Mutationsstatus mit einem ungünstigen krebsspezifischen Überleben in der TCGA Kohorte des ccRCC assoziiert ist und die *VHL*-HIF Signalachse die Expression von *ABCB8* nicht direkt zu beeinflussen scheint.

Die Rolle von ABCB8 und dessen Implikationen in der Karzinogenese sind größtenteils ungeklärt. Es ist bekannt, dass ABCB8 in der Innenmembran des Mitochondriums lokalisiert ist, dass es eine essentielle Rolle für die mitochondriale Eisenhomöostase spielt und zum Schutz der Zellen vor oxidativem Stress beiträgt (Hogue et al., 1999; Ardehali et al., 2005; Ichikawa et al., 2012). Als Folge einer gestörten Eisenhomöostase kann unter bestimmten Bedingungen die Ferroptose ausgelöst werden. Die Ferroptose bezeichnet eine eisenabhängige Art des programmierten Zelltodes, die durch das Anhäufen von lipidreaktiven Sauerstoffspezies ausgelöst wird (Cao und Dixon, 2016; Stockwell et al., 2017). Als wesentliche regulatorische Akteure der Ferroptose wurden die Glutathionperoxidase 4 (GPX4) und das Ferroptose-Suppressor-Protein-1 (FSP-1) als Inhibitoren identifiziert (Yang et al., 2014; Doll et al., 2019; Bersuker et al., 2019). Zou et al. (2019) behaupteten, dass das ccRCC aufgrund des distinktiven, mit abnormer Lipid- und Glykogenakkumulation einhergehenden Stoffwechselzustandes eine grundsätzliche Anfälligkeit für Ferroptose aufweist. Besonders hervorzuheben ist, dass die ABCB8 mRNA Expression mit der Expression der oben genannten Ferroptose Inhibitoren in dem TCGA Datensatz des ccRCC positiv korreliert (Suppl. Fig. 6A+B, Anhang 3.7). Diese Korrelation könnte ein Hinweis darauf sein, dass ABCB8 eine Rolle bei der Ferroptose spielt, was allerdings tiefergehende Untersuchungen erfordert.

Hinsichtlich der Assoziation von ABCB8 mit Zytostatikaresistenzen, deuten Studien darauf hin, dass ABCB8 eine unmittelbare Rolle bei der Vermittlung der Resistenz gegenüber Doxorubicin in Melanomzellen spielt (Chen et al., 2009; Elliott und Al-Hajj, 2009). In Bezug auf das ccRCC ist noch nicht untersucht worden, ob ABCB8 in der Chemoresistenz involviert ist.

Die Untersuchung der ABCB8 Proteinexpression in ccRCC erfolgte anhand immunhistochemischer Färbungen eines klinisch annotierten TMAs. Die detektierte ABCB8-spezifische zytosolische Färbung stimmt mit der bisherigen Literatur überein und lässt auf die Assoziation mit zytoplasmatischen Organellen, am ehesten den Mitochondrien, rückschließen. Besonders hervorzuheben ist die heterogene Proteinexpression von ABCB8 im ccRCC, mit fast zwei Drittel der Tumorproben, die als ABCB8-negativ eingestuft worden sind. Zudem war die ABCB8-Färbung in der gesamten ccRCC-Kohorte nicht ausschließlich auf das Zytoplasma beschränkt. Eine membranöse

ABCB8-Positivität wurde sowohl in ccRCC-Proben als auch im normalen Nierengewebe detektiert. Dieser Befund steht im Einklang mit immunhistochemischen Daten der RCC-Kohorte des Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000197150-ABCB8/pathology/renal+cancer#ihc>) und könnte ein Hinweis auf eine zusätzliche Funktion oder Interaktion von ABCB8 mit anderen Proteinen in der Zellmembran sein. Bislang veröffentlichte Studien berichten von der Fähigkeit von ABCB8, mit anderen Molekülen zu interagieren und Proteinkomplexe zu bilden. Es ist zum Beispiel bekannt, dass ABCB8 einen Komplex mit dem mitochondrialen Kaliumkanal MITOK bildet. Es entsteht ein ATP-abhängiger Kaliumkanal, wobei ABCB8 die ATP-Bindungsstelle trägt und somit als regulatorische Untereinheit des Kanals fungiert (Paggio et al., 2019).

In der Zellkultur führte der Knockdown von *ABCB8* zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit und der Migrationsfähigkeit zweier metastatischer ccRCC-Zelllinien. Die Verminderung der Proliferation wurde über einen Zeitraum von 96 Stunden gemessen. Eine signifikante Wachstumshemmung wurde bereits nach 48 Stunden mit nur noch 50% lebensfähigen CAK11-Zellen und 70% lebensfähigen ACHN-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen registriert. Dieses Phänomen könnte auf mitochondriale Schäden und erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies als Folge der ABCB8-Hemmung zurückzuführen sein. Eine bereits erwähnte Studie beschreibt ein analoges Ergebnis nach dem kardialen *ABCB8*-Knockdown eines Mausmodells, das zu Kardiomyopathie und mitochondrialer Eisenanreicherung führte (Ichikawa et al., 2012). Bezüglich der herabgesetzten Migrationsfähigkeit der transfizierten ccRCC-Zellen kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie eine sekundäre Auswirkung der beeinträchtigten Proliferation ist. Dennoch deuten die Ergebnisse der funktionellen Analysen darauf hin, dass ABCB8 eine Vermittlerrolle des malignen Phänotyps im RCC-Zellkulturmodell spielt.

Als Limitation der vorliegenden Arbeit ist zum einen die Unterrepräsentation der Patientenproben mit Lymphknoten- und Fernmetastasen, sowohl in der ccRCC Validierungskohorte als auch in der Kohorte des TMA festzustellen. Dies kommt dadurch zustande, dass eine Nephrektomie kaum noch als Therapieoption für das Nierenzellkarzinom im metastasierten Stadium infrage kommt. Zum anderen birgt das Zellkulturmodell und das eingesetzte transiente Knockdown Konstrukt weitere Einschränkungen in sich. Durch die Etablierung eines permanenten Knockdowns stünden

beispielweise weiterführende Untersuchungen zu der Rolle von ABCB8 bei der Resistenzentwicklung gegenüber Therapeutika bei ccRCC als aussichtsreiche Forschungsansätze zur Verfügung.

1.5 Zusammenfassung

Die Therapie des metastasierten RCC wurde in den letzten Jahren durch den Einsatz von Immun-Checkpoint- und Tyrosinkinase-Inhibitoren revolutioniert. Trotz der erheblichen Prognoseverbesserung bleibt jedoch eine beträchtliche Anzahl von Patienten unempfindlich gegenüber diesen Therapieansätzen, zeigt therapielimitierende Nebenwirkungen oder entwickelt schließlich eine Chemoresistenz. Somit bleibt die Behandlung des metastasierten RCC nach wie vor eine Herausforderung in der klinischen Praxis. In diesem Kontext zeigt sich die Notwendigkeit der Erforschung von neuen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen, um die Prognose und Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit metastasiertem ccRCC zu verbessern.

Mitglieder der ABC- Transporterfamilie spielen bekannterweise eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Chemoresistenzen in verschiedenen Krebserkrankungen. Es wird vermutet, dass auch die ausgeprägte intrinsische Chemoresistenz des Nierenzellkarzinoms auf die hohe Expression unterschiedlicher ABC-Transporter zurückzuführen sei.

Ziel dieser Arbeit war die Durchführung einer detaillierten Genexpressionsanalyse der ABCB-Transporter Subfamilie, um prognostisch bedeutsame *ABCB*-Gene in den drei häufigsten RCC-Subtypen zu identifizieren und durch weiterführende Analysen auf transkriptioneller und translationaler Ebene sowie in einem ccRCC Zellkulturmodell zu charakterisieren.

ABCB8 wurde somit als das *ABCB*-Gen mit dem größten prognostischen Potenzial im klarzelligen Nierenzellkarzinom (ccRCC) identifiziert. Die Korrelation des Expressionsprofils mit einem besonders bösartigen Tumorphänotyp wurde in zwei unabhängigen Kohorten auf sowohl transkriptioneller als auch translationaler Ebene

bestätigt. In der Zellkultur führte der Knockdown von *ABCB8* zu einer Herabsetzung der malignen Eigenschaften zweier Nierenzellkarzinomzelllinien. Somit liegt die klinische Implikation dieser Ergebnisse darin, dass *ABCB8* zusammen mit den etablierten histopathologischen Parametern die Grundlage für eine verbesserte, auf individuellen Ansätzen basierende Therapiestrategie bieten kann. Weiterhin könnte die Hemmung von *ABCB8* auch eine therapeutische Rolle spielen, wofür allerdings tiefergehende Untersuchungen und *in vitro* Konstrukte von Notwendigkeit sind.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Ardehali H, O'Rourke B, Marbán E. Cardioprotective role of the mitochondrial ATP-binding cassette protein 1. *Circulation research* 2005; 97: 740–742

Bak M, Efferth T, Mickisch G, Mattern J, Volm M. Detection of drug resistance and P-glycoprotein in human renal cell carcinomas. *European urology* 1990; 17: 72–75

Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific reports* 2017; 7: 16878

Beretta GL, Cassinelli G, Pennati M, Zuco V, Gatti L. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *European journal of medicinal chemistry* 2017; 142: 271–289

Bersuker K, Hendricks JM, Li Z, Magtanong L, Ford B, Tang PH, Roberts MA, Tong B, Maimone TJ, Zoncu R, Bassik MC, Nomura DK, Dixon SJ, Olzmann JA. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature* 2019; 575: 688–692

Blajan I, Miersch H, Schmidt D, Kristiansen G, Perner S, Ritter M, Ellinger J, Klümper N. Comprehensive Analysis of the ATP-binding Cassette Subfamily B Across Renal Cancers

Identifies ABCB8 Overexpression in Phenotypically Aggressive Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *European urology focus* 2021; 7: 1121–1129

Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2016; 73: 2195–2209

Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery* 2012; 2: 401–404

Chae J-W, Teo YL, Ho HK, Lee J, Back H-M, Yun H-Y, Karlsson MO, Kwon K-I, Chan A. BSA and ABCB1 polymorphism affect the pharmacokinetics of sunitinib and its active metabolite in Asian mRCC patients receiving an attenuated sunitinib dosing regimen. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2016; 78: 623–632

Chen F, Zhang Y, Şenbabaoğlu Y, Ciriello G, Yang L, Reznik E, Shuch B, Micevic G, Velasco G de, Shinbrot E, Noble MS, Lu Y, Covington KR, Xi L, Drummond JA, Muzny D, Kang H, Lee J, Tamboli P, Reuter V, Shelley CS, Kaiparettu BA, Bottaro DP, Godwin AK, Gibbs RA, Getz G, Kucherlapati R, Park PJ, Sander C, Henske EP, Zhou JH, Kwiatkowski DJ, Ho TH, Choueiri TK, Hsieh JJ, Akbani R, Mills GB, Hakimi AA, Wheeler DA, Creighton CJ. Multilevel Genomics-Based Taxonomy of Renal Cell Carcinoma. *Cell reports* 2016; 14: 2476–2489

Chen KG, Valencia JC, Gillet J-P, Hearing VJ, Gottesman MM. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 2009; 22: 740–749

Choueiri TK, Powles T, Burotto M, Escudier B, Boursicot MT, Zurawski B, Oyervides Juárez VM, Hsieh JJ, Basso U, Shah AY, Suárez C, Hamzaj A, Goh JC, Barrios C, Richardet M, Porta C, Kowalyszyn R, Feregrino JP, Żołnierek J, Pook D, Kessler ER, Tomita Y, Mizuno R, Bedke J, Zhang J, Maurer MA, Simsek B, Ejzykowicz F, Schwab GM, Apolo AB, Motzer RJ. Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 2021; 384: 829–841

Chowdhury N, Drake CG. Kidney Cancer: An Overview of Current Therapeutic Approaches. *The Urologic clinics of North America* 2020; 47: 419–431

Chu Y-H, Li H, Tan HS, Koh V, Lai J, Phyo WM, Choudhury Y, Kanesvaran R, Chau NM, Toh CK, Ng QS, Tan PH, Chowbay B, Tan M-H. Association of ABCB1 and FLT3 Polymorphisms with Toxicities and Survival in Asian Patients Receiving Sunitinib for Renal Cell Carcinoma. *PloS one* 2015; 10: e0134102

Clark PE. The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. *Kidney international* 2009; 76: 939–945

Dabestani S, Marconi L, Hofmann F, Stewart F, Lam TBL, Canfield SE, Staehler M, Powles T, Ljungberg B, Bex A. Local treatments for metastases of renal cell carcinoma: a systematic review. *The Lancet. Oncology* 2014; 15: e549-61

