

Aus dem Institut für Neuropathologie
der medizinischen Fakultät der
Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Mawrin)

**Expression und klinische Bedeutung mTOR-assoziiierter Proteine in
Nierenzellkarzinom-Metastasen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(Doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

vorgelegt von: Aslan Germanishvili

aus: Georgien/Tbilissi

Magdeburg: 2020

- Für Tamar -

Zusammenfassung

Patienten mit einem metastatischen Nierenzellkarzinom haben eine schlechte Prognose und eine variable Ansprechrate auf verfügbare Therapien. Die Identifikation von Proteinen, die eine gezielte Prognose ermöglichen, ist daher Gegenstand intensiver Forschung. Der mTOR-Signalweg wurde mit der Ansprechrate und der Prognose von Nierenzellkarzinompatienten in Verbindung gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass mTOR-Komplexe und deren Effektorproteine sowohl in Primärtumoren als auch in Nierenzellkarzinometastasen exprimiert sind und die Metastasen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Gewebe und dem Primärtumor eine erhöhte Expression zeigen. Es ist bisher allerdings noch unklar, wie sich die Expression von mTOR-Komplexen und ihren Effektorproteinen in kranialen und spinalen Metastasen des Nierenzellkarzinoms darstellt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der mTOR-Expression und der Expression mTOR-assoziiierter Proteine in Nierenzellkarzinometastasen des zentralen Nervensystems von 28 Patienten.

Die Stärke der Expression des Gesamtproteins und des phosphorylierten, aktivierten Proteins von mTOR, p70S6K, 4E-BP1 und Akt wurde anhand des *immune reactive*-Scores bewertet. Die Gewebeproben wurden anhand der Variablen Geschlecht, Alter, Tumorlokalisierung, Nephrektomie und Proliferationsrate gruppiert und die IR-Scores der Gruppen miteinander verglichen.

Alle untersuchten Proteine zeigten eine vergleichbare Expression des Gesamtproteins und des phosphorylierten Proteins in den Gewebeproben. Insgesamt betrachtet hatte keine der untersuchten klinischen Variablen einen Einfluss auf die Expression der Proteine in den Metastasen des zentralen Nervensystems. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für 4E-BP1 (höhere Expression bei Männern, nach Nephrektomie, und niedrigem MIB-Proliferationsscore, $p < 0,05$) und mTOR (höhere Expression bei Männern, in kranialen Tumoren und ohne Nephrektomie) beobachtet.

Die mTOR-assoziierten Proteine waren weiterhin mittels Western blot in Gewebelysaten von Nierenzellkarzinom-Metastasen nachweisbar. Die *in vitro*-Behandlung der Nierenkarzinomzelllinien Caki-1 und Caki-2 mit dem mTOR-Inhibitor AZD8055 führte zu reduziertem Zellwachstum und verminderter Koloniebildung.

Die vorliegende Studie demonstriert, dass der mTOR-Signalweg in Nierenzellkarzinometastasen des ZNS aktiviert ist, dass jedoch die Expression von

mTOR und mTOR-assoziierten Proteinen insgesamt niedrig ist und nicht vom Alter oder dem Geschlecht des Patienten, der Lokalisation der Metastasen, der Proliferationsrate oder vorheriger Nephrektomie abhängig zu sein scheint.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Nierenzellkarzinom.....	1
1.1.1 Klassifikation und Pathogenese.....	2
1.1.2 Prävalenz.....	7
1.1.3 Ätiologie.....	7
1.1.4 Symptomatik.....	9
1.1.5 Therapie.....	10
1.2 Das <i>mammalian target of rapamycin</i> (mTOR).....	12
1.2.1 mTOR und assoziierte Signalwege.....	12
1.2.2 mTOR im Nierenzellkarzinom.....	15
1.3 Fragestellung.....	16
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Laborgeräte.....	18
2.2 Chemikalien.....	18
2.3 Puffer und Lösungen.....	18
2.4 Antikörper.....	18
2.5 Patientenkohorte und Studiendesign.....	19
2.6 Ethikvotum.....	20
2.7 Western Blotting.....	20
2.7.1 Material.....	20
2.7.2 Durchführung.....	21
2.7.3 Auswertung.....	21
2.8 Immunhistochemie.....	22

2.8.1	Material	22
2.8.2	Durchführung	22
2.8.3	Auswertung	22
2.9	Koloniebildungsassay und Proliferationsassay mit Caki-1- und Caki-2-Zellen unter mTORC1/2-Hemmung	23
3	Ergebnisse	26
3.1	Expression von mTOR und mTOR-assoziierten Proteinen in fixierten Gewebeproben von spinalen und kranialen Nierenzellkarzinommetastasen	26
3.2	Expression der mTOR-assoziierten Proteine in Gewebelysaten von Patienten mit kranialen Nierenzellkarzinommetastasen	40
3.3	Proliferation in spinalen und kranialen Nierenzellkarzinommetastasen	40
3.4	Wirkung von AZD8055 auf Nierenzellkarzinom-Linien	44
4	Diskussion	48
	Literaturverzeichnis.....	54
	Anhang	66

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	<i>eIF-4E binding protein 1</i>
AKT	Proteinkinase B
AMPK	Adenosinmonophosphat-Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
BAP1	Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase
BMI	<i>body mass index</i>
Deptor	<i>DEP domain TOR-binding protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eIF-4E	<i>elongation initiation factor 4E</i>
FH	Fumarathydratase
FKBP12	<i>FK506-binding protein 12</i>
FLCN	Follikulin
HGF	<i>hepatic growth factor</i>
HIF	<i>hypoxia inducible factors</i>
HRE	<i>hypoxia response element</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IRS	<i>immune reactive score</i>
KDM5C	Lysin K-spezifische Demethylase 5C
mLST8	<i>mammalian lethal with sec-13</i>
mSIN1	<i>mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
PBRM1	Polybromo-1
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDK1	Pyruvatdehydrogenase-Kinase-1
PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat

PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PRAS40	<i>proline-rich AKT substrate</i>
PRCC	<i>papillary renal cell carcinoma</i>
Protor-1/-2	<i>protein observed with rictor-1/2</i>
Raptor	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
RHEB	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
Rictor	<i>raptor-independent companion of mTOR</i>
RKI	Robert Koch-Institut
SET	<i>su(var)3-9, enhancer-of-zeste and trithorax</i>
SETD2	<i>SET domain containing 2</i>
SGK	Serumglukosekinase
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TSC-1/-2	<i>tuberous sclerosis complex-1/-2</i>
UICC	<i>Union International Contre Cancer</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL	Von-Hippel-Lindau-Gen
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Altersverteilung der Patienten mit einem Nierenzellkarzinom in Deutschland im Jahr 2014. (Quelle: übernommen aus (2))	1
Abbildung 2 Verteilung der Nierenzellkarzinomstadien in Deutschland in den Jahren 2012 bis 2014 entsprechend des UICC Krebsstadiums. (Quelle: übernommen von (2))	5
Abbildung 3 Aktivierung und Effektor-Signalwege der mTOR-Komplexe mTORC1 und mTORC2. mTORC1 und mTORC2 werden durch die Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und die daran anschließenden Signalkaskaden aktiviert. Über die Kinase Akt entsteht eine Verknüpfung der Signalwege beider Komplexe. (Quelle: nach Pachow et al., angelehnt an (109) und (95))	14
Abbildung 4 Beispielhafte Aufnahmen von Präparaten ohne Färbung, mit einer schwachen Färbung, einer moderaten Färbung oder einer starken Färbung.	23
Abbildung 5 Beispielhafte Färbungen der phosphorylierten Proteine AKT, p70S6K, 4E-BP1, mTOR und pHH3.....	26
Abbildung 6 IR-Scores für die Expression von mTOR und phosphoryliertem mTOR (p-mTOR) in Gewebeproben kranialer und spinaler Tumore des Nierenzellkarzinoms.	28
Abbildung 7 IR-Scores für die Expression von Akt Gesamtprotein und phosphoryliertem Akt (p-Akt1, p-Akt2) in Gewebeproben kranialer und spinaler Metastasen des Nierenzellkarzinoms.	28
Abbildung 8 IR-Scores für die Expression von 4E-BP1 Gesamtprotein und phosphoryliertem 4E-BP1 (p-4E-BP1) in Gewebeproben kranialer und spinaler Tumore des Nierenzellkarzinoms.	29
Abbildung 9 IR-Scores für die Expression von p70S6K Gesamtprotein und phosphoryliertem p70S6K (p-p70S6K) in Gewebeproben kranialer und spinaler Nierenzellkarzinom-Metastasen.	29
Abbildung 10 (A) IR-Scores für p70S6K und p-p70S6K abhängig vom Patientenalter. (B) IR-Scores für mTOR und p-mTOR abhängig vom Patientenalter.	30
Abbildung 11 (A) IR-Scores für 4E-BP1 und p-4E-BP1 abhängig vom Patientenalter. (B) IR-Scores für Akt, p-Akt1 und pAkt2 abhängig vom Patientenalter.....	31
Abbildung 12 (A) IR-Scores für p70S6K und p-p70S6K abhängig vom Geschlecht. (B) IR-Scores für mTOR und p-mTOR abhängig vom Geschlecht.	32

Abbildung 13 IR-Scores für p70S6K und p-p70S6K (A), mTOR und p-mTOR (B), 4E-BP1 und p-4E-BP1 (C) und Akt, p-Akt1 und p-Akt2 (D) abhängig von der Tumorlokalisation (kranial oder spinal).....	35
Abbildung 14 IR-Scores für p70S6K und p-p70S6K (A), mTOR und p-mTOR (B), 4E-BP1 und p-4E-BP1 (C) und Akt, p-Akt1 und p-Akt2 (D) in Geweben von Patienten mit und ohne Nephrektomie.	37
Abbildung 15 Immunhistochemische Färbung im paarweisen Vergleich von Primärtumor (1a, 2a, 3a) und ZNS-Metastase (1b, 2b, 3b).....	39
Abbildung 16 Expression von mTOR und mTOR-assoziierten Signalproteinen in Gewebelysaten kranialer Metastasen des Nierenzellkarzinoms.	40
Abbildung 17 IR-Scores für p70S6K und p-p70S6K (A), mTOR und p-mTOR (B), 4E-BP1 und p-4E-BP1 (C) und Akt, p-Akt1 und p-Akt2 (D) in Geweben von Patienten mit einer niedrigen oder hohen Proliferationsrate (MIB und pHH3-Scores).....	44
Abbildung 18 Koloniebildung von Caki-1-Zellen nach Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor AZD8055 – Beispielhafte Aufnahmen der Zellen am Ende der Behandlung	45
Abbildung 19 Koloniegröße von Caki-1-Zellen nach Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor AZD8055 – Statistische Auswertung der Koloniegröße von 30 Kolonien pro Bedingung nach der Behandlung	46
Abbildung 20 BrdU-Assay von Caki-1-Zellen nach Behandlung der Zellen mit dem mTOR-Inhibitor AZD8055 für 24 Stunden (links) und 48 Stunden (rechts). Zehn Messwerte pro Bedingung ± SEM	46
Abbildung 21 BrdU-Assay von Caki-2-Zellen nach Behandlung der Zellen mit dem mTOR-Inhibitor AZD8055 für 24 Stunden (links) und 48 Stunden (rechts). Zehn Messwerte pro Bedingung ± SEM	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 TNM-Klassifikation und UICC-Stadien der Nierenzellkarzinome. (Quelle: (9))	4
Tabelle 2 Verwendete Antikörper	19
Tabelle 3 Patientencharakteristika der Studienkohorte (n = 28).....	20
Tabelle 4 IR-Scores (Minimum, Maximum, Mittelwert) von mTOR und mTOR- assoziierten Proteinen in Metastasen des Nierenzellkarzinoms	27
Tabelle 5 Indices der Proliferationsmarker MIB-1 und pHH3 in spinalen und kranialen Metastasen des Nierenzellkarzinoms	41

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom, auch als Adenokarzinom der Niere oder Hypernephrom bezeichnet, macht etwa 3 % aller Krebserkrankungen in Deutschland aus (1). Es handelt sich hierbei um eine multifaktorielle Krebserkrankung, die bei Erwachsenen 99 % aller Nierenkarzinome ausmacht (2). Diese Entität stellt die dritthäufigste maligne Erkrankung des Urogenitaltraktes dar. Aufgrund eines mittleren Erkrankungsalters von 68 Jahren (Männer) bzw. 71 Jahren (Frauen) wird das Nierenzellkarzinom als eine Alterskrankheit betrachtet (1). Die Erkrankung tritt bei Männern (3,5 % aller Krebsneuerkrankungen) häufiger auf als bei Frauen (2,5 % aller Krebsneuerkrankungen) (1). **Abbildung 1** zeigt die Altersverteilung für beide Geschlechter.