Dagher J, Kammerer-Jacquet S-F, Brunot A, Pladys A, Patard J-J, Bensalah K, Perrin C, Verhoest G, Mosser J, Lespagnol A, Vigneau C, Dugay F, Belaud-Rotureau M-A, Rioux-Leclercq N. Wild-type VHL Clear Cell Renal Cell Carcinomas Are a Distinct Clinical and Histologic Entity: A 10-Year Follow-up. *European urology focus* 2016; 1: 284–290

Davis CF, Ricketts CJ, Wang M, Yang L, Cherniack AD, Shen H, Buhay C, Kang H, Kim SC, Fahey CC, Hacker KE, Bhanot G, Gordenin DA, Chu A, Gunaratne PH, Biehl M, Seth S, Kaiparettu BA, Bristow CA, Donehower LA, Wallen EM, Smith AB, Tickoo SK, Tamboli P, Reuter V, Schmidt LS, Hsieh JJ, Choueiri TK, Hakimi AA, Chin L, Meyerson M, Kucherlapati R, Park W-Y, Robertson AG, Laird PW, Henske EP, Kwiatkowski DJ, Park PJ, Morgan M, Shuch B, Muzny D, Wheeler DA, Linehan WM, Gibbs RA, Rathmell WK, Creighton CJ. The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer cell* 2014; 26: 319–330

Doll S, Freitas FP, Shah R, Aldrovandi M, Da Silva MC, Ingold I, Goya Grocin A, Da Xavier Silva TN, Panzilius E, Scheel CH, Mourão A, Buday K, Sato M, Wanninger J, Vignane T, Mohana V, Rehberg M, Flatley A, Schepers A, Kurz A, White D, Sauer M, Sattler M, Tate EW, Schmitz W, Schulze A, O'Donnell V, Proneth B, Popowicz GM, Pratt DA, Angeli JPF,

Conrad M. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature* 2019; 575: 693–698

Elliott AM, Al-Hajj MA. ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome. *Molecular cancer research : MCR* 2009; 7: 79–87

Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* 2013; 6: p11

Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 1989; 81: 116–124

Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine* 2002; 53: 615–627

Heng DY, Xie W, Regan MM, Harshman LC, Bjarnason GA, Vaishampayan UN, Mackenzie M, Wood L, Donskov F, Tan M-H, Rha S-Y, Agarwal N, Kollmannsberger C, Rini BI, Choueiri TK. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *The Lancet. Oncology* 2013; 14: 141–148

Hogue DL, Liu L, Ling V. Identification and characterization of a mammalian mitochondrial ATP-binding cassette membrane protein. *Journal of molecular biology* 1999; 285: 379–389

Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, Heng DY, Larkin J, Ficarra V. Renal cell carcinoma. *Nature reviews. Disease primers* 2017; 3: 17009

Huang HJ, Neven P, Drijkoningen M, Paridaens R, Wildiers H, van Limbergen E, Berteloot P, Amant F, Vergote I, Christiaens MR. Association between tumour characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer. *Journal of clinical pathology* 2005; 58: 611–616

Ichikawa Y, Bayeva M, Ghanefar M, Potini V, Sun L, Mutharasan RK, Wu R, Khechaduri A, Jairaj Naik T, Ardehali H. Disruption of ATP-binding cassette B8 in mice leads to cardiomyopathy through a decrease in mitochondrial iron export. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109: 4152–4157

Jiang L, Zhao L, Bi J, Guan Q, Qi A, Wei Q, He M, Wei M, Zhao L. Glycolysis gene expression profilings screen for prognostic risk signature of hepatocellular carcinoma. *Aging* 2019; 11: 10861–10882

Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004; 22: 4991–5004

Lankat-Buttgereit B, Tampé R. The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiological reviews* 2002; 82: 187–204

Linehan WM, Schmidt LS, Crooks DR, Wei D, Srinivasan R, Lang M, Ricketts CJ. The Metabolic Basis of Kidney Cancer. *Cancer discovery* 2019; 9: 1006–1021

Linehan WM, Spellman PT, Ricketts CJ, Creighton CJ, Fei SS, Davis C, Wheeler DA, Murray BA, Schmidt L, Vocke CD, Peto M, Al Mamun AAM, Shinbrot E, Sethi A, Brooks S, Rathmell WK, Brooks AN, Hoadley KA, Robertson AG, Brooks D, Bowlby R, Sadeghi S, Shen H, Weisenberger DJ, Bootwalla M, Baylin SB, Laird PW, Cherniack AD, Saksena G, Haake S, Li J, Liang H, Lu Y, Mills GB, Akbani R, Leiserson MDM, Raphael BJ, Anur P, Bottaro D, Albiges L, Barnabas N, Choueiri TK, Czerniak B, Godwin AK, Hakimi AA, Ho TH, Hsieh J, Ittmann M, Kim WY, Krishnan B, Merino MJ, Mills Shaw KR, Reuter VE, Reznik E, Shelley CS, Shuch B, Signoretti S, Srinivasan R, Tamboli P, Thomas G, Tickoo S, Burnett K, Crain D, Gardner J, Lau K, Mallery D, Morris S, Paulauskis JD, Penny RJ, Shelton C, Shelton WT, Sherman M, Thompson E, Yena P, Avedon MT, Bowen J, Gastier-Foster JM, Gerken M, Leraas KM, Lichtenberg TM, Ramirez NC, Santos T, Wise L, Zmuda E, Demchok JA, Felau I, Hutter CM, Sheth M, Sofia HJ, Tarnuzzer R, Wang Z, Yang L, Zenklusen JC, Zhang J, Ayala B, Baboud J, Chudamani S, Liu J, Lolla L, Naresh R, Pihl T, Sun Q, Wan Y, Wu Y, Ally A, Balasundaram M, Balu S, Beroukhir R, Bodenheimer T, Buhay C, Butterfield YSN, Carlsen R, Carter SL, Chao H, Chuah E, Clarke A, Covington

KR, Dahdouli M, Dewal N, Dhalla N, Doddapaneni HV, Drummond JA, Gabriel SB, Gibbs RA, Guin R, Hale W, Hawes A, Hayes DN, Holt RA, Hoyle AP, Jefferys SR, Jones SJM, Jones CD, Kalra D, Kovar C, Lewis L, Li J, Ma Y, Marra MA, Mayo M, Meng S, Meyerson M, Mieczkowski PA, Moore RA, Morton D, Mose LE, Mungall AJ, Muzny D, Parker JS, Perou CM, Roach J, Schein JE, Schumacher SE, Shi Y, Simons JV, Sipahimalani P, Skelly T, Soloway MG, Sougnez C, Tam A, Tan D, Thiessen N, Veluvolu U, Wang M, Wilkerson MD, Wong T, Wu J, Xi L, Zhou J, Bedford J, Chen F, Fu Y, Gerstein M, Haussler D, Kasaian K, Lai P, Ling S, Radenbaugh A, van den Berg D, Weinstein JN, Zhu J, Albert M, Alexopoulou I, Andersen JJ, Auman JT, Bartlett J, Bastacky S, Bergsten J, Blute ML, Boice L, Bollag RJ, Boyd J, Castle E, Chen Y-B, Cheville JC, Curley E, Davies B, DeVolk A, Dhir R, Dike L, Eckman J, Engel J, Harr J, Hrebinko R, Huang M, Huelsenbeck-Dill L, Iacocca M, Jacobs B, Lobis M, Maranchie JK, McMeekin S, Myers J, Nelson J, Parfitt J, Parwani A, Petrelli N, Rabeno B, Roy S, Salner AL, Slaton J, Stanton M, Thompson RH, Thorne L, Tucker K, Weinberger PM, Winemiller C, Zach LA, Zuna R. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 2016; 374: 135–145

Liu J, Lichtenberg T, Hoadley KA, Poisson LM, Lazar AJ, Cherniack AD, Kovatich AJ, Benz CC, Levine DA, Lee AV, Omberg L, Wolf DM, Shriver CD, Thorsson V, Hu H. An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell* 2018; 173: 400-416.e11

Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, Bedke J, Capitanio U, Dabestani S, Fernández-Pello S, Giles RH, Hofmann F, Hora M, Klatte T, Kuusk T, Lam TB, Marconi L, Powles T, Tahbaz R, Volpe A, Bex A. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2022 Update. *European urology* 2022; 82: 399–410

Motzer R, Alekseev B, Rha S-Y, Porta C, Eto M, Powles T, Grünwald V, Hutson TE, Kopyltsov E, Méndez-Vidal MJ, Kozlov V, Alyasova A, Hong S-H, Kapoor A, Alonso Gordoia T, Merchan JR, Winquist E, Maroto P, Goh JC, Kim M, Gurney H, Patel V, Peer A, Procopio G, Takagi T, Melichar B, Rolland F, Giorgi U de, Wong S, Bedke J, Schmidinger M, Dutcus CE, Smith AD, Dutta L, Mody K, Perini RF, Xing D, Choueiri TK.

Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 2021; 384: 1289–1300

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* 2019a; 380: 1103–1115

Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Arén Frontera O, Hammers HJ, Carducci MA, Salman P, Escudier B, Beuselinck B, Amin A, Porta C, George S, Neiman V, Bracarda S, Tykodi SS, Barthélémy P, Leibowitz-Amit R, Plimack ER, Oosting SF, Redman B, Melichar B, Powles T, Nathan P, Oudard S, Pook D, Choueiri TK, Donskov F, Grimm M-O, Gurney H, Heng DYC, Kollmannsberger CK, Harrison MR, Tomita Y, Duran I, Grünwald V, McHenry MB, Mekan S, Tannir NM. Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell carcinoma: extended follow-up of efficacy and safety results from a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* 2019b; 20: 1370–1385

Motzer RJ, Russo P. Cytoreductive Nephrectomy - Patient Selection Is Key. *The New England journal of medicine* 2018; 379: 481–482

Paggio A, Checchetto V, Campo A, Menabò R, Di Marco G, Di Lisa F, Szabo I, Rizzuto R, Stefani D de. Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria. *Nature* 2019; 572: 609–613

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell metabolism* 2006; 3: 187–197

Pérez-De Marcos, Perla-Lidia P-P, Stephanie-Talia M-M, Mónica-Griselda A-M, Luz-María T-E. ABC transporter superfamily. An updated overview, relevance in cancer

multidrug resistance and perspectives with personalized medicine. *Molecular biology reports* 2021; 48: 1883–1901

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, Szczyluk 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; 380: 1116–1127

Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature reviews. Cancer* 2018; 18: 452–464

Sharma R, Kadife E, Myers M, Kannourakis G, Prithviraj P, Ahmed N. Determinants of resistance to VEGF-TKI and immune checkpoint inhibitors in metastatic renal cell carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2021; 40: 186

Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians* 2023; 73: 17–48

Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, Fulda S, Gascón S, Hatzios SK, Kagan VE, Noel K, Jiang X, Linkermann A, Murphy ME, Overholtzer M, Oyagi A, Pagnussat GC, Park J, Ran Q, Rosenfeld CS, Salnikow K, Tang D, Torti FM, Torti SV, Toyokuni S, Woerpel KA, Zhang DD. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* 2017; 171: 273–285

The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013; 499: 43–49

Tian T, Li X, Zhang J. mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy. *International journal of molecular sciences* 2019; 20

Tulsyan S, Mittal RD, Mittal B. The effect of ABCB1 polymorphisms on the outcome of breast cancer treatment. *Pharmacogenomics and personalized medicine* 2016; 9: 47–58

Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA-K, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist P-H, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, Feilitzén K von, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, Heijne G von, Nielsen J, Pontén F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome // Tissue-based map of the human proteome. *Science (New York, N.Y.)* 2015; 347: 1260419

Walsh N, Larkin A, Kennedy S, Connolly L, Ballot J, Ooi W, Gullo G, Crown J, Clynes M, O'Driscoll L. Expression of multidrug resistance markers ABCB1 (MDR-1/P-gp) and ABCC1 (MRP-1) in renal cell carcinoma. *BMC urology* 2009; 9: 6

Wang Z-D, Tian X, Wang Y, Wang J-J, Ye S-Q, Huang Y-Q, Qu Y-Y, Chang K, Shi G-H, Ye D-W, Gu C-Y. The expression and prognostic value of transporter 1, ATP binding cassette subfamily B member in clear cell renal cell cancer with experimental validation. *Front. Oncol.* 2022; 12

Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KRM, Ozenberger BA, Ellrott K, Shmulevich I, Sander C, Stuart JM. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature genetics* 2013; 45: 1113–1120

Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, Brown LM, Girotti AW, Cornish VW, Schreiber SL, Stockwell BR. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* 2014; 156: 317–331

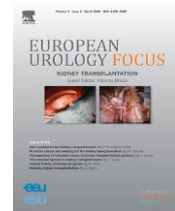
Zou Y, Palte MJ, Deik AA, Li H, Eaton JK, Wang W, Tseng Y-Y, Deasy R, Kost-Alimova M, Dančík V, Leshchiner ES, Viswanathan VS, Signoretti S, Choueiri TK, Boehm JS, Wagner BK, Doench JG, Clish CB, Clemons PA, Schreiber SL. A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis. *Nature communications* 2019; 10: 1617

2. Veröffentlichung

EUROPEAN UROLOGY FOCUS 7 (2021) 1121–1129

available at www.sciencedirect.com

journal homepage: www.europeanurology.com/eufocus



Kidney Cancer

Comprehensive Analysis of the ATP-binding Cassette Subfamily B Across Renal Cancers Identifies ABCB8 Overexpression in Phenotypically Aggressive Clear Cell Renal Cell Carcinoma

Julia Blajan^a, Herdis Miersch^a, Doris Schmidt^a, Glen Kristiansen^b, Sven Perner^{c,d}, Manuel Ritter^a, Jörg Ellinger^{a,y}, Niklas Klümper^{a,e,*y}

^aDepartment of Urology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany; ^bInstitute of Pathology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany; ^cInstitute of Pathology, University of Luebeck and University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Luebeck, Luebeck, Germany; ^dPathology, Research Center Borstel, Leibniz Lung Center, Borstel, Germany; ^eInstitute of Experimental Oncology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

Article info

Article history:

Accepted September 16, 2020

Associate Editor: Richard Lee

Keywords:

Clear cell renal cell carcinoma
ABCB8
ATP-binding cassette subfamily B
Malignant phenotype
Renal cell carcinoma

Abstract

Background: ATP-binding cassette (ABC) transporters play a crucial role in the development of multidrug resistance in diverse cancer entities.

Objective: Our study was designed to comprehensively analyze the ABC subfamily B (ABCB) in renal cell carcinoma (RCC) using The Cancer Genome Atlas (TCGA) datasets.

Design, setting, and participants: We performed systematic survival analyses of ABCB1–10 using the TCGA datasets for clear cell, papillary, and chromophobe RCC.

Outcome measurements and statistical analysis: Results were validated via quantitative polymerase chain reaction in a clear cell RCC (ccRCC) cohort containing 152 samples. Afterward, ABCB8 protein expression was assessed in a tissue microarray RCC cohort ($n = 144$) by immunohistochemistry with subsequent quantitative image analysis. In vitro, antisense oligonucleotide-induced ABCB8 knockdowns were established in ACHN and CAKI1 following functional analyses.

Results and limitations: Various ABCB members have prognostic value among the three most occurring RCC subtypes. Of note, ABCB8 was identified as the most prognostic ABCB gene in the RCC TCGA cohorts. Further, ABCB8 proved to be an independent predictor of shortened cancer-specific survival in three independent cohorts. In vitro, specific ABCB8 knockdown reduced viability and migration capacity in ACHN and CAKI1.

Conclusions: ABCB8 was identified as a promising prognostic biomarker. Functional analyses suggest a tumor-promoting role of ABCB8 in ccRCC.

Patient summary: In this study, the transporter gene *ABCB8* proved to be a risk predictor of a worse clinical course in clear cell renal cell carcinoma. In the renal cell carcinoma cell culture model, depletion of this gene led to a reduction in the malignant potential, and inhibition of this gene may therefore possess a therapeutic value.

© 2020 European Association of Urology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

^y Niklas Klümper and Jörg Ellinger contributed equally.

* Corresponding author. Clinic for Urology and Pediatric Urology, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany. Tel.: +49 228-287-12630.

E-mail address: niklas.kluemper@ukbonn.de (N. Klümper).

<https://doi.org/10.1016/j.euf.2020.09.007>

2405-4569/© 2020 European Association of Urology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Despite the success of immunotherapy and tyrosine kinase inhibition in metastatic renal cell carcinoma (RCC), a large number of patients do not respond or rapidly develop resistance mechanisms during therapy [1].

ATP-binding cassette (ABC) transporters are known to play a crucial role in the development of multidrug resistance in diverse cancers [2–5]. ABC subfamily B (ABCB) member 1, also known as multidrug resistance protein 1 (MDR1) or p-glycoprotein, was the first comprehensively characterized ABC transporter and is known to be one of the main mechanisms for the development of multidrug resistance across diverse cancer entities [5]. Mechanistically, ABC transporters, especially ABCB1, are capable of mediating the efflux of drugs to subtherapeutic levels. Interestingly, ABCB1 polymorphisms affect the pharmacokinetics of diverse oncological drugs and predicted response to sunitinib in metastatic RCC [6,7]. Next to the famous ABCB1, the other members of the *ABCB* gene family have been much less investigated, although some of those have also been associated with the development of chemoresistance.

RCC has a high intrinsic chemoresistance, which is also suspected to be due to the upregulation of diverse ABC efflux pumps, such as ABCB1, which also shows particularly high expression in the main RCC subtypes compared with other cancers [3–5]. Additionally, the differential response rates to the current systemic therapies are difficult to predict, and the resistance mechanisms are biologically still not fully understood. To systematically characterize the ABCB in RCC, we correlated the expression profiles of ABCB1–10 with overall survival (OS) using log-rank test in the three most common RCC subtypes, clear cell (ccRCC), kidney renal papillary (KIRP), and kidney chromophobe (KICH) RCC, for >850 patients from The Cancer Genome Atlas (TCGA), followed by an investigation of the role of ABCB8, which was identified as a significant predictor of poor survival, in ccRCC.

2. Patients and methods

The main manuscript contains focused material and method information. More detailed information on the experimental workflow is described in the Supplementary material.

This study was approved by the ethics committee at the University Hospital Bonn (number: 273/18).

2.1. Transcriptome data assembly

TCGA transcriptome sequencing data, genomic data of the *VHL* gene (mutations and copy number variants to determine genomic biallelic loss), and comprehensive clinical data were downloaded from the UCSC Xena browser and cBioportal [8–14]. Microarray data from RCC4^{VHL-} and RCC4^{VHL+} cells under normoxia, after stepwise hypoxia (<0.01% oxygen) and reoxygenation, were downloaded via Gene Expression Omnibus; these analyses were performed once or as biological duplicates (GSE4186) [15].

2.2. Real-time polymerase chain reaction

ABCB8 was assessed in a large cohort of ccRCC patients using quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR; Table 1). RNA isolation of tissue samples with subsequent quantitative PCR (qPCR) was performed as described previously [16,17].

2.3. Western Blot

Antibodies against ABCB8 1:1000 (PA5-49697; Thermo Fisher) and beta-actin 1:4000 (#A5316; Sigma-Aldrich) were used.

2.4. Immunohistochemistry

An RCC tissue microarray (TMA) was assessed as described previously (Table 1) [18]. Immunohistochemical staining was performed via the Ventana Benchmark automated staining system using a specific polyclonal ABCB8 antibody (Abcam ab182662, dilution 1/50). The QuPath image analysis software was used to quantify ABCB8 protein expression as H scores in ccRCC and normal adjacent tissue (NAT) [19,20].

Table 1 – Clinical-pathological parameters of the cDNA and IHC cohorts

	cDNA cohort		IHC cohort	
	ccRCC <i>n</i> = 102 (%)	NAT <i>n</i> = 50 (%)	ccRCC <i>n</i> = 123 (%)	NAT <i>n</i> = 21 (%)
Sex				
Male	74 (67.3)	34 (68.6)	77 (62.6)	16 (71.2)
Female	28 (32.7)	16 (31.4)	46 (37.4)	5 (18.8)
Age				
Mean	66.0	65.0	61.8	58.9
Min-max	38–89	43–89	26–85	28–80
Pathological stage				
pT1	57 (55.9)	NA	51 (41.5)	NA
pT2	8 (7.8)	NA	28 (22.8)	NA
pT3	35 (34.3)	NA	44 (35.8)	NA
pT4	2 (1.9)	NA	1 (0.8)	NA
Lymph node metastasis	3 (2.9)	NA	9 (7.3)	NA
Distant metastasis	17 (16.7)	NA	14 (11.4)	NA
Follow-up available	92 (90.2)	NA	78 (63.4)	NA

ccRCC = clear cell renal cell carcinoma; IHC = immunohistochemical; NA = not applicable; NAT = normal adjacent tissue.

1.1. Antisense LNA GapmeR-mediated knockdown

GapmeR design and used sequences are provided in the Supplementary material. Transfections were performed using a final concentration of 10 pmol/ml antisense LNA GapmeR and FuGENE HD transfection reagent in a ratio of 1:1 according to the manufacturer's instructions.

1.2. Cell proliferation/cytotoxicity and migration assays

The EZ4U cell proliferation and cytotoxicity assay and Boyden Chamber migration assay were used according to the manufacturer's protocol.

2. Results

2.1. Transcriptome profiling of the ABCB across RCC subtypes

In order to analyze the prognostic relevance of the ABCB across the three most common RCC subtypes, a systematic survival analysis using log-rank tests of ABCB1–10 was performed using the TCGA datasets ccRCC ($n = 532$), KIRP ($n = 290$) and KICH ($n = 66$; Fig. 1A). The ccRCC, KIRP, and KICH cohorts were divided into high- and low-expression subgroups using the median target gene expression, and subsequently, log-rank tests were performed. Of note, various members of the ABCB subfamily show prognostic relevance in the ccRCC and KIRP TCGA cohorts (Supplementary Fig. 1).

In addition, we performed pairwise Spearman correlation analyses of the ABCB members' expression to each other (Fig. 1B), and the highest coexpression in the ccRCC dataset was found for ABCB2 and ABCB3 (also known

as TAP1 and TAP2, respectively; Spearman's r 0.742, $p < 0.0001$). The other ABCB members were mainly negatively correlated with each other presenting comparatively low Spearman correlation coefficients up to -0.388 (ABCB9 and ABCB10), which indicates a low rate of common gene regulation. Regarding the prognostic value, the highest statistical significance was achieved for ABCB8 in the ccRCC cohort ($p = 5.736e-8$), which prompted us to focus on this particular ABCB member for further analyses. In contrast, in KIRP and KICH, ABCB8 showed no effect on OS, and this could be due to the phylogenetic differences of the overall heterogeneous group of RCC. Overall, a differential prognostic impact was evident for multiple members of the ABCB in the examined RCC subtypes.

In ccRCC, increased ABCB8 expression was significantly associated with a higher pathological T stage, metastatic spread, higher grading, and worse clinical outcome (Fig. 2A–D). Considering the three major clinical endpoints (progression-free interval [PFI] after curative surgery, OS, and, even more relevant, cancer-specific survival [CSS]), the ABCB8-overexpressing ccRCC subgroup showed an unfavorable clinical course (Fig. 2E–G). Of note, ABCB8 remained an independent predictor of unfavorable CSS in the ccRCC TCGA cohort after adjustment for covariables (TNM; age) using a multivariate Cox regression model (Table 2).