Abbildung 1 Altersverteilung der Patienten mit einem Nierenzellkarzinom in Deutschland im Jahr 2014. (Quelle: übernommen aus (2))

1.1.1 Klassifikation und Pathogenese

Die Einteilung der Nierenzellkarzinome wird anhand der Klassifikation der World Health Organization (WHO) vorgenommen, bei der morphologische, molekulare und genetische Faktoren berücksichtigt werden (3, 4). Die Einteilung der Nierenzellkarzinome basierend auf der pathologischen Charakterisierung ist von großer Relevanz für die Wahl der Therapie und die Prognose, die sich zwischen den Tumorarten erheblich unterscheiden können (5). Die Mehrheit der Nierenzellkarzinome machen mit 70–80 % die klarzelligen Karzinome aus (6). Diese Tumorart wurde nach dem mikroskopisch auffälligen, klaren Zytoplasma der Tumorzellen dieses Typs benannt. Sie ist in den meisten Fällen durch den Verlust, die Mutation, die Hypermethylierung, oder eine biallelische Inaktivierung des Von-Hippel-Lindau-Gens charakterisiert (VHL), was zu einer Hochregulierung der *hypoxia inducible factors* (HIF) führen kann. Diese ist mit einer vermehrten Zellproliferation und Angiogenese vergesellschaftet.

Etwa 15 % aller Nierenzellkarzinome sind papilläre Karzinome, die ihren Namen aufgrund der papillären Anordnung der Tumorzellen erhielten (7). Basierend auf morphologischen Kriterien der Tumorzellen werden die papillären Nierenzellkarzinome weiter in die Typen 1 und 2 unterteilt. Sowohl das hereditäre papilläre Syndrom als auch die hereditäre Leiomyomatose können dem papillären Nierenzellkarzinom zugrunde liegen. Ersteres wird durch eine autosomal-dominante Keimbahnmutation des *MET*-Gens hervorgerufen, während letzteres durch eine Mutation der Fumarathydratase ausgelöst wird, einem wichtigen Enzym im Krebszyklus und dem Energiestoffwechsel. Das im papillären Nierenzellkarzinom mutierte *MET*-Gen codiert für c-Met, einen Tyrosinkinaserzeptor dessen Ligand der *hepatocyte growth factor* (HGF) ist. c-MET reguliert die Zellproliferation, das Zellwachstum und die Zellinvasion, sodass die Dysregulation des *MET*-Gens das Tumorwachstum, die Angiogenese und die Metastasierung fördern kann (8). Jeweils 1 % aller Nierenzellkarzinome oder weniger entfallen auf das klarzellig-papilläre Nierenzellkarzinom, das histologisch Eigenschaften beider beschriebenen Karzinome aufweist, sowie auf das multilokulär zystische Nierenzellkarzinom, das chromophobe Nierenzellkarzinom, das Ductus Bellini-Karzinom, das medulläre Nierenzellkarzinom, das mit der hereditären Leiomyomatosis assoziierte Nierenzellkarzinom, das Succinatdehydrogenase-defiziente Nierenzellkarzinom, das tubulozystische Nierenzellkarzinom, das

erworbene zystische Nierenzellkarzinom, das papilläre Adenom, das familiäre Translokationskarzinom der Niere sowie auf unklassifizierbare Nierenzellkarzinome (6).

Die Einteilung der Nierenzellkarzinome in Tumorstadien erfolgt basierend auf ihrer Lokalisation und Histologie anhand der TNM (Tumor, Nodus, Metastasen)-Klassifikation der Union International Contre Cancer (UICC, **Tabelle 1**) (9). **Abbildung 2** zeigt den prozentualen Anteil jedes UICC-Stadiums an allen Nierenzellkarzinompatienten in den Jahren 2012 bis 2014 in Deutschland, aufgeteilt nach Geschlecht (2).

Tabelle 1 TNM-Klassifikation und UICC-Stadien der Nierenzellkarzinome. (Quelle: (9))

T – Primärtumor			
TX	Primärtumor kann nicht bewertet werden		
T0	Kein Primärtumor nachweisbar		
T1	Tumor ≤ 7 cm in der größten Dimension, begrenzt auf die Niere		
T1a	Tumor ≤ 4 cm		
T1b	Tumor > 4 cm, aber ≤ 7 cm		
T2	Tumor > 7 cm in der größten Dimension, begrenzt auf die Niere		
T2a	Tumor > 7 cm, aber ≤ 10 cm		
T2b	Tumor > 10 cm		
T3	Tumor infiltriert größere Venen oder perirenale Gewebe, erreicht aber nicht die ipsilaterale Nebenniere und breitet sich nicht weiter aus als die Gerota-Faszie		
T3a	Tumor dehnt sich in die Nierenvene oder deren segmentale Äste aus oder infiltriert das perirenale Fettgewebe oder das Nierenbeckenkelchsystem		
T3b	Tumor dehnt sich in die <i>Vena cava</i> unterhalb des Zwerchfells aus		
T3c	Tumor dehnt sich in die <i>Vena cava</i> oberhalb des Zwerchfells aus oder infiltriert die Wand der <i>Vena cava</i>		
T4	Tumor breitet sich über die Gerota-Faszie hinaus bis in die ipsilaterale Nebenniere aus		
N – Regionäre Lymphknotenmetastasen			
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen		
N1	1 oder mehrere regionäre Lymphknotenmetastasen		
M – Fernmetastasen			
M0	Keine Fernmetastasen		
M1	Metastasen		
Stadieneinteilung			
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2, T3	N1	M0
	T3	N0	M0
IV	T4 oder N2 oder M1	Jedes N	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

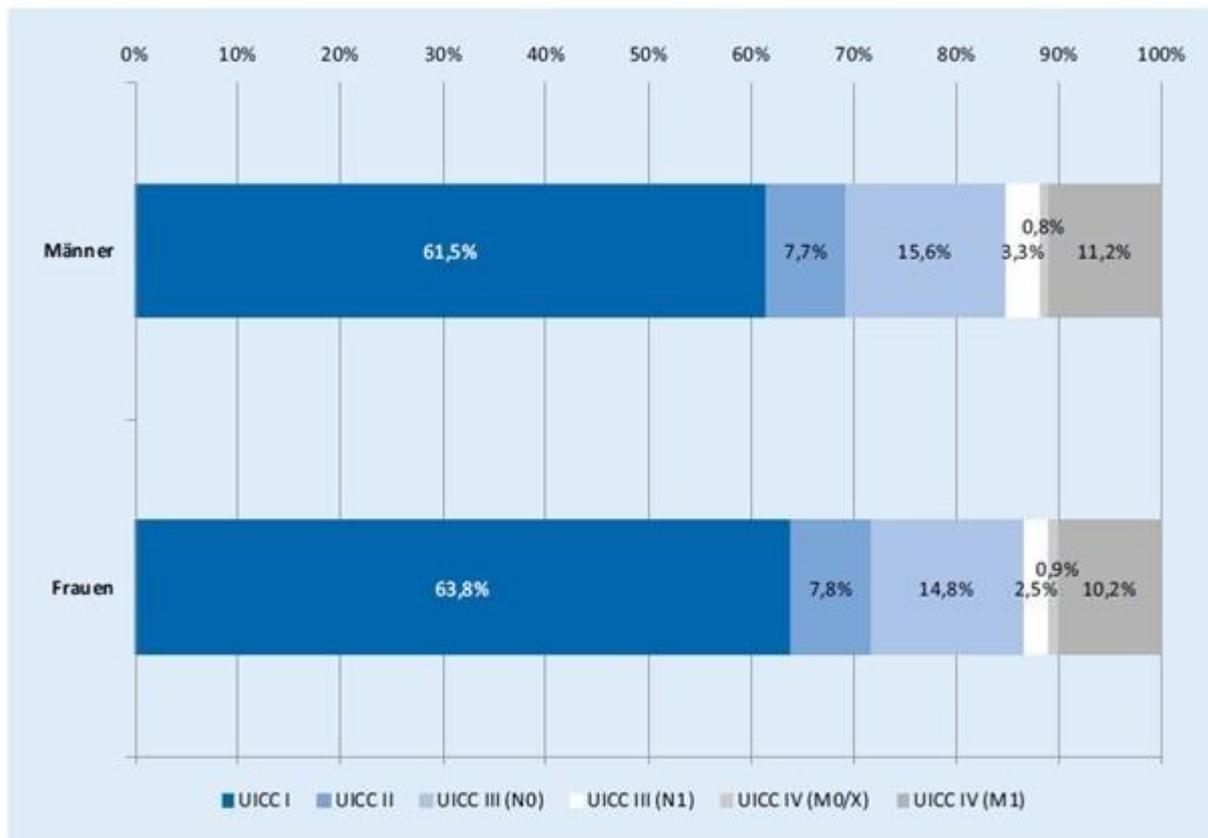


Abbildung 2 Verteilung der Nierenzellkarzinomstadien in Deutschland in den Jahren 2012 bis 2014 entsprechend des UICC Krebsstadiums. (Quelle: übernommen von (2))

Es konnten mehrere Gene und assoziierte Signalwege identifiziert werden, die im Nierenzellkarzinom verändert sind und zu einer vermehrten Zellproliferation, -migration und -invasion sowie einer erhöhten Angiogenese beitragen. VHL ist ein Bestandteil der E3-Ubiquitin-Ligase, welche an der Ubiquitinierung und anschließenden Degradation von Proteinen beteiligt ist. Das Protein besteht aus zwei Domänen mit unterschiedlichen Funktionen: Die α -Domäne von VHL bindet an die Elongine B und C des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, während die β -Domäne an der Substratbindung beteiligt ist (10, 11). Die Inaktivierung des *VHL*-Gens ist auf Missense-Mutationen in beiden Domänen zurückzuführen. Für die α -Domäne wurden insgesamt 279 Mutationen berichtet, welche die Interaktion zwischen beiden Domänen des Proteins (z. B. im Arginin 167) (12) oder zwischen der α -Domäne und Elongin C (z. B. im Leucin 178) (13) beeinträchtigen. Mutationen in der β -Domäne betreffen überwiegend die Bindestelle für die HIF-Proteine (13).

HIF ist ein dimerischer Transkriptionsfaktor bestehend aus α - (HIF-1 α , HIF-2 α oder HIF-3 α) und β -Einheiten (HIF- β). Die Hydroxylierung der α -Einheit im Zytoplasma führt zur Erkennung durch VHL unter normoxischen zellulären Bedingungen und anschließender Degradierung des Proteins (14). Unter hypoxischen Bedingungen oder bei einer Inaktivierung von VHL erfolgt die Translokation der α -Einheit in den Zellkern, wo sie mit der β -Einheit einen Komplex bildet und dieser an *hypoxia response elements* (HREs) in Zielgenen binden kann (15). Diese umfassen Gene, die für Proteine mit verschiedensten Funktionen kodieren und u. a. den Stoffwechsel (Glykolyse, Lactatstoffwechsel, Glukose-Transport), die pH-Regulierung (Carboanhydrase), die Angiogenese (Wachstumsfaktoren), den Zellzyklus (Cyclin D1), die Blutbildung (Erythropoietin) und die Apoptose (Bclx-1) betreffen (16). Von besonderer Bedeutung in der Nierentumorbiologie ist das HIF-Zielgen *vascular endothelial growth factor* (VEGF), welches hochreguliert ist und die Angiogenese, das Tumorstadium und die Metastasierung vorantreibt. Die beim klarzelligen Nierenzellkarzinom meistens beobachtete Inaktivierung des *VHL*-Gens kann also letztendlich zum Überleben einer Tumorzelle beitragen, indem diese auf die aerobe Glykolyse umstellt, ihre Apoptose inhibiert wird und der pH-Wert des extrazellulären Milieus sinkt, sodass optimale Bedingungen für die Zellinvasion geschaffen werden. Im Nierenzellkarzinom ist HIF demzufolge ein Tumorpromoter, während VHL als Tumorsuppressor fungiert.

Allerdings ist VHL mit großer Wahrscheinlichkeit nicht das einzige Gen, das für die Entstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms verantwortlich ist; andere möglicherweise involvierte Gene beinhalten *PBRM1* (Polybromo-1, 29–41 % der Tumore), *SETD2* (*SET domain containing 2*, 8–12 % der Tumore), *BAP1* (Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase, 6–10 % der Tumore), *KDM5C* (Lysin-spezifische Demethylase 5C, 4–7 % der Tumore) und *MTOR* (mTOR, 6 % der Tumore) (17). Drei dieser Gene (*PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*) sind Tumorsuppressoren und sind ebenso wie VHL auf dem Chromosom 3 lokalisiert, d. h., der Verlust dieses Chromosoms, welcher zu einem frühen Zeitpunkt in nahezu allen klarzelligen Nierenzellkarzinomen stattfindet, schaltet gleichzeitig vier Proteine aus, die das Tumorstadium unterdrücken könnten (18). mTOR und die durch dieses Protein vermittelten Signalwege sind der Fokus dieser Arbeit; daher wird seine Funktion und Bedeutung in der Tumorbiologie im Abschnitt 1.2 im Detail beschrieben.

1.1.2 Prävalenz

Entsprechend der Daten des Robert-Koch-Instituts erkrankten im Jahr 2014 9.480 Männer und 5.480 Frauen an Nierenkarzinomen, woraus sich eine standardisierte Erkrankungsrate von 16,5 Männern und 7,8 Frauen pro 100.000 Personen ergibt (19). Bei Männern gab es im selben Jahr 3.243 Nierenkarzinom-assoziierte Sterbefälle, bei Frauen waren es 2.035, mit einer standardisierten Sterberate von 5,1 bei Männern und 2,2 bei Frauen pro 100.000 Personen. Die 5-Jahresprävalenz lag für Männer bei 36.200 Fällen, für Frauen bei 21.900 Fällen. Für die 10-Jahresprävalenz wurden 61.600 Fälle für Männer und 38.000 Fälle für Frauen registriert. Für beide Geschlechter lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei 77 %, die 10-Jahres-Überlebensrate bei 70 % für Männer und 71 % für Frauen.

1.1.3 Ätiologie

Als gesicherte Risikofaktoren für das Nierenzellkarzinom gelten Lebensstilfaktoren wie das Rauchen und ein hoher Body Mass Index (BMI), Bluthochdruck, Umweltfaktoren mit nierenschädigendem Einfluss sowie in wenigen Fällen auch genetische Faktoren (19-22). Die Empfehlungen zur Prävention orientieren sich an diesen Risikofaktoren und beinhalten daher die Einstellung des Zigarettenkonsums und eine Gewichtsreduktion bei vorliegendem Übergewicht (6). Die Korrelation zwischen dem Nierenzellkarzinom und dem Raucherstatus beruht auf der Vermutung, dass das im Zigarettenrauch enthaltene Kohlenmonoxid für eine chronische Hypoxie des Nierengewebes verantwortlich ist und die Niere außerdem sekundär durch mit dem Rauchen verbundene Erkrankungen wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung geschädigt wird (23). Zigarettenrauch konnte zudem als Ursache für eine Schädigung der DNA in Lymphozyten und die im Nierenzellkarzinom häufig beobachteten Deletionen auf dem Chromosom 3p identifiziert werden (24, 25). Das Risiko, als Raucher am Nierenzellkarzinom zu erkranken, steigt mit einer zunehmenden Zigarettenanzahl pro Tag, während es mit Beendigung des Rauchens für mehrere Jahre wieder abnimmt (26).

Ein hoher BMI, der das Körpergewicht im Verhältnis zur Körpergröße reflektiert, ist insbesondere in westlichen Ländern ein gesicherter Risikofaktor für das Nierenzellkarzinom sowohl für Männer als auch für Frauen, wobei das Risiko mit jedem kg/m^2 um 4 % zunimmt (27, 28). Zusätzlich ist ein hoher BMI mit einer verringerten

Überlebensrate von Patienten mit lokal begrenztem und metastasierendem Nierenzellkarzinom assoziiert (29, 30). Im Gegensatz dazu haben Studien gezeigt, dass ein hoher BMI auch positiv mit einem krankheitsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben assoziiert sein kann (30, 31). Außerdem scheint der Einfluss des BMI von der Ethnizität des Patienten abhängig zu sein (32, 33). Der genaue Mechanismus für die Rolle des BMI in Bezug auf das Nierenkrebsrisiko ist noch nicht klar, aber es werden solche Faktoren als ursächlich vermutet, die mit einem hohen BMI einhergehen. Hierzu zählen eine Insulinresistenz der Gewebe und die hiermit verbundene Hyperinsulinämie, endokrine Veränderungen durch die Produktion von Adipokinen, Peroxidation von Lipiden, Hypoxie und ein veränderter Immunstatus (34, 35).

Ein weiterer im Zusammenhang mit Krebserkrankungen häufig diskutierter Risikofaktor ist der Alkoholkonsum. Eine Analyse von 12 prospektiven Studien konnte eine inverse Korrelation zwischen dem Konsum von 15 oder mehr Gramm Alkohol pro Tag und dem Risiko, an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken, feststellen, unabhängig von der Art des alkoholischen Getränks (36). Diese Beobachtung wird von den Ergebnissen neuerer prospektiver Studien unterstützt, wobei keine zusätzliche Gefährdung beim Konsum von mehr als zwei alkoholischen Getränken pro Tag demonstriert werden konnte (37-39).

Ein chronisch erhöhter Blutdruck gilt ebenfalls als ein gesicherter Risikofaktor für die Erkrankung an einem Nierenzellkarzinom, wobei das Risiko mit ansteigender absoluter Höhe des Blutdrucks zunimmt (21, 32, 40, 41). Auch für diesen Zusammenhang sind die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen nicht genau bekannt, aber ein anhaltender Bluthochdruck könnte zu einer Hypoxie des Nierengewebes und der Peroxidation von Lipiden, die mit der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies verbunden ist, führen (23, 42, 43).

Eine Rolle von Vitamin D und dem Vitamin-D-bindenden Protein in der Verminderung des Nierenzellkarzinomrisikos wird ebenfalls vermutet. Es konnte in einer Kohorte von männlichen Studienteilnehmern in Finnland gezeigt werden, dass Männer mit einer hohen Blutserumkonzentration von Vitamin-D-bindendem Protein ein signifikant reduziertes Risiko hatten, an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken (44). Dieselben Autoren konnten in einer aktuellen Studie diese Ergebnisse in einer Kohorte mit weiblichen und männlichen Studienteilnehmern replizieren (45). Die Gründe für diesen

Zusammenhang zwischen dem Vitamin-D-bindenden Protein und dem Nierenzellkarzinomrisiko sind noch nicht klar. Es wird aber vermutet, dass dieser nicht allein auf die Rolle dieses Proteins bei der Bindung und dem Transport von zirkulierendem Vitamin D zurückzuführen ist, sondern auch auf seine zusätzlichen Rollen, welche die Bindung freier Sauerstoffradikale, die Aktivierung von Makrophagen sowie Aufgaben in der Apoptose und Angiogenese beinhalten (46, 47).

Einige Berufsgruppen haben aufgrund ihrer Exposition von bestimmten Chemikalien ein erhöhtes Risiko, an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken. Zu diesen Chemikalien zählt Trichlorethylen, ein organisches Lösungsmittel, das als Detergens beispielsweise in der Automobilindustrie eingesetzt wird (48, 49). Bei Personen, die mit hohen Konzentrationen dieser Chemikalie in Kontakt kommen, wird eine Anhäufung von Mutationen im *VHL*-Gen gefunden (50, 51). Bezüglich des Nierenzellkarzinom-Risikos durch den Kontakt mit anderen industriell verwendeten Substanzen liegen nur wenige Studien vor. Ein Zusammenhang zwischen dem Risiko und Asbest, Arsen, Benzen, Herbiziden, Pestiziden, Phosphorsäure, Mineralöl, Vinylchlorid, Senfgas, Hydrogensulfid, chromhaltigen Materialien, und Benzidin konnte in Fallstudien gezeigt werden (52-55), jedoch mangelt es an größeren epidemiologischen Studien, um diese Korrelationen zu bestätigen.

Das Von-Hippel-Lindau-Syndrom (*VHL*-Gen), das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom (*FLCN*-Gen), das hereditäre papilläre Nierenzellkarzinom (*MET*-Gen) sowie die hereditäre Leiomyomatose (*FH*-Gen) sind erbliche Tumorsyndrome, welche die Wahrscheinlichkeit eines Nierenzellkarzinoms erhöhen.

1.1.4 Symptomatik

Es gibt keine für das Nierenzellkarzinom typischen Frühsymptome, sodass etwa zwei Drittel der Patienten bei der Diagnosestellung asymptomatisch sind (22, 56). Bei etwa 85 % der Patienten wird die Tumorerkrankung zufällig diagnostiziert (57). Für die fortgeschrittene Krankheit wurde eine Symptomtriade bestehend aus Flankenschmerzen, Hämaturie und einer tastbaren Tumormasse beschrieben, jedoch treten alle drei Symptome gemeinsam nur in etwa 6 bis 10 % der Patienten auf, bei denen sie mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet sind (58, 59).

Auch paraneoplastische Syndrome wurden für das Nierenzellkarzinom beschrieben, also durch den Tumor hervorgerufene sekundäre, systemische Symptome, die aufgrund von Veränderungen des Immunsystems oder des Hormonhaushalts durch die Neoplasie entstehen können (57). Hierzu zählen ein arterieller Bluthochdruck bei etwa 20 % der Nierenzellkarzinompatienten (60), hämatologische Symptome wie eine Erythrozytose und eine Polyzytämie (61, 62), erhöhte Blutwerte für die Hormone Insulin (63), Gonadotropin (64), Prolaktin (65), Enteroglykagon (66) und Prostaglandin E2 (67) sowie Neuropathien wie eine Polyneuropathie, Myopathie und Polymyositis (68). Das gleichzeitige Auftreten von Fieber, Gewichtsverlust, erhöhten Leberenzymwerten und einer Hepatosplenomegalie deuten auf das Stauffer-Syndrom hin, eine entzündliche, degenerative Veränderung des Lebergewebes, das vermutlich durch die Sekretion von Hepatotoxinen durch den Tumor hervorgerufen wird (69, 70).

Aufgrund mangelnder spezifischer Symptome liegt bei etwa einem Drittel aller Nierenzellkarzinompatienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit Metastasierung vor. Die Lokalisation dieser Metastasen findet sich mit absteigender Häufigkeit in der Lunge, den Lymphknoten, den Muskeln, den Knochen, der Leber und dem zentralen Nervensystem (6, 56, 71).

1.1.5 Therapie

Der Therapieplan für Patienten mit einem Nierenzellkarzinom orientiert sich am Tumorgrad und unterscheidet sich für Patienten mit lokal begrenztem Nierenkarzinom von solchen mit einem metastasierten Karzinom. Für lokal begrenzte Tumoren stellt eine Resektion in Form einer partiellen oder vollständigen Nephrektomie die einzige Option für eine komplette Heilung dar (56). Die krankheitsspezifischen 5-Jahres-Überlebensraten sind für beide Resektionsarten vergleichbar (72). Ob eine radikale Resektion vermieden werden kann, hängt von verschiedenen Faktoren ab, unter anderem dem Tumorgrad, der genauen Lokalisierung des Tumorgewebes sowie anderen nierenrelevanten Komorbiditäten wie einer chronischen Niereninsuffizienz (73). Die Richtlinien der European Association of Urology beinhalten eine Empfehlung für eine partielle Resektion niedriggradiger Tumoren, wann immer diese technisch möglich ist (56). Gegenüber der radikalen Nephrektomie führt eine partielle Resektion zu einer besseren Erhaltung des Nierengewebes und zu weniger postoperativen

Komplikationen, die in Form von Stoffwechselstörungen oder kardiovaskulären Erkrankungen nach radikaler Resektion auftreten können (74, 75).

Für die radikale Resektion erscheinen laparoskopische und offene chirurgische Techniken vergleichbar bezüglich des onkologischen Outcomes, der Gesamtüberlebensrate, der krankheitsspezifischen Überlebensrate und der progressionsfreien Überlebensrate (75, 76), aber die partielle Resektion könnte mit einer geringeren Morbidität der Patienten assoziiert sein (72, 77). Auch bei der partiellen Nephrektomie erzielt die laparoskopische Resektion ähnliche Gesamtüberlebensraten, progressionsfreie Überlebensraten und ein vergleichbares onkologisches Outcome wie die offene Resektion (78, 79). Insbesondere für ältere Patienten und solche mit bestehenden Komorbiditäten ist eine Nephrektomie nicht zwangsläufig indiziert, da bei diesen Patientengruppen die Wahrscheinlichkeit, an anderen Ursachen zu sterben, die Wahrscheinlichkeit, dass das Nierenkarzinom ursächlich ist, übersteigt (80-82).