2.2. ABCB8 mRNA expression in an independent ccRCC cohort

To validate these promising TCGA results, we next aimed to investigate the ABCB8 expression in an independent ccRCC

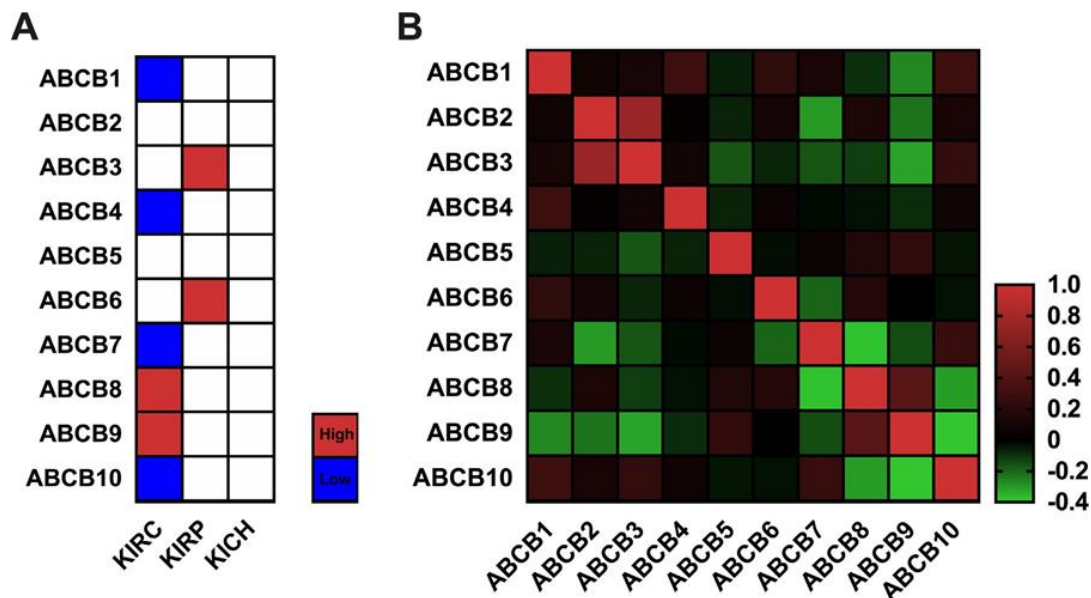


Fig. 1 – Transcriptome profiling of the ABC subfamily B members across the three most common subtypes of renal cell carcinoma. (A) Heatmap of the prognostic value of the transcriptomic expression profiles of ABCB1–10 on the TCGA datasets for clear cell (ccRCC/KIRC, $n = 532$), papillary (KIRP, $n = 290$), and chromophobe (KICH, $n = 66$) renal cell carcinoma; cohorts were dichotomized in high/low-expression subgroups using the median target gene expression. High (red) or low (blue) expression of the target gene is associated with worse overall survival (log-rank test $p < 0.05$). (B) Correlation heatmap using pairwise Spearman's r coefficients of the ABC subfamily B members in RCC to each other. ABC = ATP-binding cassette; ABCB = ABC subfamily B; ccRCC = clear cell RCC; KICH = kidney chromophobe RCC; KIRC = kidney renal clear cell RCC; KIRP = kidney renal papillary RCC; RCC = renal cell carcinoma; TCGA = The Cancer Genome Atlas.

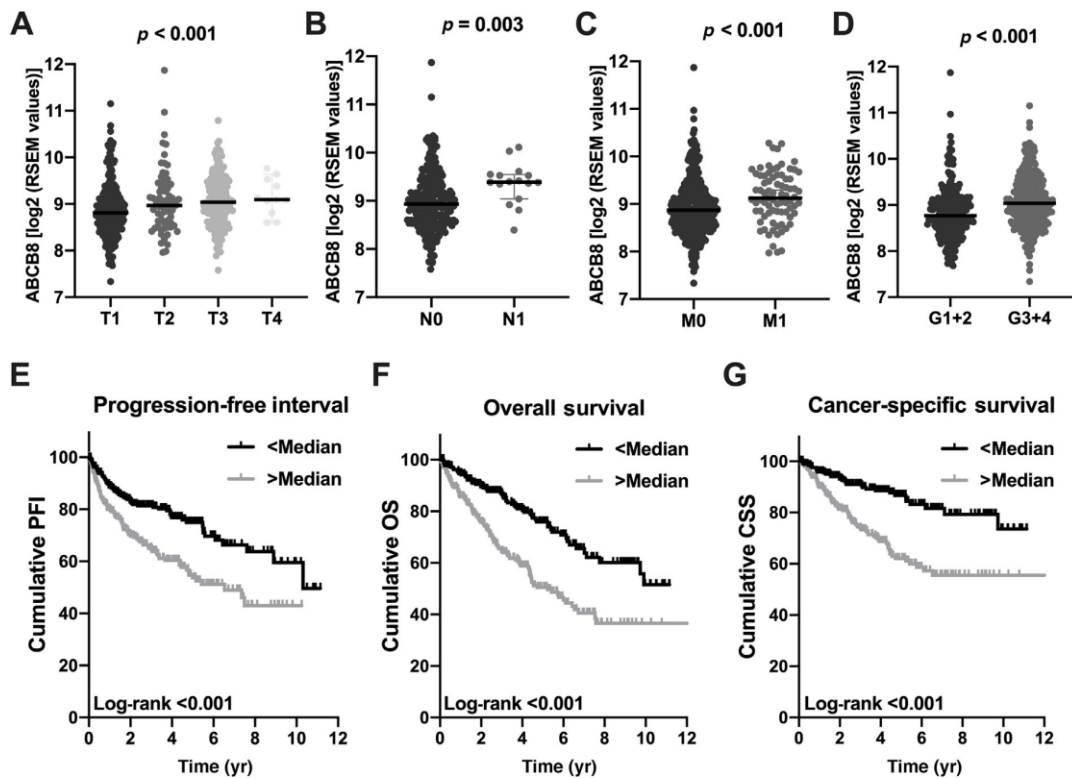


Fig. 2 – Association of ABCB8 with clinical-pathological parameters using the ccRCC TCGA dataset. The scatter plots depict median expression with 95% confidence interval: (A) T staging; (B) lymphonodal metastasis status, N staging; (C) distant metastases, M staging; (D) grading; and (E and F) survival analyses (Kaplan-Meier estimates curve) following the dichotomization of the ccRCC cohort based on the median ABCB8 mRNA expression regarding progression-free interval (PFI), overall survival (OS), and cancer-specific survival (CSS). ABCB = ATP-binding cassette subfamily B; ccRCC = clear cell renal cell carcinoma; G = grade.

Table 2 – Multivariate Cox regression analyses for ABCB8 in the ccRCC TCGA cDNA and IHC cohorts regarding cancer-specific survival

Multivariate Cox regression analyses (TNM, age)		
Clinical-pathological parameters	p value	Hazard ratio (95% CI: low; high)
ccRCC TCGA cohort		
ABCB8	0.005	1.97 (1.23; 3.15)
T stage	0.961	1.01 (0.78; 1.31)
N Stage	0.056	2.12 (0.98; 4.58)
M stage	<0.0001	8.55 (5.01; 14.6)
Age	0.039	1.02 (1.00; 1.05)
ccRCC cDNA cohort		
ABCB8	0.003	1.80 (1.21; 2.68)
T stage	0.429	0.67 (0.28; 1.71)
N stage	0.027	10.8 (1.32; 88.4)
M Stage	0.002	8.99 (2.18; 37.0)
Age	0.005	1.11 (1.03; 1.20)
ccRCC TMA cohort		
ABCB8	0.04	1.01 (1.00; 1.02)
T stage	0.007	4.26 (1.48; 12.3)
N stage	0.251	1.33 (0.82; 2.17)
M stage	0.028	2.05 (1.08; 3.87)
Age	0.713	0.99 (0.93; 1.05)

ABCB = ATP-binding cassette subfamily B; ccRCC = clear cell renal cell carcinoma; IHC = immunohistochemical; TCGA = The Cancer Genome Atlas; TMA = tissue microarray; TNM = tumor, node, metastasis.

cohort (Table 1). The ABCB8 mRNA expression was decreased in ccRCC compared with NAT, as also seen using the ccRCC TCGA datasets and via Western blotting of eight matched ccRCC and NAT samples (Supplementary Fig. 2). However, advanced ccRCC exhibits significantly increased ABCB8 mRNA expression compared with the localized disease status (Fig. 3A). Metastatic primary tumors exhibited increased ABCB8 expression levels, although this remained statistically insignificant (Table 1, and Fig. 3B and 3C). Further, high-grade ccRCC showed enhanced ABCB8 expression (Fig. 3D). Of note, ABCB8 overexpression was associated with unfavorable CSS and proved to be an independent risk factor (Fig. 3E, Table 2). Overall, in concordance with the ccRCC TCGA results, the independent prognostic potential of ABCB8 on worse CSS could thus be validated in an independent cohort.

1.1. Immunohistochemical staining against ABCB8 in a large and clinically annotated ccRCC TMA cohort

ABCB8 expression patterns in ccRCC and NAT are depicted in Figure 4A. ABCB8 was specifically expressed in the cytoplasm and, to some extent, membranous in renal tubules

and ccRCC, which is in accordance with the staining pattern observed in the Human Protein Atlas [21]. In renal tissue, especially the tubules epithelium showed strong ABCB8 protein expression, whereas, in glomeruli, the ABCB8 expression was low or absent. Validating the former data, ABCB8 protein expression was reduced in ccRCC compared with that in NAT tissue (Fig. 4B). In ccRCC, ABCB8 protein was expressed heterogeneously in the cohort. Approximately one-third of all examined ccRCCs were determined as ABCB8 positive (H score >50) and showed preferentially strong membranous ABCB8 expression [20]. After dichotomizing the cohort using the median ABCB8 protein expression, there was a significant reduction in the OS and CSS for the ABCB8-overexpressing subgroup (Fig. 4C and 4D). Interestingly, the ABCB8 overexpression was shown to be an independent predictor of reduced CSS (Table 2). Further, there was a tendency toward higher ABCB8 expression in locally advanced and metastatic tumors, which did not reach statistical significance, probably due to sample size (Table 1 and Supplementary Fig. 3). Overall, increased ABCB8 expression could thus be identified as an independent predictor of unfavorable CSS in ccRCC on both the transcriptional and the translational level.

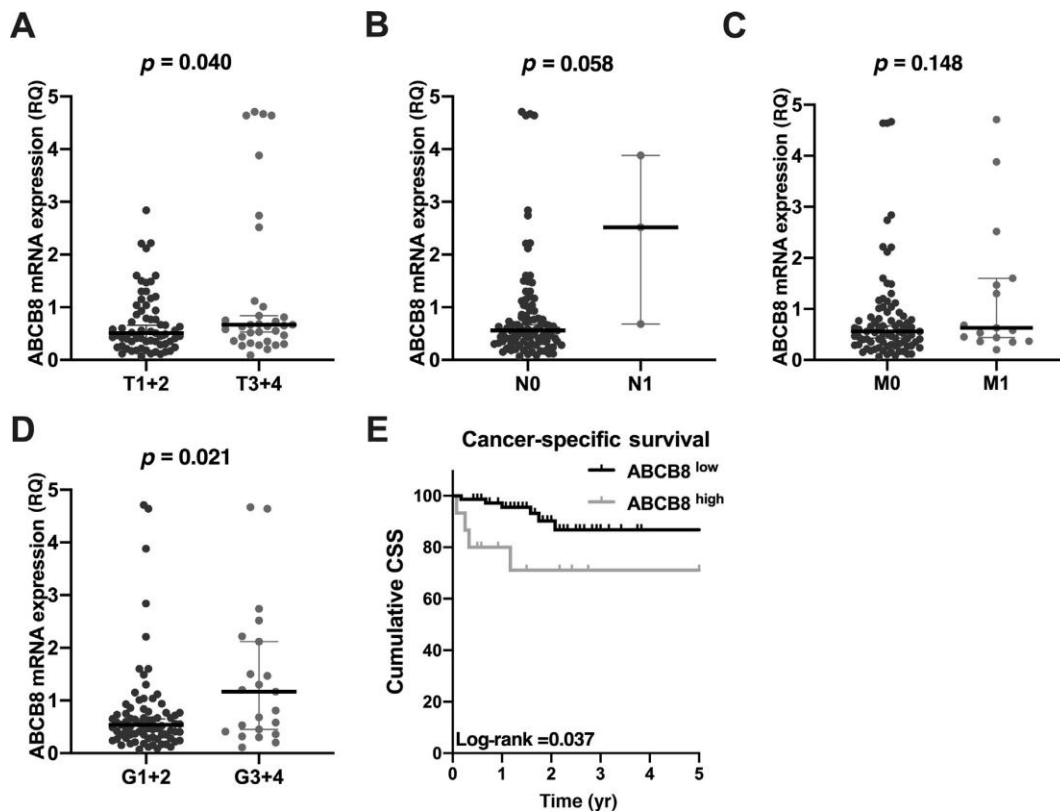


Fig. 3 – Association of clinical-pathological parameters with ABCB8 mRNA expression in an independent cohort of 102 ccRCC and 50 control tissue samples: (A) T staging, (B) N staging, (C) M staging, and (D) grading. The scatter plots depict median expression with a 95% confidence intervals. Using an optimized cutoff, tumors overexpressing ABCB8 mRNA are correlated with unfavorable OS compared with tumors with low ABCB8 mRNA levels. ABCB8 = ATP-binding cassette subfamily B; ccRCC = clear cell renal cell carcinoma; CSS = cancer-specific survival; OS = overall survival; RQ = relative quantification