Insbesondere für Patienten, die eine Operation ablehnen oder für die eine Operation aufgrund der Anästhesie oder bestehender Komorbiditäten nicht in Frage kommt, könnte die Ablationstherapie in Form einer Cryo-Ablation oder einer Radiowellen-Ablation als Alternative zur Resektion Anwendung finden (83). Diese zeigen im Vergleich zur Nephrektomie leicht schlechtere onkologische Outcomes, aber eine bessere Erhaltung der Nierenfunktion (84, 85). Beide Ablationsarten sind bezüglich der krankheitsspezifischen Überlebensraten vergleichbar (86). Dennoch stehen derzeit keine großen klinischen Studien zur Verfügung, um die Ablationstherapie als Alternative zur Resektion für lokal begrenzte Nierenzellkarzinome zu empfehlen (56).

Metastasierende Nierenzellkarzinome wurden lange Zeit ausschließlich mit einer systemischen Immuntherapie mit Zytokinen wie Interferon α und Interleukin 2 behandelt (87). Die Therapie mit Interleukin 2 ist allerdings mit einer hohen Toxizität, die sich als Übelkeit, Fieber, Durchfall, Hautreaktionen, Verwirrungszustände, Kurzatmigkeit, Lungenödeme, Leberfunktionsstörungen und Nierenversagen äußern kann, verbunden (88). Interferon α wurde mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von lebensbedrohlichen Nebenwirkungen des Grades 3 oder höher in Verbindung gebracht (89). Dauerhafte und umfassende Erfolge einer solchen klassischen Immunmonotherapie sind dosisabhängig und die Ansprechrate ist relativ gering, sodass nach alternativen Therapien für das metastasierende Nierenzellkarzinom

gesucht wurde (90, 91). Nichtsdestotrotz zeigen neuere Untersuchungen, dass insbesondere Interleukin-2 nicht zwangsläufig mit einer hohen Toxizität vergesellschaftet ist und modernere Interleukin-2-Medikamente, die sich direkt gegen Interleukin-2 oder die Signalwege des Interleukin-2-Rezeptors richten, durchaus zu einer erfolgreichen Behandlung bestimmter Patientengruppen beitragen könnte (92-94). Im Jahr 2006 wurden die ersten zielgerichteten Therapien („targeted therapies“) entwickelt, die an tumorspezifischen Molekülen und Signalwegen ansetzen, um die Proliferation, Migration und Invasion der Tumorzellen zu verhindern. Für die Behandlung eines fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms sind mittlerweile mehrere solcher Medikamente zugelassen. Hierzu gehören Kinase-Inhibitoren wie Axitinib, Cabozantinib, Lenvatinib, Pazopanib, Sorafenib und Tivozanib, Angiogenese-Inhibitoren wie Bevacizumab in Kombination mit IFN α , und mTOR-Inhibitoren. Letztere werden in Abschnitt 1.2.2 näher beschrieben.

1.2 Das *mammalian target of rapamycin* (mTOR)

1.2.1 mTOR und assoziierte Signalwege

mTOR gehört zur Familie der Phosphatidylinositol-Proteinkinase-verwandten Kinasen und weist eine Serin/Threonin-Kinasedomäne auf. Das humane mTOR-Protein formt zwei unterschiedliche Komplexe, mTORC1 und mTORC2, mit anderen Proteinen (95). Zu dem mTORC1-Komplex gehören neben mTOR die Proteine Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*), welches an der Bildung und Stabilisierung des Komplexes beteiligt ist, PRAS40 (*proline-rich AKT substrate*) und Deptor (*DEP domain TOR-binding protein*), welche beide die Aktivität des Komplexes regulieren, und mLST8 (*mammalian lethal with sec-13 protein 8*), welches dem Komplex als Scaffolder Stabilität verleiht (96-99). Der mTORC1-Komplex liegt immer als Dimer vor. Deptor und mLST8 sind auch Bestandteile des mTORC2-Komplexes, außerdem die Proteine Rictor (*raptor-independent companion of mTOR*), welches zur Bildung, Stabilität, Substratauswahl und der intrazellulären Lokalisation des Komplexes beiträgt (100), Protor-1 oder -2 (*protein observed with rictor-1/2*), welches für die Aktivierung bestimmter Downstream-Kinasen notwendig ist (101), und mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*), welches den Komplex bis zu einem entsprechenden Aktivierungssignal inhibiert (102). Aufgrund dieser unterschiedlichen

Komponenten lokalisieren beide Komplexe in verschiedenen intrazellulären Organellen. Der mTORC1-Komplex ist mit endosomalen und lysosomalen Membranen assoziiert, während der mTORC2 an der Plasmamembran, den Mitochondrien und in ribosomalen Membranen lokalisiert ist (103, 104).

Die Signalwege, die an der Aktivierung der mTOR-Komplexe beteiligt sind, sowie solche, die mTORC-vermittelt sind, sind in **Abbildung 3** dargestellt. Beide mTOR-Komplexe werden durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren in der Plasmamembran aktiviert, jedoch unterscheiden sich sowohl die aktivierten Signalkaskaden als auch die Substrate und Effektorproteine der mTORC-Komplexe. mTORC1 wird zusätzlich durch Nährstoffe aktiviert und bindet das mTOR-namensgebende Rapamycin, mTORC2 hingegen nicht. Die Aktivität von mTORC1 wird durch die Proteine TSC-1 und TSC-2 (*tuberous sclerosis complex-1/-2*) kontrolliert. Werden diese Proteine durch Wachstumsfaktoren inhibiert, kommt es zur Aktivierung der GTPase RHEB, die wiederum mTORC1 aktiviert (96). PRAS40 kann die Aktivierung von mTORC1 durch die Bindung an den Komplex verhindern (105).

Akt, eine zentrale Kinase in der Regulierung des Zellstoffwechsels, der Zellmotilität, dem Zellüberleben und dem Zellzyklus, kann in die Inhibition von mTORC1 eingreifen, indem sie durch Phosphorylierung die PRAS40-Bindung an mTORC1 und TRC-2 blockiert und somit RHEB aktiviert (105-107). Akt wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert, indem diese an ihren Rezeptor binden, wodurch Phosphatidylinositol-3-kinase zu dem Rezeptor rekrutiert wird und die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat (PIP₂) in der Plasmamembran zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat (PIP₃) vermittelt. PIP₃ kann mTORC2 direkt zur Plasmamembran rekrutieren und aktivieren, während die PIP₃-vermittelte Aktivierung von mTORC1 indirekt durch die koordinierte Phosphorylierung von Akt durch mTORC2 und PDK1 (Pyruvatdehydrogenase-Kinase-1) aktiviert wird (102, 108). Die Inaktivierung des mTORC1-Komplexes erfolgt als Antwort auf einen niedrigen Energiestatus der Zelle, welcher sich in einem niedrigen intrazellulären Level von ATP, Glukose und Aminosäuren wie Glutamin, Arginin und Leucin äußert.

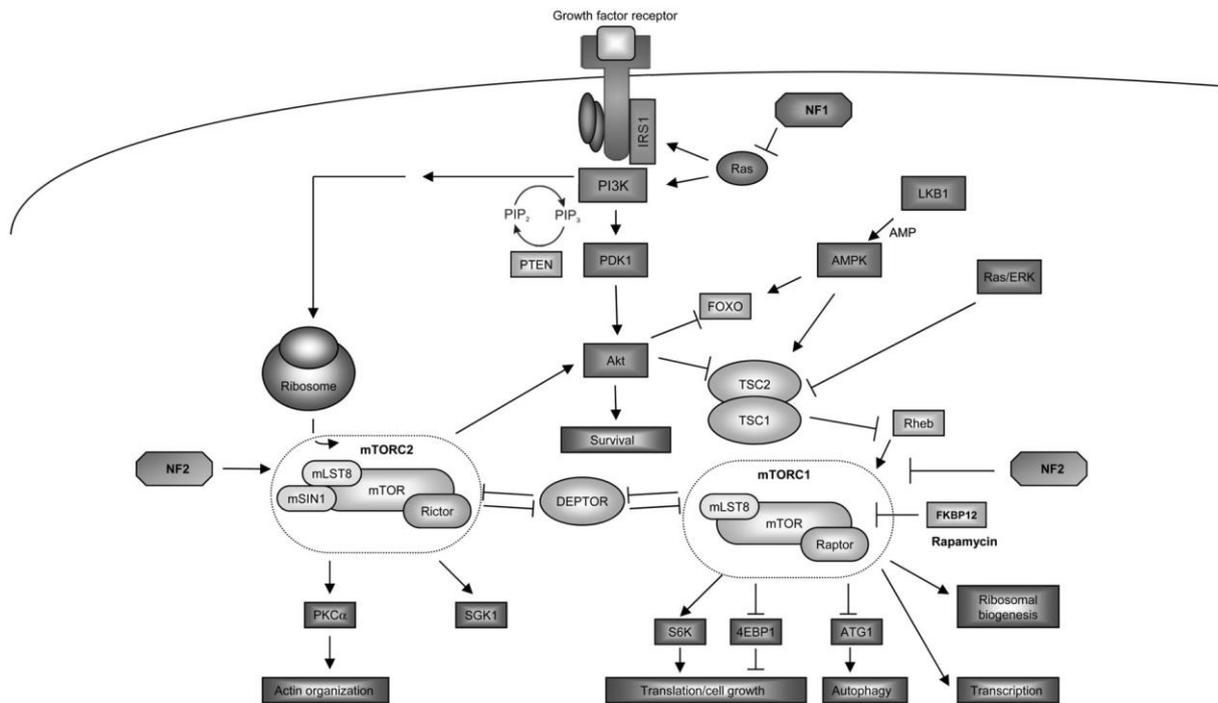


Abbildung 3 Aktivierung und Effektor-Signalwege der mTOR-Komplexe mTORC1 und mTORC2. mTORC1 und mTORC2 werden durch die Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und die daran anschließenden Signalkaskaden aktiviert. Über die Kinase Akt entsteht eine Verknüpfung der Signalwege beider Komplexe. (Quelle: nach Pachow et al., angelehnt an (109) und (95))

Bei einem niedrigen intrazellulären ATP-Level wird die Adenosinmonophosphat-Kinase (AMPK) aktiviert, welche wiederum TSC-2 phosphoryliert und hierdurch zur Bildung des TSC-1/TSC-2 und anschließender Inhibition von mTORC-1 führt (110). Ein niedriges intrazelluläres Aminosäure-Niveau resultiert in der RAG-GTPase-abhängigen (Leucin, Arginin)(111, 112) oder -unabhängigen (Glutamin) (113) Regulierung des mTORC-1-Komplexes in lysosomalen Membranen.

Nach der Aktivierung des mTORC1-Komplexes werden dessen Effektorproteine durch Phosphorylierung an Serin- und/oder Threoninresten aktiviert oder inhibiert. Hierzu zählen insbesondere das *elongation initiation factor 4E* (eIF-4E) *binding protein 1* (4E-BP1) und die ribosomale S6 Kinase 1/p70 S6 Kinase (S6K1)(114, 115). Beide Proteine sind an der ribosomalen Translation verschiedenster Proteine beteiligt, u. a. von VEGF, HIF und Cyclin D (114). Die Aktivität von 4E-BP1 wird durch die Bindung des Proteins eIF-4E inhibiert, die von S6K1 durch die Bindung des Proteins eIF-3. Die Phosphorylierung durch mTORC1 sorgt für die Lösung dieser Bindungen, sodass 4E-BP1 und Sgk1 aktiviert und der Translationskomplex gebildet werden kann (116).

Über die Regulierung der Aktivität von mTORC2 ist weniger bekannt als für mTORC1, aber vermutlich spielt die Lokalisation an der Plasmamembran oder in ribosomalen Membranen eine Rolle (104, 117). Die Hauptsubstrate des mTORC2-Komplexes sind Akt, die Serumglukosekinase (SGK) und die Proteinkinase C (PKC). Nach der Phosphorylierung durch mTORC2 (am Serin 473) und PDK-1 (am Threonin 308) kann diese Kinase durch verschiedene Signalwege die Transkription und Translation, den Stoffwechsel, und den Zellzyklus regulieren, unter anderem durch die Phosphorylierung von TSC-2 und damit verbundene Aktivierung von mTORC-1.