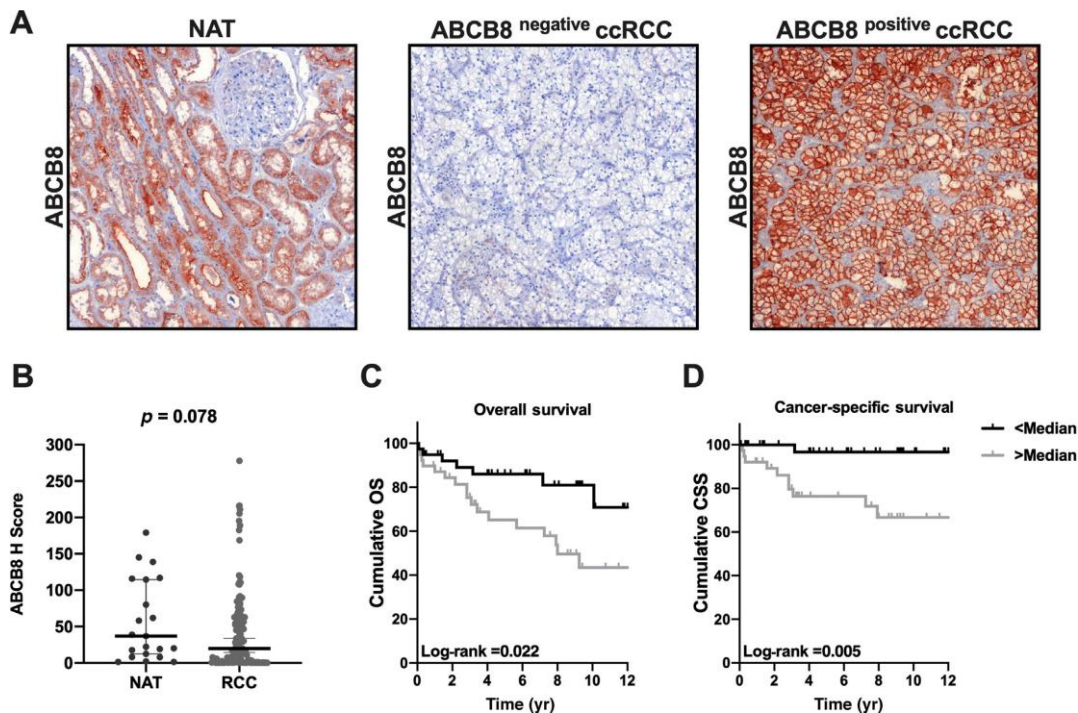


Fig. 4 – IHC staining of ABCB8 with subsequent software-based expression analyses in a comprehensive cohort of clinical samples using a tissue microarray construct. (A) Representative images of ABCB8 IHC staining for kidney tissue (normal adjacent tissue [NAT]), and ABCB8-negative and ABCB8-positive ccRCC tissue samples (5T objective magnification). (B) ABCB8 protein expression is enhanced in the NAT compared with ccRCC tissue. The scatter plot depicts the median expression, with a 95% confidence interval. (C and D) ABCB8-overexpressing tumors exhibit worse overall and cancer-specific survival. ABCB8 = ATP-binding cassette subfamily B; ccRCC = clear cell renal cell carcinoma; CSS = cancer-specific survival; IHC = immunohistochemical; OS = overall survival.

1.1. Functional characterization of ABCB8 in vitro

In order to investigate the functional role of ABCB8 in renal cancer cells in vitro, we aimed to induce ABCB8 knock-downs in established ccRCC cell culture models. The two metastatic RCC cell lines ACHN and CAK1 were chosen for further analyses, as they both strongly express ABCB8 under standard conditions (Fig. 5A). ACHN exhibited enhanced ABCB8 mRNA and protein expression compared with CAK1. However, this did not achieve statistical significance (Supplementary Fig. 4A and 4B). Of note, the VHL-deficient 786O expressed only a low amount of ABCB8 protein compared with ACHN and CAK1, both of which possess VHL wildtype. In ccRCC TCGA, there was also reduced ABCB8 expression in VHL-deficient tumors (biallelic loss of VHL, and mutation and/or deletion of *VHL* gene) compared with VHL wildtype (Supplementary Fig. 5A), and the ABCB8 expression inversely correlates with the hypoxia-induced genes

HIF1A (Spearman's $r = -0.132$), *VEGFA* (Spearman's $r = -0.330$), and particularly *HIF2A* (Spearman's $r = -0.567$; Supplementary Fig. 5B–D). Nevertheless, in the VHL-deficient ccRCC subgroup and even more pronounced in the VHL-wildtype ccRCC subgroup, ABCB8 expression showed a strong association with decreased CSS (Supplementary Fig.

5E and 5F). Thus, regardless of the VHL status, ABCB8 seems to be associated with an aggressive ccRCC phenotype.

Next, efficient ABCB8 knockdowns could be established in both metastatic ccRCC cell lines on the mRNA and the protein level, validated by qPCR and Western blot (Fig. 5B and 5C). Particularly, ABCB8 depletion had a significant impact on the proliferative activity in both examined ccRCC cell lines. After ABCB8 knockdown, the viability was impaired progressively, especially in the ACHN cell line (Fig. 5D). A significant reduction of migration capacity, which is an essential trait in the metastatic spread and constitutes an aggressive phenotype, was seen in both ccRCC cell lines after specific ABCB8 knockdown (Fig. 5E–G).

In order to investigate a possible interaction between ABCB8 and the VHL/HIF axis, the microarray dataset GSE4186 was analyzed [15]. Of note, in the VHL-deficient RCC4 cell line, re-expression of VHL did not lead to differential ABCB8 expression under normoxia, stepwise hypoxia, or reoxygenation (Supplementary Fig. 5G). Thus, we observed that the mRNA expression of *VEGFA*, *HIF1A*, and *HIF2A* was not affected by the depletion of ABCB8 in both cell lines (data not shown). Therefore, we conclude that the VHL-HIF pathway does not seem to affect the ABCB8 expression directly.

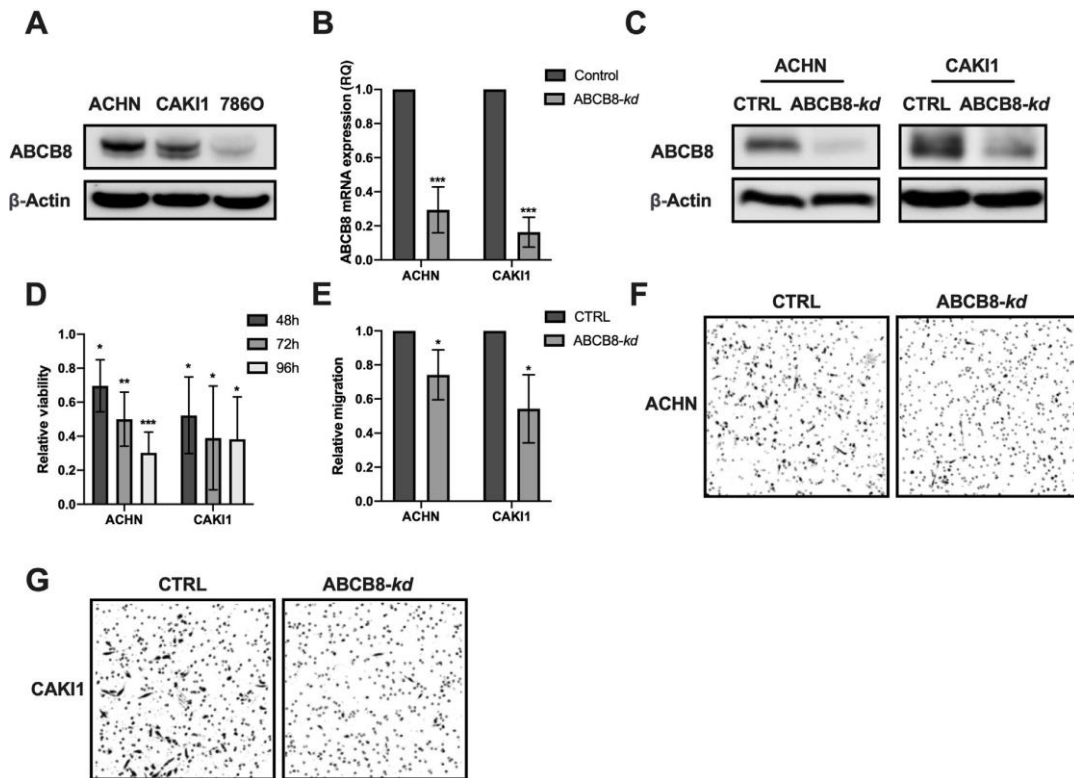


Fig. 5 – Functional analyses of ABCB8 in ccRCC cell lines. (A) Screening Western blot under baseline conditions for ACHN, CAK11, and 786O. (B and C) An antisense LNA Gapmer-mediated ABCB8 knockdown was induced in the two ccRCC cell lines ACHN and CAK11, and validated on the mRNA and protein level via qPCR and Western blotting. The specific ABCB8 knockdown led to significantly reduced (D) viability and (E–G) migration capacity in the cell lines compared with the negative controls (10T objective magnification). Boxplots in Figures 5B, 5D, and 5E depict mean with standard deviation; each experiment was performed in biological triplicates. ABCB = ATP-binding cassette subfamily B; ccRCC = clear cell renal cell carcinoma.

In conclusion, specific ABCB8 depletion reduces the malignant properties of both investigated cell lines, and therefore, ABCB8 contributes to a malignant phenotype in these two metastatic ccRCC cell culture models.

1. Discussion

In an explorative approach, we analyzed prognostically relevant ABCB members across the TCGA datasets for the three most common subtypes of RCC. In particular, ABCB8 was identified as the ABCB member with the most prognostic potential throughout the RCC TCGA cohorts. Its malignant potential was confirmed in two independent RCC cohorts on the transcriptional and translational levels. Using an *in vitro*, transient, ABCB8-specific knockdown, we observed significantly reduced proliferation and migration capacities in two metastatic ccRCC cell lines, giving further hints for the malignant properties of ABCB8 in ccRCC. To date, the role of ABCB8 in ccRCC has not been investigated. Our study shows for the first time that ABCB8 is overexpressed in phenotypically aggressive ccRCC tumors and

has an independent prognostic value at transcriptional and translational levels, and that most importantly, ABCB8 affects functionally important parameters for malignancy in the ccRCC cell culture model. Overall, we conclude that ABCB8 plays a tumor-promoting role in ccRCC.

An interesting finding is that ABCB8 expression is lower in VHL-deficient ccRCC and is negatively correlated with VEGFA, HIF1A, and HIF2A in the ccRCC TCGA cohort. However, this association could not be reproduced *in vitro*, as re-expression of VHL in the VHL-deficient RCC4 cell line did not lead to differential ABCB8 expression under normoxia, stepwise hypoxia, or reoxygenation compared with VHL-deficient RCC4 (Supplementary Fig. 5G) [15]. Thus, it should be noted that independent of the genomic VHL status, ABCB8 is associated with unfavorable CSS in the ccRCC TCGA cohort and thus seems to mediate malignant properties independent of VHL.

Considerable progress has been made in characterizing some members of the ABC transporters family and in deciphering their role played in chemoresistance mechanisms. The comprehensive analysis of the ABCB8 subfamily revealed some exciting and previously unknown prognostic

associations in the common RCC subtypes. In KIRP, ABCB3 and ABCB6 overexpression was associated with lower survival rates. In the ccRCC TCGA cohort, low expression of ABCB1, ABCB4, ABCB7, and ABCB10 predicted unfavorable OS. Thus, our *in silico* approach represents an interesting tool for further studies, as the knowledge about various members of the ABCB subfamily is limited. In the ccRCC TCGA cohort, ABCB8 expression was significantly associated with reduced PFI, OS, and CSS, and remained an independent predictor of an unfavorable outcome. Thus, the prognostic value of ABCB8 was thoroughly validated in two independent cohorts, and therefore ABCB8 could be an interesting prognostic biomarker.

ABCB8 plays a crucial role in mitochondrial iron homeostasis and is known to contribute to the protection of cells against oxidative stress [22]. Unbalanced iron homeostasis may lead to ferroptosis under certain cellular conditions. Ferroptosis is a biochemically distinct type of programmed cell death, dependent on iron and induced by the accumulation of lipid peroxides [23]. It has been proposed that ccRCC confers an intrinsic vulnerability to ferroptosis due to its unique metabolic state associated with aberrant lipid and glycogen accumulation, which may have a therapeutic potential [24]. Interestingly, ABCB8 correlates with the expression of both known ferroptosis inhibitors, GPX4 and FSP1 [25–27], in the ccRCC TCGA cohort (Supplementary Fig. 6), which could be a hint that ABCB8 also contributes to ferroptosis, but this needs further biological validation. Of note, as shown for other ABCB members [2,3],

ABCB8 also seems to play a role in mediating chemoresistance, particularly against doxorubicin in melanoma cells [28,29]. Whether ABCB8 plays a role in chemoresistance in ccRCC has yet to be proved by further mechanistic analyses.