1.2.2 mTOR im Nierenzellkarzinom

Es ist bekannt, dass mTORC1 in zahlreichen Tumorarten aktiviert ist. Hierfür sind Mutationen oder Deletionen in den Genen verschiedener mTORC1-assoziiierter Proteine ursächlich. Dazu zählen Mutationen, die zu einer höheren Aktivität von PI3K oder Akt führen, sowie solche, die Funktionen von TSC1 und TSC2 inhibieren (118). Außerdem führen ein Verlust oder Mutationen der Gene *NPRL2* und *NPRL3* und *DEPDC5*, die gemeinsam den sogenannten GATOR1-Komplex bilden, zu einer hohen Aktivität des mTORC1-Komplexes, da der GATOR1-Komplex durch Inhibition der Rag-GTPasen die Translokation von mTORC1 zur lysosomalen Membran inhibiert (119). Zudem können Mutationen zum Verlust der Funktion von PTEN, einem negativen Regulator der PI3/Akt-Signalwege, eine erhöhte mTORC1-Aktivität bedingen (120). Die Expression von mTOR und S6K1 und die Aktivität dieser Kinasen konnten im Tumorgewebe von Nierenzellkarzinompatienten nachgewiesen und mit der Prognose von lokal begrenztem und fortgeschrittenem Karzinomen assoziiert werden (121, 122). Aufgrund der Beobachtung, dass mTORC1 in Krebszellen aktiv ist und das Wachstum, die Proliferation, die Migration und die Invasion dieser Zellen fördert, wurden zielgerichtete Therapeutika zur Inhibition von mTOR in verschiedenen Tumorarten entwickelt, die sogenannten Rapaloge, welche die mTOR-Kinaseaktivität inhibieren. Hierzu zählen die Rapamycin-Derivate Sirolimus, Temsirolimus und Everolimus, die ihre Wirkung dadurch erzielen, dass sie an das intrazelluläre Protein *FK506-binding protein 12* (FKBP12) binden, woraufhin der Rapalog-FKBP12-Komplex an mTOR bindet und die Kinase allosterisch inhibiert (123). Die Rapalog-Therapie zählt derzeit zu den Standards der Behandlung von Patienten mit einem metastatischen Nierenzellkarzinom (124, 125).

Nur bei einem Teil der Patienten mit metastatischem Nierenzellkarzinom ist eine Rapalog-Therapie jedoch nutzbringend in der Verlängerung des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens. Der Erfolg scheint von der Art der Genmutationen in mTOR-relevanten Genen, insbesondere *MTOR*, *TRC-1* und *TRC-2*, abzuhängen (126-129).

1.3 Fragestellung

Während für ein lokal begrenztes Nierenzellkarzinom die Möglichkeit einer vollständigen Resektion und somit eine gute Prognose gegeben sind, stellt die Behandlung des metastasierenden Nierenzellkarzinoms nach wie vor eine Herausforderung für die Onkologie dar. Die pharmakologische Behandlung von Patienten mit einem solchen fortgeschrittenen Karzinom ist von Nebenwirkungen und Resistenzen begleitet. Inhibitoren des mTOR-Proteins und der mit diesem Protein assoziierten Signalwege gehören zu den Medikamenten, die für bestimmte Subgruppen der Nierenzellkarzinompatienten eine Therapieoption darstellen. Es ist bereits bekannt, dass mTOR-vermittelte Signalwege ähnlich wie in vielen anderen Tumorarten hochreguliert sind und zu vermehrtem Tumorwachstum und Metastasierung beitragen. Untersuchungen zur Expression von mTOR und der Aktivität der mTOR-Komplexe in Nierenzellkarzinommetastasen des zentralen Nervensystems sind allerdings bisher rar. In der vorliegenden Studie wurden Tumorgewebeproben von Patienten mit spinalen oder kranialen Metastasen eines Nierenzellkarzinoms auf die Expression und Aktivität von mTOR und mit mTOR assoziierten Effektor- oder Inhibitorproteinen untersucht, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Ist mTOR in Nierenzellkarzinommetastasen des zentralen Nervensystems aktiviert, und wie verhält sich die Expression im Vergleich von kranialen mit spinalen Metastasen?
2. Sind die Haupteffektorproteine von mTOR, p70S6K, 4E-BP1 und Akt in diesen Metastasen des Nierenzellkarzinoms exprimiert?
3. Liegen diese Effektorproteine in phosphorylierter, also aktivierter bzw. inaktivierter Form vor?

4. Unterscheidet sich die Proliferation zwischen kranialen und spinalen Metastasen?
5. Haben die Faktoren Geschlecht, Alter, Nephrektomie einen Einfluss auf Expression bzw. Phosphorylierung von mTOR oder der assoziierten Proteine?

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte

IHC: Dako Autostainer Plus, Agilent

Pipetten: Eppendorf

2.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aqua dest.	Para
Detektionssubstrat	Merck Millipore
Entellan	Sigma-Aldrich
Ethanol	Süsse
Mayers Hämalaun	Roth
Tween 20	Bio Froxx
Xylol	Quartett

2.3 Puffer und Lösungen

PBS: Fisher

Waschpuffer: Cos

Waschpuffer für IHC: Agilent

2.4 Antikörper

Die für die Immunhistochemie und Western Blotting verwendeten Antikörper waren von Cell Signaling Technology Deutschland (Frankfurt am Main), der β -Aktin-Antikörper für Western Blotting war von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-gekoppelter Anti-Rabbit-IgG-Sekundärantikörper eingesetzt. Alle verwendeten Antikörper sind in **Tabelle 2** gelistet.

Tabelle 2 Verwendete Antikörper

Protein	Spezies	Nummer
Primärantikörper		
p70S6K	Rabbit IgG	2708S
p-p70S6K	Rabbit	9204S
mTOR	Rabbit	2972S
p-mTOR	Rabbit	2976S
4E-BP1	Rabbit IgG	9644S
p-4E-BP1	Rabbit IgG	2855S
AKT	Rabbit	9272S
p-Akt1 (p-AKT T308)	Rabbit IgG	13038S
MIB	Monoclonal Mouse	M7240
pHH3	Rabbit	9701S
p70S6K	Rabbit	9204L
p-p70S6K	Rabbit	9208S
AMPK α	Rabbit IgG	50081S
p-AMPK α T172	Rabbit	35277T
p-Akt2 (p-AKT S473)	Rabbit	4060S
β -Aktin		
Sekundärantikörper		
IHC Dako Real EnVision Detection Kit	HRP Rabbit/Mouse	Ref.K5007, Agilent

2.5 Patientenkohorte und Studiendesign

Es wurde eine retrospektive Kohortenstudie durchgeführt. Zunächst wurden 58 Patienten mit einer metastatischen Nierenzellkarzinom-Diagnose ausgewählt, die in zwei neurochirurgischen Zentren zwischen 2002 und 2016 behandelt wurden. Von diesen 58 Patienten wurden 30 ausgeschlossen, da für sie keine geeigneten Paraffin-eingebetteten Gewebeproben der Metastasen mehr vorhanden waren bzw. das vorhandene Material nicht ausreichend für weitere Analysen war. Es wurden also Proben von 28 Patienten final ausgewertet. Die Alters- und Geschlechtsverteilung dieser 28 Patienten ist in **Tabelle 3** aufgelistet. Die Patientenkohorte setzte sich aus 19 Männern und 9 Frauen zusammen, mit einem Durchschnittsalter von 69,4 Jahren

(Mittelwert, Standardabweichung: $\pm 8,9$ Jahre). Die Patienten wurden außerdem anhand der Lokalisation der Metastasen (kranial oder spinal) kategorisiert (46,4 % kranial, 53,6 % spinal), außerdem wurde die Art der Therapie (nur Chemotherapie, Resektion auf der linken/rechten Seite) erfasst.

Tabelle 3 Patientencharakteristika der Studienkohorte (n = 28)

Parameter	
Geschlecht (%)	19 Männer (67,9), 9 Frauen (32,1)
Alter, Mittelwert (\pm SD)	69,4 (8,9)
Tumorlokalisation	
kranial, # (%)	13 (46,4)
spinal, # (%)	15 (53,6)
Therapie	
Nur Chemotherapie, # (%)	7 (25,0)
Resektion rechts, # (%)	15 (53,6)
Resektion links, # (%)	6 (21,4)

2.6 Ethikvotum

Für diese retrospektive Studie mit bereits archiviertem Patientenmaterial, welches nicht mehr für die Routinediagnostik benötigt wurde, wurde ein Votum von der Geschäftsstelle der lokalen Ethikkommission des Universitätsklinikums Magdeburg eingeholt (AZ R-09/20).

2.7 Western Blotting

2.7.1 Material

Für drei der 28 Patienten war kryokonserviertes Probenmaterial verfügbar, mit dem eine begleitende Western-Blot-Analyse durchgeführt werden konnte. Da nur Material für vereinzelte Patienten zur Verfügung stand, wurde diese Analyse in erster Linie

durchgeführt, um exemplarisch die Expression von in der mTOR-Signalkaskade involvierten Proteinen und ihrem Phosphorylierungsstatus mit einem zweiten unabhängigen Verfahren zu evaluieren.

2.7.2 Durchführung

Für die verfügbaren Gewebeproben wurde die Expression von p70S6K Gesamtprotein (AK-Verdünnung 1:1000), phosphoryliertem p70S6K (AK-Verdünnung 1:1000), AMPK α (AK-Verdünnung 1:1000), phosphoryliertem AMPK α T172 (AK-Verdünnung 1:1000), AKT Gesamtprotein (AK-Verdünnung 1:1000), phosphoryliertem AKT T308 (AK-Verdünnung 1:1000) und S473 (AK-Verdünnung 1:2000), 4E-BP1 und phosphoryliertem 4E-BP1 (AK-Verdünnung 1:1000 für beide) mittels Western Blotting nach standardisierten Protokollen analysiert. Hierfür wurden die Gewebeproben homogenisiert, zentrifugiert, und das gewonnene Protein wurde für 5 Minuten bei 95°C in einem 2x Laemmli-SDS Ladebuffer denaturiert. Für jede Gewebeprobe wurden 20 μ g Gesamtprotein pro Spur eines für das jeweilige Molekulargewicht der später zu detektierenden Proteine geeignet konzentrierten SDS-Polyacrylamidgels aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran in einer Nassblot-Kammer geblottet. Die Blockierung der Membran erfolgte für 1 h entweder mit 5% Magermilch oder mit 5% BSA, entsprechend den Hinweisen des Antikörper-Herstellers. Danach erfolgte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schaukeln die Inkubation der Membranen mit dem jeweiligen Primär-Antikörper in der oben angegebenen Verdünnung im gleichen Puffer. Nach Waschen der Membranen, Inkubation mit dem Sekundärantikörper gemäß Hersteller-Angaben und erneutem Waschen erfolgte die ECL-Visualisierung der Proteinbanden auf ECL-Hyperfilm (Amersham) durch Inkubation der Membran mit einem Detektionssubstrat von Merck Millipore. Beta-Aktin diente als interne Ladekontrolle (Verdünnung des Antikörpers 1:5000).

2.7.3 Auswertung

Die Größe der Proteine wurde anhand der Proteinbanden mit dem durch den Hersteller angegebenen Molekulargewichten verglichen. Dazu diente ein auf den Gelen mitgelaufener Molekulargewichts-Standard. Die gefundenen Molekulargewichte entsprachen in jedem Falle dem Erwartungswert. Eine quantitative

Expressionsanalyse (Densitometrie) war aufgrund mangelnden Probenmaterials für die Western-Blot-Ergebnisse nicht möglich.

2.8 Immunhistochemie

2.8.1 Material

Für die Immunhistochemie wurden fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben verwendet. Die Schnitte wurden anhand eines zuvor hergestellten Tissue-Microarrays gefärbt und ausgewertet. Hierbei können zahlreiche konsekutive Schnitte einer Gewebeprobe auf einem einzelnen Objektträger unter denselben standardisierten Bedingungen auf ihre Proteinexpression analysiert werden.

Die Symptomatik dieser Patienten beinhaltete Rückenschmerzen, Störungen der Feinmotorik und Hemi-/Paraparese der Gliedmaßen, Seh- und Sprachstörungen, Schmerzen, Taubheitsgefühle, Schwellungen unter der Haut im Kopfbereich und Schwindel.

Von den Gewebeproben dieser Patienten wurden Schnitte von 1 bis 2 µm Dicke für die immunhistochemischen Untersuchungen angefertigt und mindestens drei Gewebestücke für jeden Patienten ausgewertet.

2.8.2 Durchführung

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die endogenen Proteine blockiert und die Gewebe mit dem Erstantikörper (anti)-p-70S6k, p-p70S6K, mTOR, p-mTOR, 4EB-P, p-4EB-P, AKT, p-Akt S473, p-Akt T308, MIB-1, pHH3; Verdünnung 1:200 für alle Antikörper) für 25 min. inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten wurden die Gewebe mit einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (1:200) für weitere 25 Minuten inkubiert, erneut gewaschen, und die Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Schnitte wurden mit Kanada-Balsam eingedeckelt.

2.8.3 Auswertung

Die Färbung wurde mikroskopisch ausgewertet und Bilder in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen (**Abbildung 4**). Die Intensität der Färbung wurde anschließend für jede Probe als "keine Färbung" (0), "schwache Färbung" (1), "moderate Färbung" (2) und "starke Färbung" (3) kategorisiert.

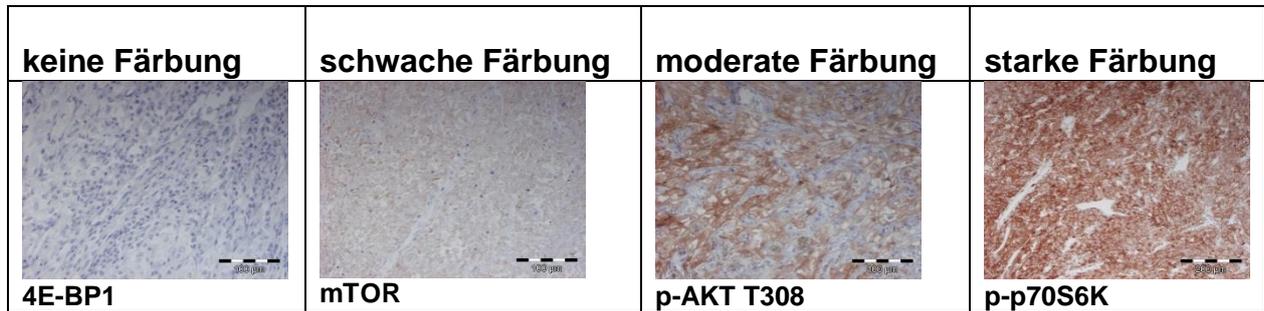


Abbildung 4 Beispielhafte Aufnahmen von Präparaten ohne Färbung, mit einer schwachen Färbung, einer moderaten oder einer starken Immunfärbung.

Die Zellproliferation wurde durch Bestimmung des Prozentsatzes an Tumor-Zellkernen mit positiver Färbung für die Marker molecular immunology Borstel (MIB-1) und phosphorylated histone H3 (pHH3) quantifiziert.

2.9 Koloniebildungsassay und Proliferationsassay mit Caki-1- und Caki-2-Zellen unter mTORC1/2-Hemmung

Die Proliferation von Caki-1- und Caki-2-Zellen, humanen Zelllinien des klarzelliges Nierenzellkarzinoms, wurde anhand eines 5-Bromo-2'-deoxy-uridine-Assays der Firma Roche untersucht. Die Vorgehensweise entsprach den Herstellerangaben. Hierfür wurden 10000 Zellen pro Well einer 96-well-Platte in DMEM-Medium (high glucose), supplementiert mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin, eingesät und unter Normalbedingungen (5% CO₂, 37°C) für 24 Stunden in einem Infrarot-gesteuerten Zell-Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem dualen, ATP-kompetitiven mTORC1/2-Inhibitor AZD8055 (20 nM, 200 nM oder 1 µM) oder dem korrespondierenden Lösungsmittel DMSO als Kontrolle behandelt. Nach 24 oder 48 Stunden wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, und mit 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) für zwei Stunden inkubiert. Die Weiterbehandlung erfolgte gemäß Herstellerangaben für das BrdU-Assay-Kit. Am Ende erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen BrdU und das Reaktionsprodukt wurde durch Zugabe des Peroxidasesubstrats für eine

Inkubationszeit von maximal 30 Minuten bei Raumtemperatur sichtbar gemacht. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung der optischen Dichte des Reaktionsprodukts in einem Tecan Infinite 200 Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Zur Untersuchung der Koloniebildung wurden 10000 Caki-1-Zellen in Zellkulturschalen von 10 cm Durchmesser unter Bedingungen wie oben ausgesät, für 24 Stunden inkubiert, und anschließend mit dem ATP-kompetitiven mTORC1/2-Inhibitor AZD8055 (20 nM, 200 nM oder 1 μ M) oder DMSO als Kontrolle für 6 Tage inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Platten einmal mit PBS gewaschen, und 2 mL Kristallviolettlösung (0,5 g Kristallviolett, 20 mL Methanol, 80 mL H₂O) pro Platte zugegeben. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei geschlossenem Deckel auf dem Schüttler mit der Kristallviolettlösung inkubiert. Anschließend wurde die Zellkulturplatte zweimal mit dH₂O gewaschen, trocken geklopft und für 60 Minuten bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Kolonien in einem Inversmikroskop betrachtet (Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss) und von 30 Kolonien pro Platte wurde mittels Computer-gestützter morphometrischer Analyse (Axiovision, Release 4.8, Carl Zeiss) die Koloniefläche ermittelt und daraus die im Ergebnisteil dargestellte mittlere Koloniefläche berechnet.

2.10 Statistische Auswertung

Zunächst wurden alle Proben insgesamt betrachtet und die Mittelwerte und Standardabweichungen der *immune reactive*-(IR)-Scores aller Färbungen berechnet. Der mittlere IR-Score eines gegebenen Proteins wurden dann anhand des Mann-Whitney-U-Tests mit dem mittleren IR-Score seiner jeweiligen phosphorylierten Form verglichen. Zudem wurde ebenfalls mit dem Mann-Whitney u-Test nach signifikanten Einflüssen der erhobenen klinischen Daten bzw. Patientendaten auf die Scores eines gegebenen Proteins oder seiner phosphorylierten Form gefahndet. Die Immunfärbungen wurden für die statistische Auswertung als abhängige Variable betrachtet, während die qualitativen Daten Geschlecht der Patienten, Lokalisation des Tumors (kränial oder spinal) oder stattgefundene Nephrektomie (ja/nein) die unabhängigen Variablen darstellten, also die Gruppen definierten. Die quantitativen Daten Alter, MIB-Index und pHH3-Index wurden dabei in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei die Werte in einer Gruppe kleiner oder gleich dem Mittelwert des jeweiligen

Parameters waren und die Werte in der anderen Gruppe größer als der Mittelwert. Für diese beiden Gruppen wurde zunächst die deskriptive Statistik mit den Mittelwerten und der Standardabweichung für jeden untersuchten Parameter berechnet und anschließend beide Gruppen mittels t-Test verglichen. Ein p-Wert von $p \leq 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied betrachtet. Alle statistischen Analysen wurden mithilfe der Software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Version 25, IBM, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von mTOR und mTOR-assoziierten Proteinen in fixierten Gewebeproben von spinalen und kranialen Nierenzellkarzinommetastasen

Die IR-Scores wurden zunächst durch Auswertung von mindestens drei Gewebestücken pro Patient für jedes Protein (Gesamtprotein und phosphoryliertes Protein) berechnet und anschließend die Scores der Gesamtproteine und die der phosphorylierten Proteine in Boxplots graphisch dargestellt, um einen Überblick über die Expressionslevel zu erhalten. In **Tabelle 4** sind die niedrigsten und höchsten IRS-Werte für jedes Protein sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen gelistet.

Abbildung 5 zeigt Beispielbilder für die phosphorylierten Proteine p-AKT (S473 und T308), p-p70S6K, p- mTOR, p-4E-BP1 und pHH3.

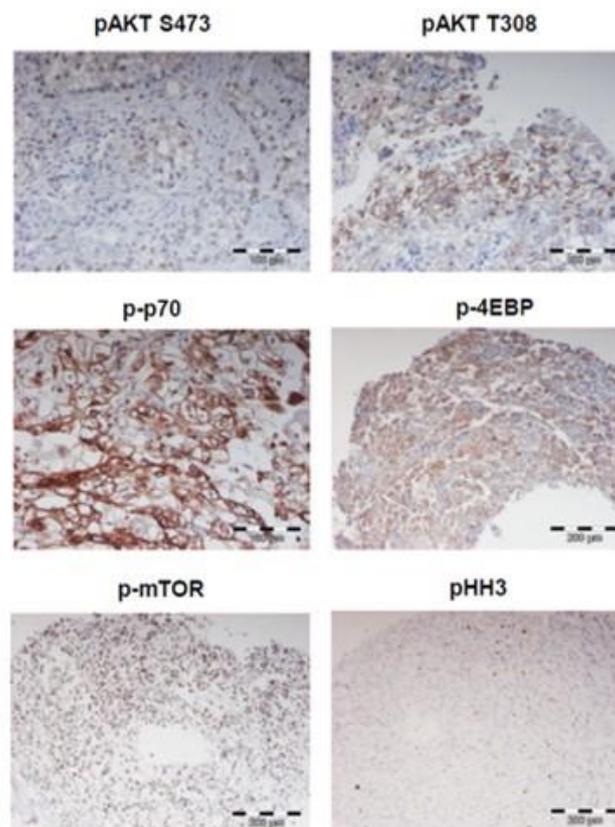


Abbildung 5 Beispielhafte Färbungen der phosphorylierten Proteine AKT, p70S6K, 4E-BP1, mTOR und pHH3.

Der Mittelwert des IR-Scores war relativ niedrig für alle untersuchten Proteine (<1), jedoch wurden einzelne Werte von bis zu 3, d. h. eine sehr starke Expression erreicht. Der Mittelwert lag für p70S6K bei 0,73 (Standardabweichung $\pm 0,58$), für phosphoryliertes p70S6K bei 0,89 ($\pm 0,72$), für mTOR bei 0,79 ($\pm 0,62$), für phosphoryliertes mTOR bei 0,91 ($\pm 0,81$), für 4E-BP1 bei 0,95 ($\pm 0,77$), für phosphoryliertes 4E-BP1 bei 0,98 ($\pm 0,86$), für Akt bei 0,98 ($\pm 0,84$), für phosphoryliertes Akt1 (p-AKT T308) bei 0,85 ($\pm 0,68$) und für phosphoryliertes Akt2 (p-AKT S473) bei 0,72 ($\pm 0,72$). Es waren also alle Proteine und ihre phosphorylierte Fraktion in den Geweben exprimiert, aber die Expression war insgesamt relativ schwach.