In RCC cell lines, a specific ABCB8 knockdown significantly impaired proliferation and migration capacities of two metastatic ccRCC cell lines. The proliferation capacity decreased progressively in a time-dependent manner. This result may be due to mitochondrial damage and increased concentrations of reactive oxygen species following ABCB8 depletion and may be due to ferroptosis either. A similar phenomenon was also reported after cardiac ABCB8 depletion in a mouse model, leading to cardiomyopathy and mitochondrial iron accumulation [22]. It can be reasoned that the reduced migration capacity of transfected cells depicts a secondary effect of the impaired viability, and it remains unclear whether ABCB8 plays a direct role in cell motility.

1. Conclusions

The clinical implications of our findings are that ABCB8 could be a promising prognostic biomarker in ccRCC with additive value to the established histopathological parameters. Further, ABCB8 could modulate the chemoresistance of existing and future therapies in ccRCC. Functional analyses following ABCB8 depletion revealed impaired migration capacities and reduced proliferative activity in ccRCC cell culture models. In this context, further studies

exploring the precise implications of ABCB8 in ccRCC are necessary and of great interest.

Author contributions: Niklas Klümper had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study concept and design: Klümper, Ellinger.

Acquisition of data: Klümper, Blajan, Miersch, Schmidt.

Analysis and interpretation of data: Klümper, Ellinger, Blajan, Schmidt.

Drafting of the manuscript: Klümper, Blajan, Ellinger.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content:

Miersch, Schmidt, Kristiansen, Perner, Ritter.

Statistical analysis: Klümper.

Obtaining funding: Klümper, Blajan, Ritter, Ellinger.

Administrative, technical, or material support: Ritter, Ellinger, Schmidt.

Supervision: Ellinger.

Other: None.

Financial disclosures: Niklas Klümper certifies that all conflicts of interest, including specific financial interests and relationships and affiliations relevant to the subject matter or materials discussed in the manuscript (eg, employment/affiliation, grants or funding, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, royalties, or patents filed, received, or pending), are the following: None.

Funding/Support and role of the sponsor: This study was supported by a Ferdinand Eisenberger grant of the Deutsche Gesellschaft für Urologie (German society of Urology; grant ID KIN1/FE-19 [Niklas Klümper]) and the BONFOR Program of the medical faculty of the University of Bonn (grant ID 2019-4-05 [Iulia Blajan]).

Acknowledgments: The tissue samples were collected within the framework of the CIO Biobank at the University Hospital Bonn.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.euf.2020.09.007>.

References

- [1] Xu W, Atkins MB, McDermott DF. Checkpoint inhibitor immunotherapy in kidney cancer. *Nat Rev Urol* 2020;17:137–50.
- [2] Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008;9:105–27.
- [3] Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer* 2018;18:452–64.
- [4] Bak M, Efferth T, Mickisch G, Mattern J, Volm M. Detection of drug resistance and P-glycoprotein in human renal cell carcinomas. *Eur Urol* 1990;17:72–5.
- [5] Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, et al. Expression of multidrug resistance gene in human cancers. *JNCI J Natl Cancer Inst* 1989;81:116–24.
- [6] Chae J-W, Teo YL, Ho HK, et al. BSA and ABCB1 polymorphism affect the pharmacokinetics of sunitinib and its active metabolite in Asian mRCC patients receiving an attenuated sunitinib dosing regimen. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;78:623–32.
- [7] Tulsyan S, Mittal RD, Mittal B. The effect of ABCB1 polymorphisms on the outcome of breast cancer treatment. *Pharmacogenomics Pers Med* 2016;9:47–58.

- [1] The Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein JN, Collisson EA, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* 2013;45:1113–20.
- [2] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013;499:43–9.
- [3] Davis CF, Ricketts CJ, Wang M, et al. The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2014;26:319–30.
- [4] Cancer Genome Atlas Research Network, Linehan WM, Spellman PT, Ricketts CJ, et al. Comprehensive molecular characterization of papillary renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2016;374:135–45.
- [5] Liu J, Lichtenberg T, Hoadley KA, et al. An integrated TCGA pan-cancer clinical data resource to drive high-quality survival outcome analytics. *Cell* 2018;173, 400–416.e11.
- [6] Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013;6, pl1.
- [7] Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012;2:401–4.
- [8] Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006;3:187–97.
- [9] Müller FE, Braun M, Syring I, et al. NDUFA4 expression in clear cell renal cell carcinoma is predictive for cancer-specific survival. *Am J Cancer Res* 2015;5:2816–22.
- [10] Brüggemann M, Gromes A, Poss M, et al. Systematic analysis of the expression of the mitochondrial ATP synthase (complex V) subunits in clear cell renal cell carcinoma. *Transl Oncol* 2017;10:661–8.
- [11] Klümper N, Syring I, Offermann A, et al. Differential expression of mediator complex subunit MED15 in testicular germ cell tumors. *Diagn Pathol* 2015;10:165.
- [12] Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017;7:16878.
- [13] Huang HJ. Association between tumour characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer. *J Clin Pathol* 2005;58:611–6.
- [14] Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015;347:1260419.
- [15] Ichikawa Y, Bayeva M, Ghanefar M, et al. Disruption of ATP-binding cassette B8 in mice leads to cardiomyopathy through a decrease in mitochondrial iron export. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109: 4152–4157.
- [16] Stockwell BR, Angeli JPF, Bayir H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell* 2017;171:273–85.
- [17] Zou Y, Palte MJ, Deik AA, et al. A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis. *Nat Commun* 2019;10:1617.
- [18] Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* 2014;156:317–31.
- [19] Doll S, Freitas FP, Shah R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature* 2019;575:693–8.
- [20] Bersuker K, Hendricks J, Li Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature* 2019;575:688–92.
- [21] Chen KG, Valencia JC, Gillet J-P, Hearing VJ, Gottesman MM. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009;22:740–9.
- [22] Elliott AM, Al-Hajj MA. ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome. *Mol Cancer Res* 2009;7:79–87.

3. Anhang

3.1 Ergänzende Informationen zu den Materialien und Methoden (Supplementary material)

Ergänzende Informationen zu den verwendeten Materialien und Methoden, ursprünglich als Supplementary File in der Originalpublikation Blajan et al., 2021, Formatierung angepasst, englische Sprache belassen.

Transcriptome data assembly

TCGA transcriptome sequencing data (RNA-Seq v2) for ABCB1-10, HIF1A, HIF2A, VEGFA, GPX4, FSP1 and comprehensive clinical data were downloaded from the UCSC Xena browser (<http://xena.ucsc.edu>) (ccRCC $N = 532$, KIRP $N = 290$, KICH $N = 66$, normal adjacent tissue (NAT) $N = 72$) (8–12). The genomic status of the VHL gene (truncating/missense mutation and deletion) of the ccRCC TCGA cohort was downloaded from the cBioportal website to investigate biallelic loss of VHL (<http://www.cbioportal.org>) (13,14). For the survival analyses, the endpoints progression-free interval (PFI), cancer-specific (CSS) and overall survival (OS) were selected. These endpoints were comprehensively assessed for the ccRCC TCGA and recommended to be the accurate endpoints to perform high-quality survival outcome analytics for the ccRCC cohort (13).

Microarray data (Stanford Denko EOS Human 35K Genechip v1.1) from RCC4^{VHL-} and RCC^{VHL+} cells under normoxia, after stepwise hypoxia (<0.01% oxygen) and reoxygenation were downloaded via Gene Expression Omnibus; these analyses were performed once or as biological duplicates (GSE4186) (15).

Patient samples

All patients gave written informed consent for the collection of biomaterials. Fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples from patients undergoing partial or radical nephrectomy for renal tumors were prospectively collected in the Biobank at the CIO Cologne Bonn at the University Hospital Bonn. The samples were archived according to standard operating procedures: The specimen was snap-frozen, tumor and normal renal tissue macrodissected and stored at -80°C. An experienced pathologist confirmed the diagnosis using hematoxylin and eosin-stained sections before tissue samples were further processed. The staging was performed according to the 7th edition of the TNM classification.

RNA isolation

RNA isolation of tissue samples was performed as described previously (16,17): Approximately 50 mg tissue was homogenized and the total RNA isolated using the mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Foster City, CA, USA). To exclude DNA contamination, we treated the RNA twice with DNase (DNA-free Kit, Ambion).

The RNA of the cell lines was isolated from pellets using the Total RNA Purification Mini Spin Column Kit (Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, DE). No DNase was used in the RNA isolation procedure, due to planned genomic DNA elimination integrated in the reverse transcription step with the PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser. The RNA quantity and quality were determined using the NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Real-Time PCR

Differentially expressed mRNA was investigated in a large cohort of ccRCC patients using quantitative real-time PCR (Table 1). In brief, 1 µg total RNA was reverse transcribed using the PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser and 5 ng cDNA was used for real-time PCR (1x SYBR Premix Ex Taq II with ROX Plus and 10 pmol/µl PCR primers; all reagents: Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, France).

The PCR experiments were performed with an ABIPrism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Data were analyzed using Qbase+ (Biogazelle) with *β-actin* and PPIA using the $\Delta\Delta$ Ct method.

The ABCB8 knockdown validation and possible target gene expression (HIF1A, HIF2A, VEGFA) was conducted after genomic DNA elimination by treating 1 µg of total RNA with gDNA Eraser for 2 minutes at 42°C, followed by reverse transcription with the same PrimeScript RT Reagent Kit. The real-time PCR experiments were performed on a QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.), using 5 ng cDNA, the 1x SYBR Premix Ex Taq II with ROX Plus and 10 pmol/µl of the ABCB8 and *β-Actin* primers. Levels of expression were normalized to *β-Actin* and quantified using the $\Delta\Delta$ Ct method.

The following primer sequences were used:

ABCB8 forward: 5'-CTGTCAGGTACTCTGATGGCT-3' and reverse: 5'-TCCATCTGGGAGCTAGGGG-3'

β-Actin forward: 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3' and reverse: 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'

HIF1A forward: 5'-TGGCTGCATCTCGAGACTTT-3' and reverse: 5'-GAAGACATCGCGGGGAC-3'

HIF2A forward: 5'-GCTGACAAGGAGAAGAAAAGGAGT-3' and reverse: 5'-TGGGCCAGCTCATAGAACAC-3'

VEGFA forward: 5'-AGCTGCGCTGATAGACATCC-3' and reverse: 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3'

Western Blot

Western Blots were assessed to validate the ABCB8 knockdown efficiency on the translational level in the transfected ccRCC cell lines: Post-transfected cell pellets were

washed with buffered saline (PBS) and homogenized in 50µl cell lysis buffer (Cell Signaling, Cambridge, United Kingdom) including Complete Mini EDTA free protease inhibitor (Roche, Basel, Switzerland). In addition, eight paired ccRCC and NAT were homogenized in a Precellys 24 homogenizer (Peqlab, Erlangen, Germany) with 400 µl Cell Lysis Buffer (Cell Signaling, Cambridge, United Kingdom) including protease inhibitor (Complete Mini EDTA-free, Roche, Basel, Switzerland). The protein concentration was determined using a BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). The samples were then loaded on NuPAGE 4-12% Bis Tris Midi Gel and separated in a XCell4 SureLock Electrophoresis System (Life Technologies). The transfer was performed on 0.2 µm nitrocellulose (iBlot Gel Transfer Stacks and iBlot Dry Blotting System- Life Technologies), and the non-specific protein binding sites were blocked with a 5% non-fat milk in TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) for 60 min. Consequently, incubation was performed with antibodies against ABCB8 1:1000 (PA5-49697, Thermo Fisher) and β -Actin 1:4000 (#A5316, Sigma-Aldrich) Detection was performed with horseradish peroxidase-associated antibodies (antirabbit POD, # 7074 Cell Signaling and anti-mouse-POD, # 170-6516, Bio-Rad). The chemiluminescence signal was visualized with a SuperSignal WestFemto Kit (Thermo Scientific) and documented with a LAS 3000 Image Reader (Fujifilm, Tokyo, Japan). The densitometric analyses of the ABCB8 bands were performed using the Multi Gauge Version 2.3 (Fujifilm, Tokyo, Japan) and normalized to β -Actin.

Immunohistochemistry

A tissue microarray (TMA) from paraffin-embedded renal tissue provided was assessed as described previously (19). The clinically annotated TMA contains ccRCC and normal adjacent renal tissue (NAT) samples provided from the University Hospital of Bonn and was used to determine ABCB8 protein expression (Table 1). Paraffin sections of 5 µm thickness were cut from the tissue microarray block and subsequently stained on the Ventana Benchmark automated staining system (Ventana Medical System, Tuscon, AZ, USA) using a specific polyclonal ABCB8 antibody according to the manufacturer (Abcam ab182662, Dilution 1/50). The slides were incubated with the primary antibody for 40 minutes at room temperature. Antibody dilution was conducted with the Ventana diluent. Signal detection was performed with the ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit. The slides were finally counterstained with hematoxylin and Bluing Reagent, dehydrated and mounted.

The IHC revealed ABCB8-specific cytosolic staining, in concordance with previous literature, implying its association to a cytoplasmic organelle, most certainly the mitochondria. Membranous ABCB8 positivity was also detected in ccRCC specimens, as well as in normal tissue. This finding is in accordance with the immunohistochemical staining pattern in the RCC cohort of The Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org, (22)).

Each slide was scanned by the Panoramic Midi (3D HISTECH, Budapest, Hungary). The QuPath image analysis software was used to quantify ABCB8 protein expression in ccRCC and NAT (19). The histological pattern of the ccRCC or NAT was trained into the QuPath software. The tumor or NAT regions were then automatically detected and after setting specific thresholds ABCB8 expression was evaluated using the H scoring system. Results were afterwards reviewed manually for reliability. H scores below 50 were determined as ABCB8-negative as described by Huang et al (21).

Cell lines and culture conditions

The renal carcinoma cell lines ACHN, CAK11 and 786O were purchased from the Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Culture (Braunschweig, Germany). All experiments were performed with mycoplasma-free cells, which have been authenticated prior the study began. The ACHN and 786O cell lines were cultured in RPMI1640 medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) whereas CAK11 cells were maintained in McCoy's 5A medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), both supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS Superior, Biochrom GmbH, Berlin, Germany), 0,4% penicillin/streptomycin and 1% glutamine (Thermo Fisher Scientific, Inc., Darmstadt, Germany) in 5%CO₂/ 95% air at 37°C.

Antisense LNA GapmeR-mediated knockdown

The specific ABCB8 GapmeR construct was designed using the online available Antisense Gapmer Designer from Exiqon for transient ABCB8-knockdown in vitro (Vedbaek, Denmark). The specific sequence of the ABCB8 GapmeR is as follows (5'–3'): G*C*A*G*T*T*G*A*A*G*G*C*G*A*T*G. The following non-targeting negative control GapmeR sequence Negative Control A was also used: Neg Ctrl-A: A*A*C*A*C*G*T*C*T*A*T*A*C*G*C. Transfections in the CAK11 and ACHN cell lines were performed using a quantity of 10 µl/well for 6-well plates and 0,5µl/well for 96-well plates with a final concentration of 10 pmol/µl Antisense LNA GapmeR (QIAGEN, Hilden, DE) and FuGENE HD-Transfection reagent (#E2311, Promega Corporation, Madison, WI USA) in a ratio of 1:1 according to the manufacturer's instructions. Transfection incubation time spans were 48 h for PCR and 72 h for Western blotting.

Cell proliferation assays

The EZ4U cell proliferation assay kit was used according to the manufacturer's protocol (EZ4U; Biomedica Group, Vienna, Austria). Either 1,5x10⁴ of the CAK11 cells or 2,4x10⁴ of the ACHN cells were seeded per well in 96-well plates in 200 µl Medium and were left to adhere overnight for GapmeR transfection. Measurements were performed at 48-, 72- and 96-hours post-transfection by adding 20µl of the activated EZ4U substrate and results were relativized to the negative control of the examined time point. A subsequent 3-hour incubation at 37°C allows the viable cells to reduce the straw-yellow colored tetrazolium

salts to intensively red-colored formazan derivatives. The absorbance was measured using a microplate reader (Tecan Spectra Thermo, SLT Labinstrumente Deutschland GmbH) at 450 nm wavelength, with a 620nm reference. Each experiment was performed in triplicates.

Migration assays

The Antisense LNA GapmeR transfections were performed in 6-well plates. 48 h post-transfection, cells were trypsinated and seeded into migration Boyden chambers. 5×10^4 cells of both the ACHN and CAKI1 were plated in the upper chamber of the migration inserts (VWR, Darmstadt, Germany) containing 2% FCS medium. The lower chamber was filled with medium containing 10% FCS for chemotactic attraction. After 24 h of incubation, cells were fixed with 4% formaldehyde (PanReac AppliChem, Darmstadt, Germany), stained with hematoxylin (Vector Hematoxylin Counterstain H-3404, Vector Laboratories), and washed with water. Cells on the upper surface of the membrane were removed with the help of a cotton swab. Membranes were scanned and cells were counted automatically by nucleus detection using the QuPath software. Each experiment was performed in triplicates.

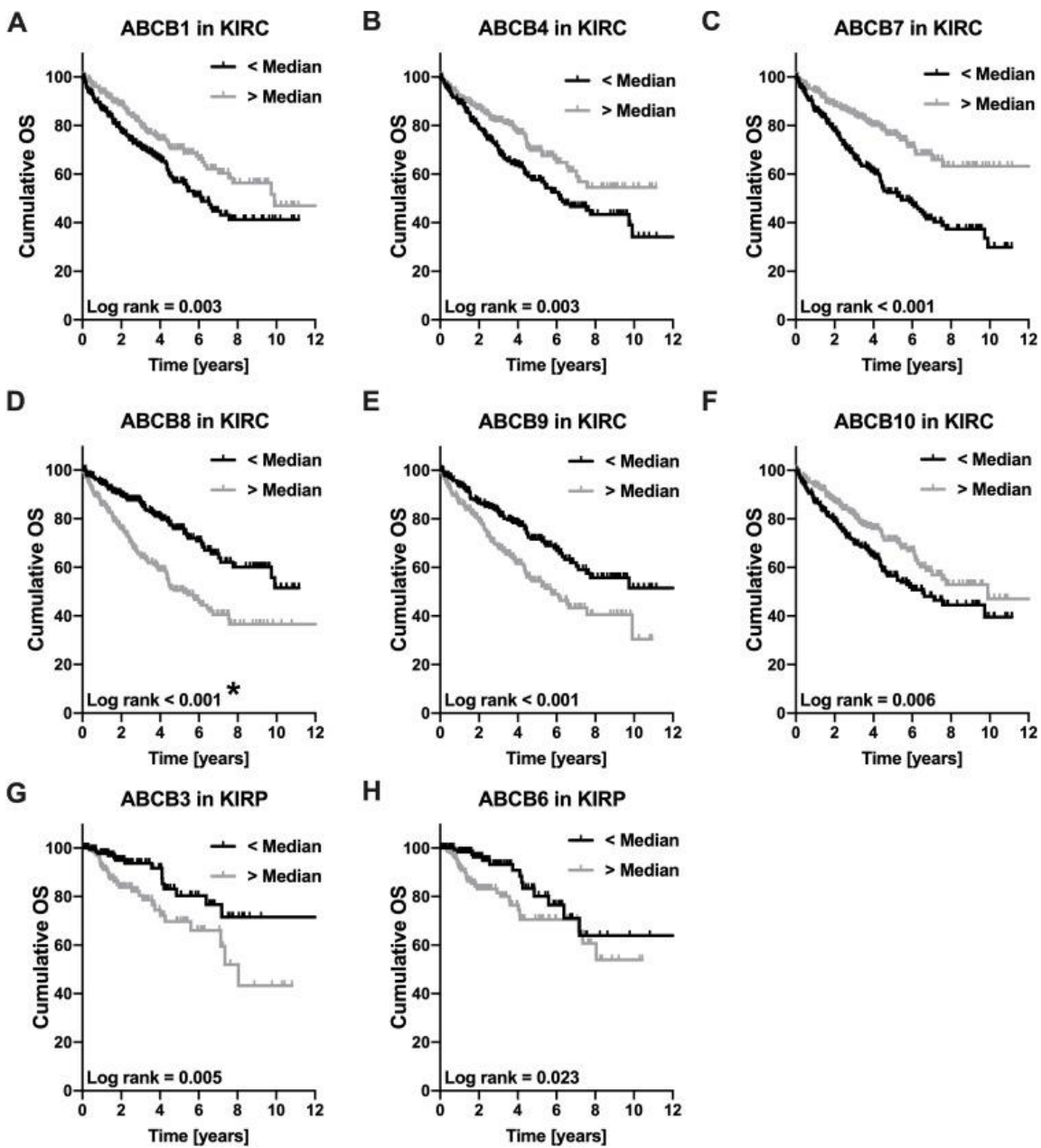
Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS Statistics v25, Microsoft Excel, and GraphPad Prism Version 8.2.1. The nonparametric Mann-Whitney-U or Kruskal-Wallis test were used for group comparisons. Association of ABCB members co-expression was evaluated by Spearman rank correlation. Multivariate Cox regression analyses [TNM; Age] and Kaplan-Meier estimate curves were performed to evaluate the prognostic value of gene expression levels on patients' PFI, CSS and OS.

3.2 Überlebensanalysen der prognostisch relevanten Mitglieder der ABCB-Transporterfamilie in den TCGA-Datensätze für das ccRCC (KIRC) und KIRP (Supplementary Figure 1)

Kaplan-Meier Schätzer für die prognostisch relevanten ABCB Transporter in den ccRCC und KIRP Datensätze des TCGA, ursprünglich als Supplementary Figure 1 in der Originalpublikation Blajan et al., 2021, Formatierung angepasst, englische Sprache belassen.

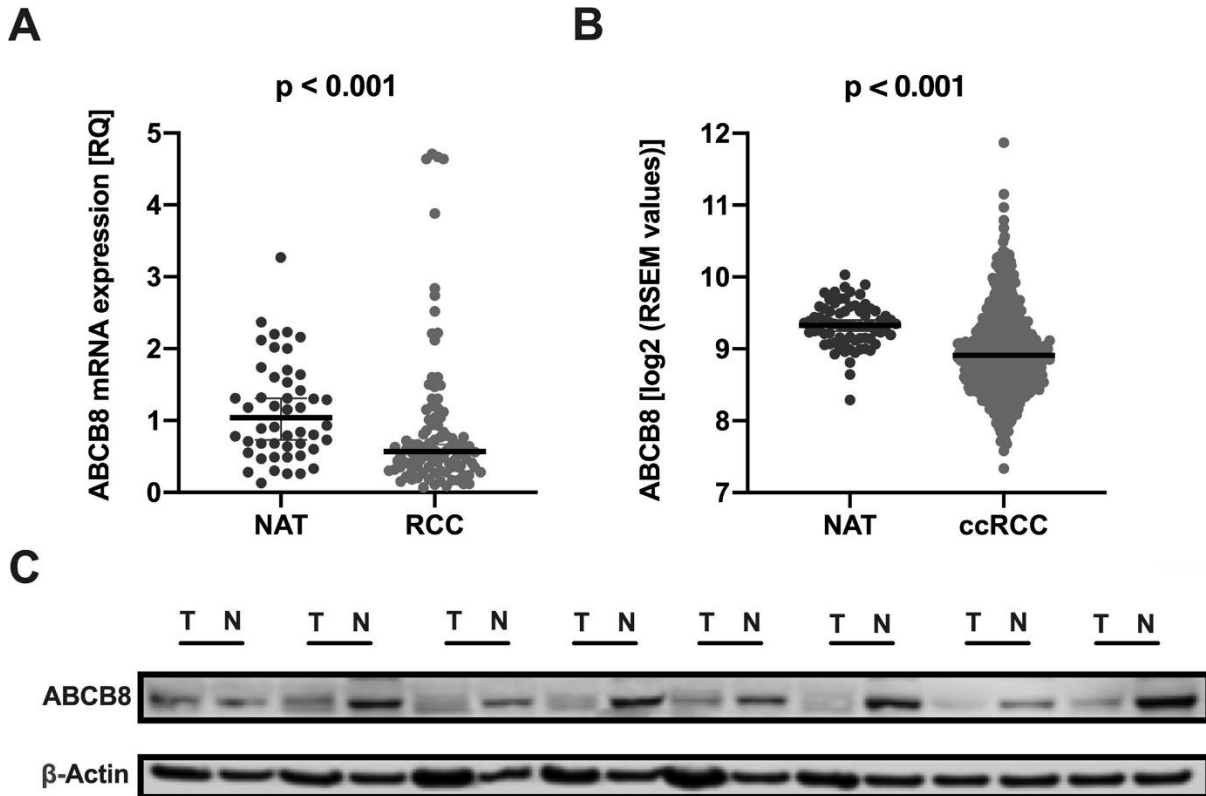
Suppl. Figure 1 A-H, Kaplan-Meier estimate curves are illustrated for the prognostically relevant members of the ABCB subfamily in the ccRCC and KIRP TCGA cohort.