Tabelle 4 IR-Scores (Minimum, Maximum, Mittelwert) von mTOR und mTOR-assoziierten Proteinen in Metastasen des Nierenzellkarzinoms

Protein	Minimum IRS	Maximum IRS	Mittelwert IRS (\pm SD)
p70S6K	0	2	0,73 (0,58)
p-p70S6K	0	3	0,89 (0,72)
mTOR	0	2	0,79 (0,62)
p-mTOR	0	3	0,91 (0,81)
4E-BP1	0	3	0,95 (0,77)
p-4E-BP1	0	3	0,98 (0,86)
Akt	0	3	0,98 (0,84)
p-Akt1	0	3	0,85 (0,68)
p-Akt2	0	3	0,72 (0,72)

Abbildungen 6 bis 9 zeigen Boxplots der IR-Scores für mTOR und phosphoryliertes mTOR (**Abbildung 6**), Akt und phosphoryliertes Akt1 und Akt2 (**Abbildung 7**), 4E-BP1 und phosphoryliertes 4E-BP1 (**Abbildung 8**) sowie für p70S6K und phosphoryliertes p70S6K (**Abbildung 9**). Es wurde anhand des Mann-Whitney-U-Tests überprüft, ob sich die Expression zwischen kranialen und spinalen Tumoren unterschied; dies war jedoch nicht der Fall, die Verteilung der IR-Scores zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

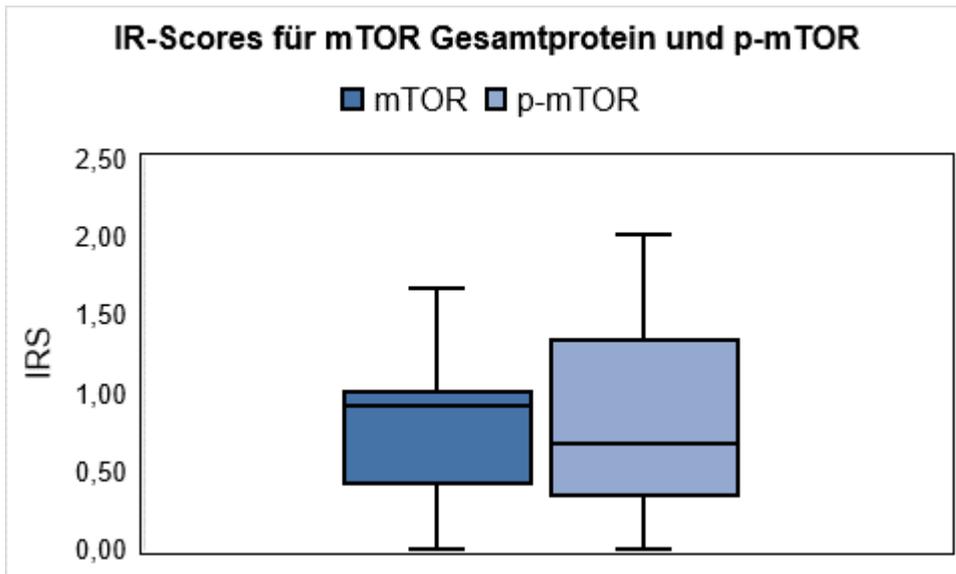


Abbildung 6 IR-Scores für die Expression von mTOR und phosphoryliertem mTOR (p-mTOR) in Gewebeproben kranialer und spinaler Tumore des Nierenzellkarzinoms.

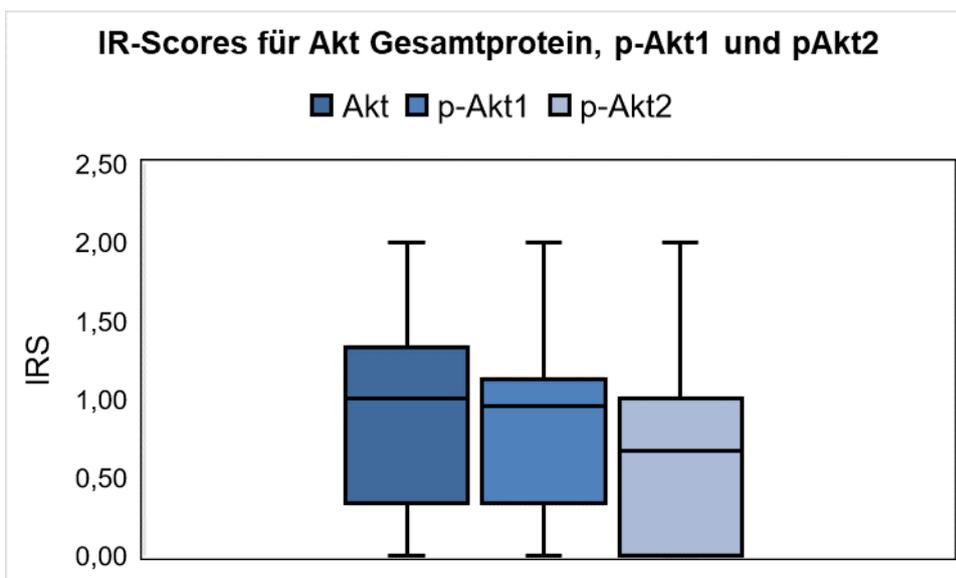


Abbildung 7 IR-Scores für die Expression von Akt Gesamtprotein und phosphoryliertem Akt (p-Akt1(p-AKT T308), p-Akt2(p-AKT S473)) in Gewebeproben kranialer und spinaler Metastasen des Nierenzellkarzinoms.

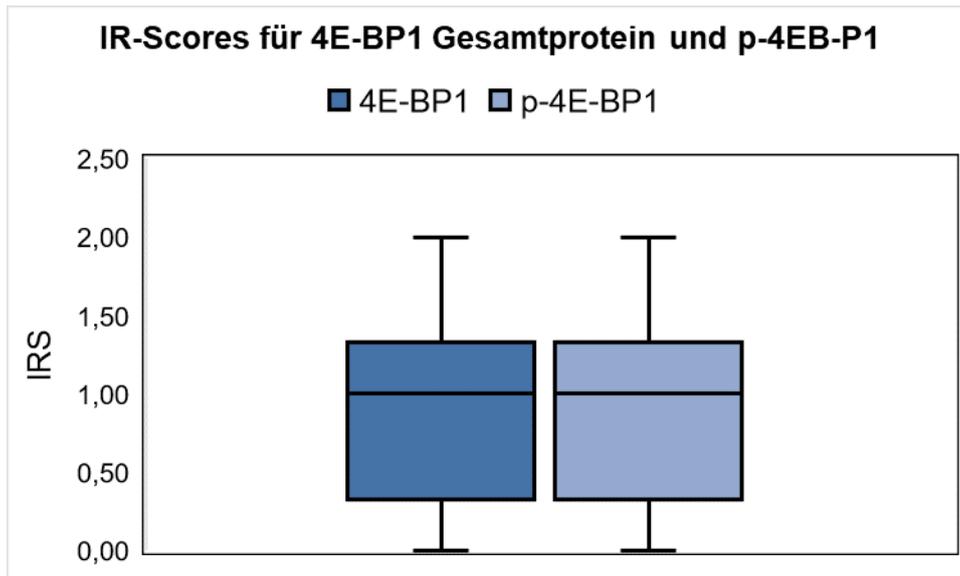


Abbildung 8 IR-Scores für die Expression von 4E-BP1 Gesamtprotein und phosphoryliertem 4E-BP1 (p-4E-BP1) in Gewebeproben kranialer und spinaler Tumore des Nierenzellkarzinoms.

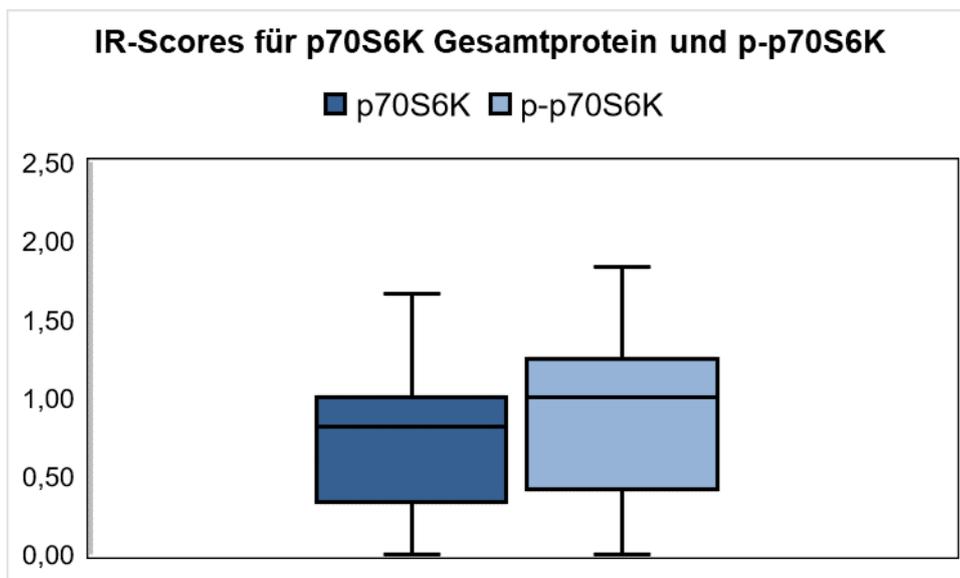


Abbildung 9 IR-Scores für die Expression von p70S6K Gesamtprotein und phosphoryliertem p70S6K (p-p70S6K) in Gewebeproben kranialer und spinaler Nierenzellkarzinom-Metastasen.

Im nächsten Schritt wurden die untersuchten Gewebeproben in Gruppen aufgeteilt, um Unterschiede in der Expression der mTOR-assoziierten Protein relativ zu den Parametern Alter, Geschlecht und Tumorlokalisierung zu untersuchen. In **Abbildungen**

10 und 11 sind die IR-Scores für p-70S6K und p-p70S6K (10A), mTOR und p-mTOR (10B), 4E-BP1 und p-4E-BP1 (11A), sowie Akt, p-Akt1(p-AKT T308) und p-Akt2(p-AKT S473) (11B) relativ zum Patientenalter dargestellt, wobei die Gruppeneinteilung in jung (unter oder gleich dem Mittelwert, n = 12) oder alt (über dem Mittelwert, n = 16) vorgenommen wurde. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Gesamtproteine oder der phosphorylierten Proteine relativ zum Patientenalter, wenn die Patienten anhand der Abweichung vom Mittelwert eingeteilt wurden.

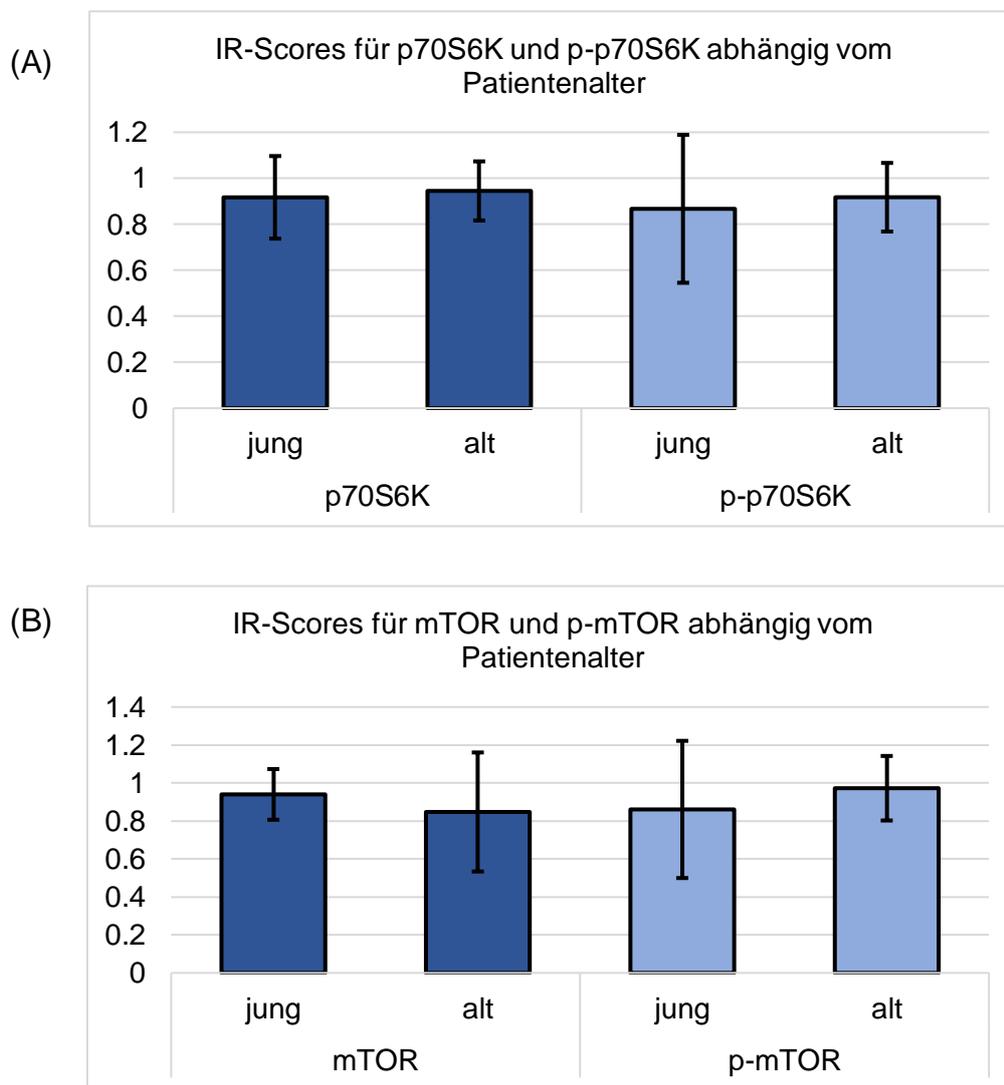


Abbildung 10 (A) IR-Scores für p70S6K und p-p70S6K abhängig vom Patientenalter. (B) IR-Scores für mTOR und p-mTOR abhängig vom Patientenalter.