3.3 Expressionsprofile der ABCB8 mRNA in der cDNA Validierungskohorte (A) und in der TCGA ccRCC Kohorte (B) sowie ABCB8 Proteinexpression in ccRCC (C) verglichen mit normalem paratumoralem Nierengewebe (Supplementary Figure 2)

Die in der Originalpublikation Blajan et al., 2021 ursprünglich als Supplementary figure 2 beigefügte Abbildung zeigt, dass die ABCB8 mRNA-Expression in dem normalen paratumoralen Nierengewebe (NAT) in der cDNA Validierungskohorte (A) und in der TCGA ccRCC Kohorte (B) erhöht ist. Mittels Western Blotting von acht gepaarten ccRCC (T) und NAT (N) Proben zeigte sich die ABCB8 Proteinexpression in NAT ebenfalls erhöht (C).
Formatierung angepasst, englische Sprache belassen.

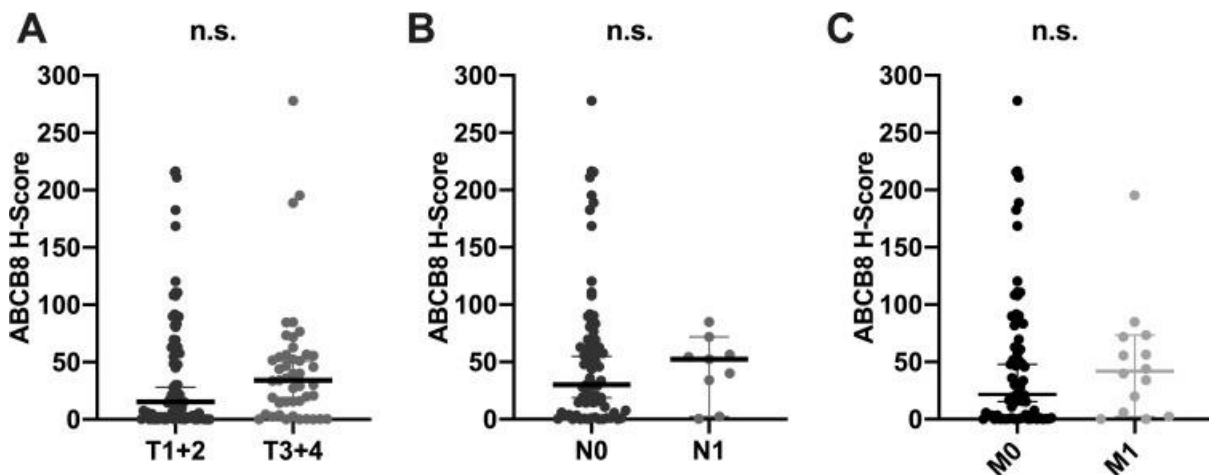
Suppl. Figure 2 The ABCB8 mRNA and protein expression is increased in normal adjacent tissue compared to ccRCC in the cDNA cohort (A), the ccRCC TCGA cohort (B), and in eight matched ccRCC vs. NAT samples, measured via Western Blotting (C). The scatter plots depict median expression with a 95% confidence interval.



3.4 Korrelation der ABCB8 Proteinexpression mit dem TNM-Status in der IHC Kohorte (Supplementary Figure 3)

Korrelation des ABCB8 H-Scores Proteinexpression mit dem T-Stadium (A), der lymphonodalen (B) und fernmetastatischen Ausbreitung (C) in der IHC Kohorte, ursprünglich als Supplementary figure 3 in der Originalpublikation Blajan et al., 2021, Formatierung angepasst, englische Sprache belassen.

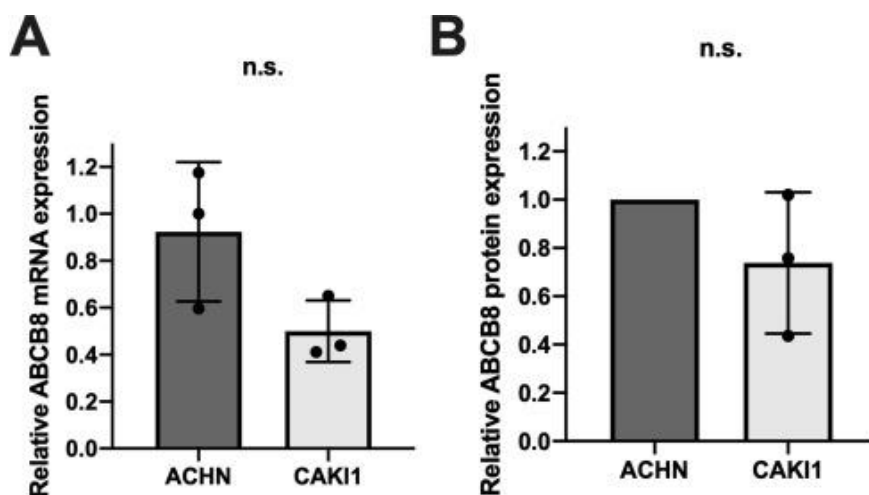
Suppl. Figure 3 Association of ABCB8 protein expression with: T-Staging (A), lymphonodal (B) and distant metastatic status (C) in the IHC cohort. The scatter plots depict median expression with a 95% confidence interval.



3.5 Relative ABCB8 mRNA- und Proteinexpression in den metastatischen Zelllinien ACHN und CAKI1 (Supplementary Figure 4)

Die ABCB8 mRNA- (A) und Proteinexpressionsprofile (B) in den verwendeten ccRCC Zelllinien ACHN und CAKI1 wurden mittels PCR und Western Blot gemessen. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte mithilfe densitometrischen Analysen durch Relativierung auf β -Actin. Die Messungen erfolgten in biologischen Triplikaten.

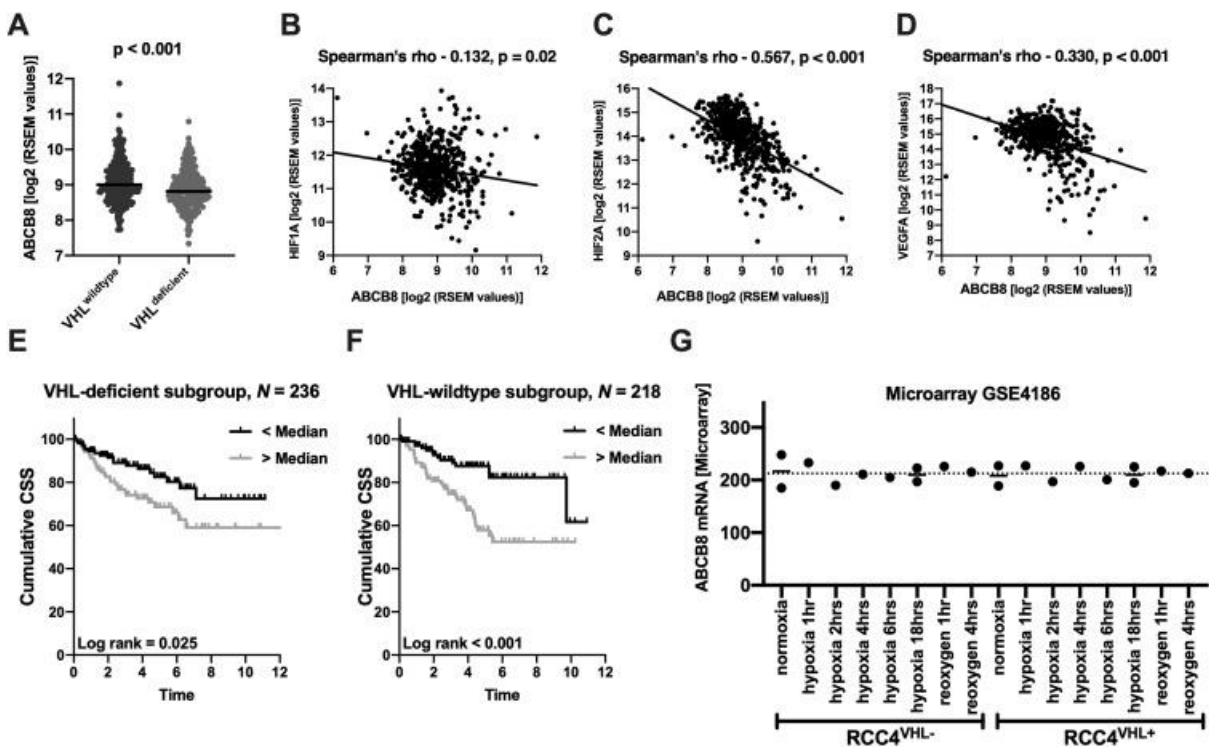
Suppl. Figure 4 A+B, Relative ABCB8 mRNA and protein expression of the metastatic ccRCC cell lines ACHN and CAKI1. The protein expression was quantified densitometrically. β -Actin was used for normalization. Each experiment was performed in biological triplicates.



3.6 Analyse der ABCB8 mRNA Expression in Korrelation mit dem VHL-Genmutationsstatus

Ursprünglich als Supplementary Figure 5 in der Originalpublikation Blajan et al., 2021, Formatierung angepasst, englische Sprache belassen.

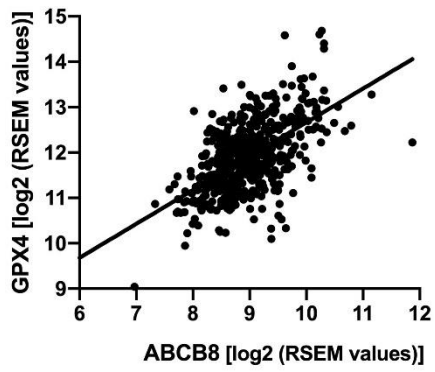
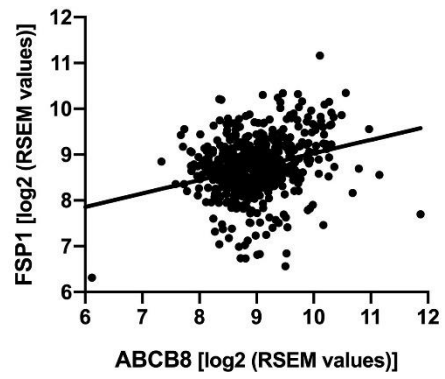
Suppl. Figure 5 A, The VHL-wildtype ccRCC subgroup expresses increased ABCB8 mRNA expression compared to VHL-deficient ccRCC (biallelic loss of VHL, mutation and/or deletion of VHL gene). The scatter plot depicts the median expression, with a 95% confidence interval. B-D, Scatter plot and Spearman correlation co-efficient of the ABCB8 mRNA expression with HIF1A (B), HIF2A (C) and VEGFA (D). E+F, In both, in the VHL-deficient and more pronounced in the VHL-wildtype ccRCC subgroup, the ABCB8 mRNA expression is associated with shortened cancer-specific survival. G, ABCB8 is not differentially expressed in the RCC4VHL- and RCCVHL+ cells under normoxia, after stepwise hypoxia (<0,01% oxygen) and reoxygenation (GEO microarray data GSE4186); hr(s) = hour(s); the dotted line corresponds to the median ABCB8 expression in this dataset.



3.7 Spearman's Korrelationsanalysen der ABCB8 mRNA-Expression mit der GPX4 und FSP1 mRNA-Expression in der ccRCC TCGA Kohorte (Supplementary Figure 6)

In der ccRCC TCGA-Kohorte ist die ABCB8 mRNA-Expression sowohl mit der mRNA-Expression von GPX4 als auch mit der mRNA-Expression von FSP1 positiv korreliert. Ursprünglich als Supplementary Figure 6 in der Originalpublikation Blajan et al., 2021, Formatierung angepasst, englische Sprache belassen.

Suppl. Figure 6 Scatter plot and Spearman correlation co-efficient of the ABCB8 mRNA expression with GPX4 A and FSP1 B in the TCGA ccRCC dataset.

ASpearman's rho = 0.536, $p < 0.001$ **B**Spearman's rho = 0.236, $p < 0.001$ 

4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen beteiligten Personen danken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. med. Niklas Klümper und Herrn Professor Dr. med. Jörg Ellinger für die Überlassung des interessanten Themas, für die exzellente Betreuung und enorme Unterstützung sowohl bei der Umsetzung der Arbeit als auch bei der Bewerbung für Stipendien und Teilnahmen an Kongressen. Ebenfalls besonders danken möchte ich Professor Dr. med. Manuel Ritter für seine Betreuung als Doktorvater und für die ebenfalls uneingeschränkte Unterstützung.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Frau Doris Schmidt für die ebenfalls hervorragende fachliche Betreuung im Labor, für die stets konstruktiven und kreativen Ideen und Lösungen, für ihre unendliche Geduld, sowie für die Wärme und Freude, die ich jeden Tag in Labor mit ihr erleben durfte.

Meinen Eltern danke ich für die unermüdliche Stärkung und Motivierung, sowie dafür, dass sie in jeglicher Hinsicht die Grundsteine meines Weges gelegt haben und mich immer unterstützen.