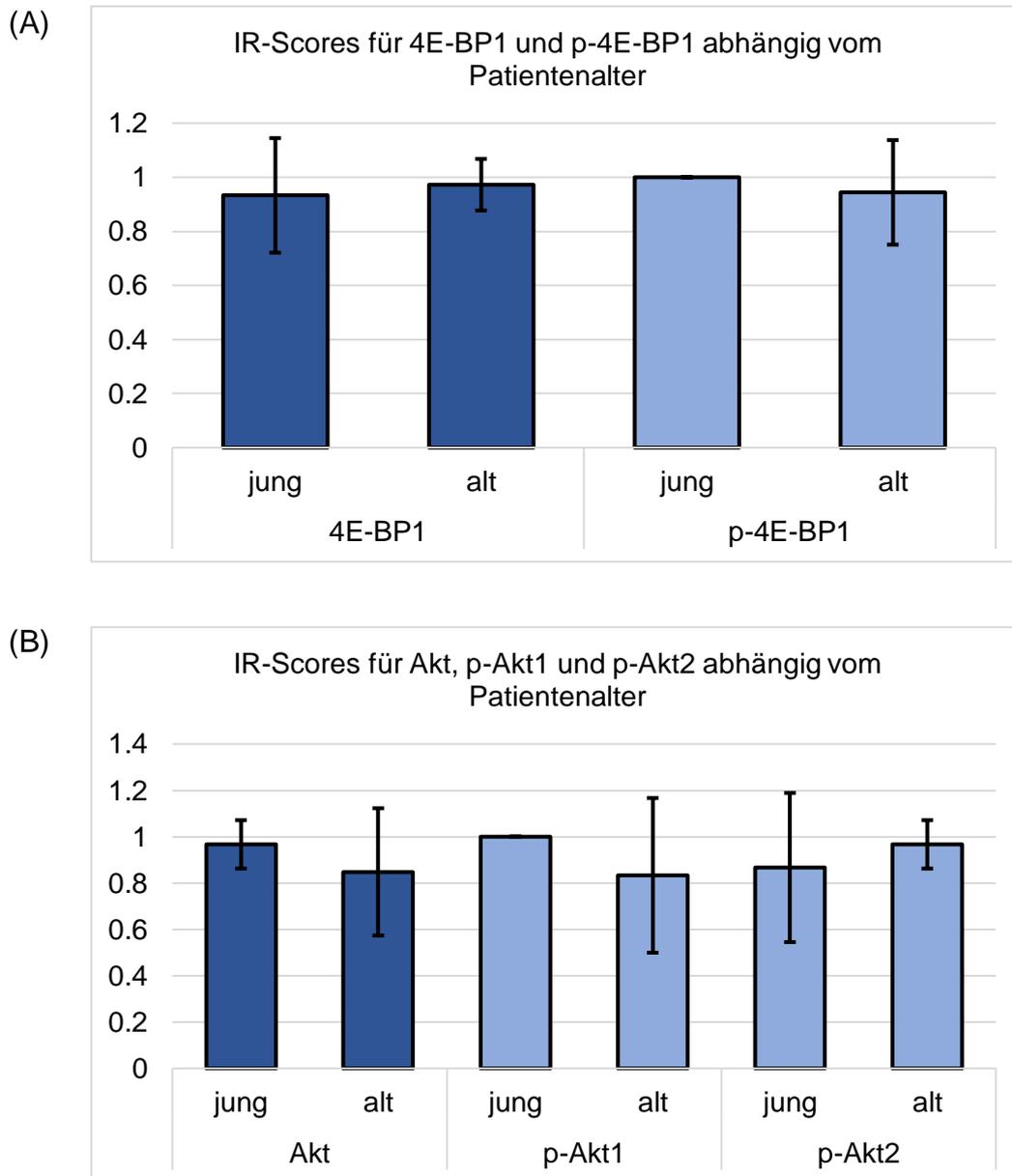
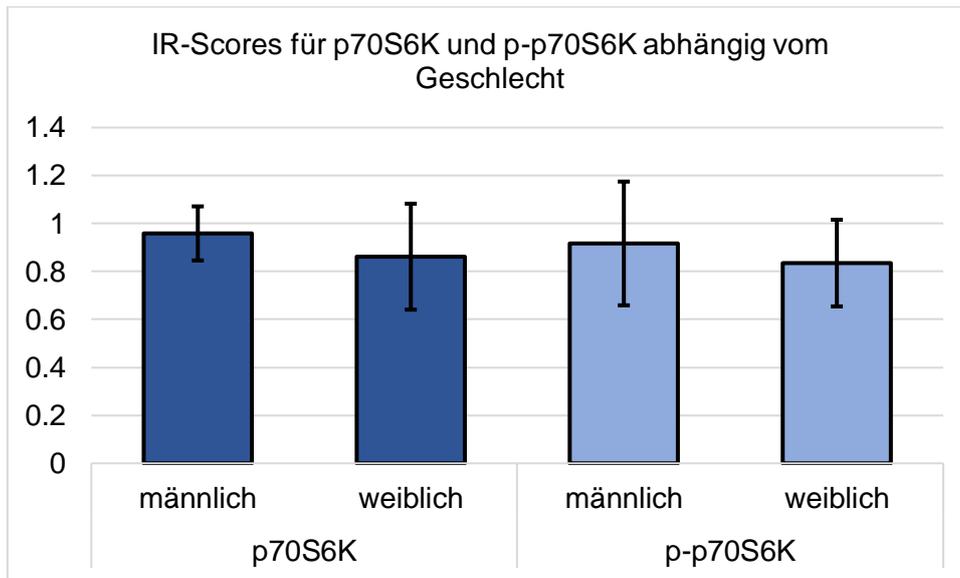


Abbildung 11 (A) IR-Scores für 4E-BP1 und p-4E-BP1 abhängig vom Patientenalter. (B) IR-Scores für Akt, p-Akt1 und pAkt2 abhängig vom Patientenalter.

In **Abbildung 12** sind die IR-Scores für p-70S6K und p-p70S6K (A), mTOR und p-mTOR (B), 4E-BP1 und p-4E-BP1 (C) sowie Akt, p-Akt1 und p-Akt2 (D) relativ zum Geschlecht dargestellt (männlich: n = 16, weiblich: n = 6). Die Expression der Gesamtproteine oder der meisten phosphorylierten Proteine unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Geschlechtern. mTOR und 4E-BP1 waren bei Männern leicht höher exprimiert als bei Frauen (**Abbildungen 12A und 12B**).

(A)



(B)

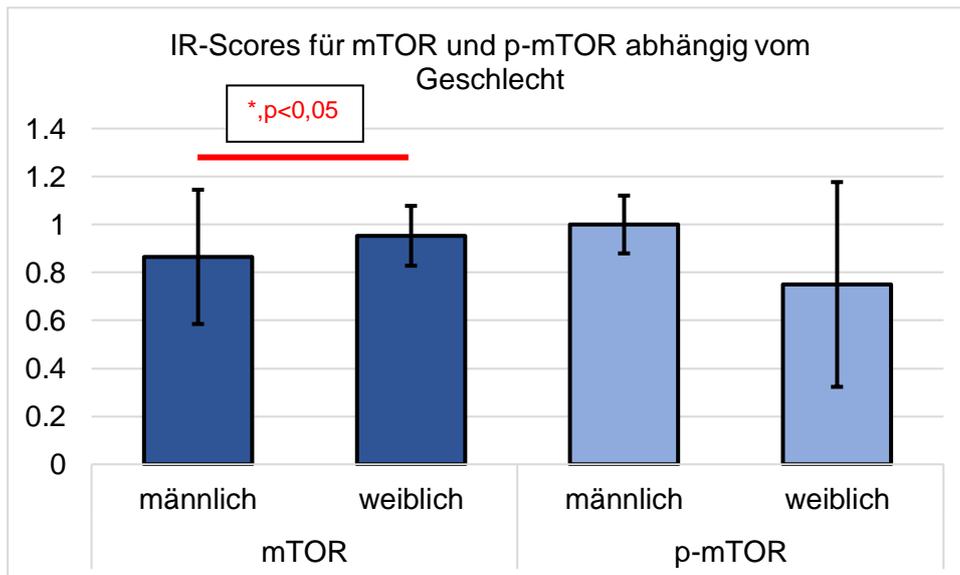


Abbildung 12(A) IR-Scores für p70S6K und p-p70S6K abhängig vom Geschlecht. (B) IR-Scores für mTOR und p-mTOR abhängig vom Geschlecht.

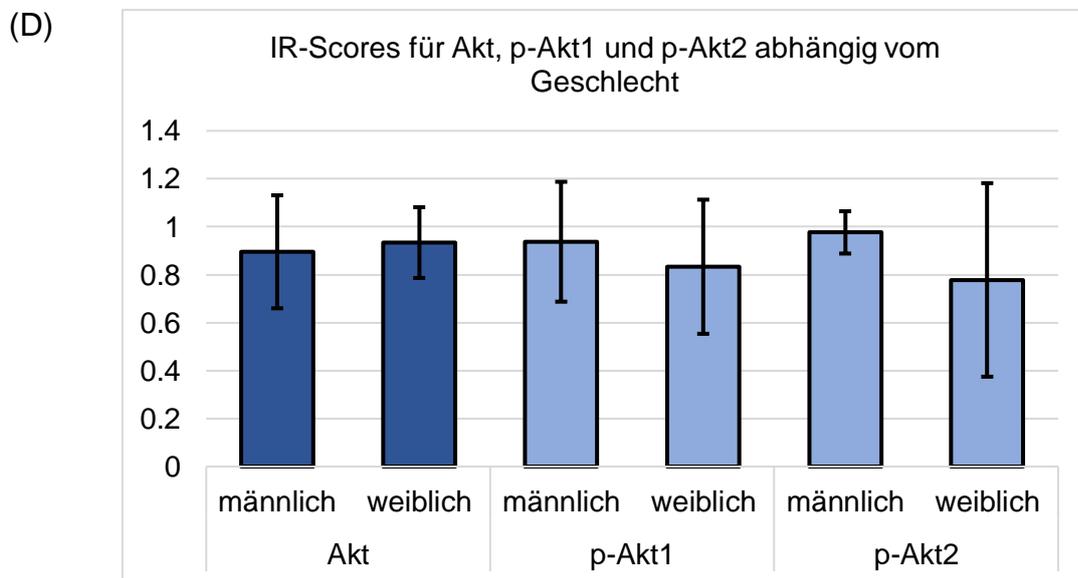
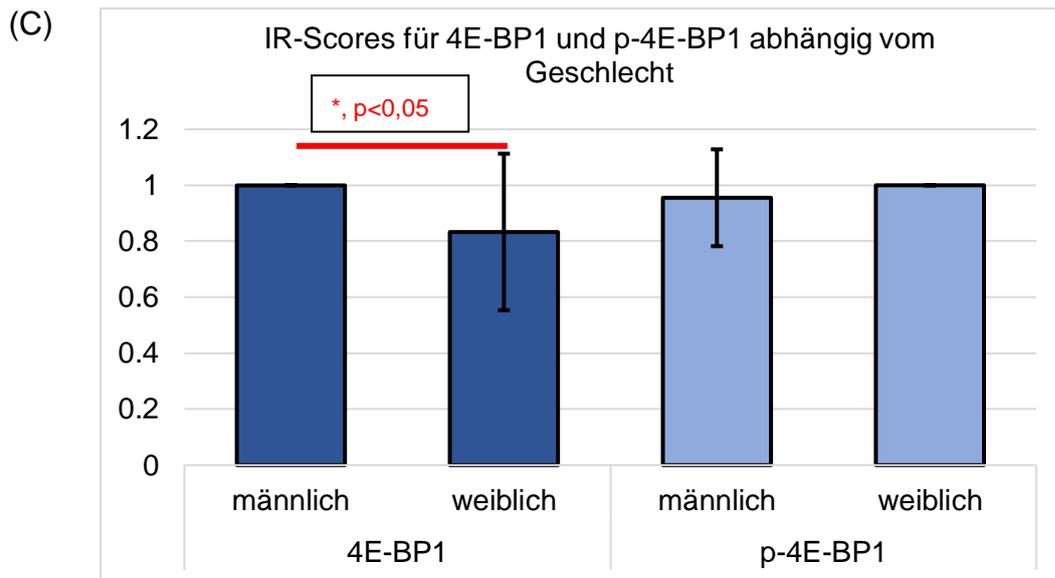
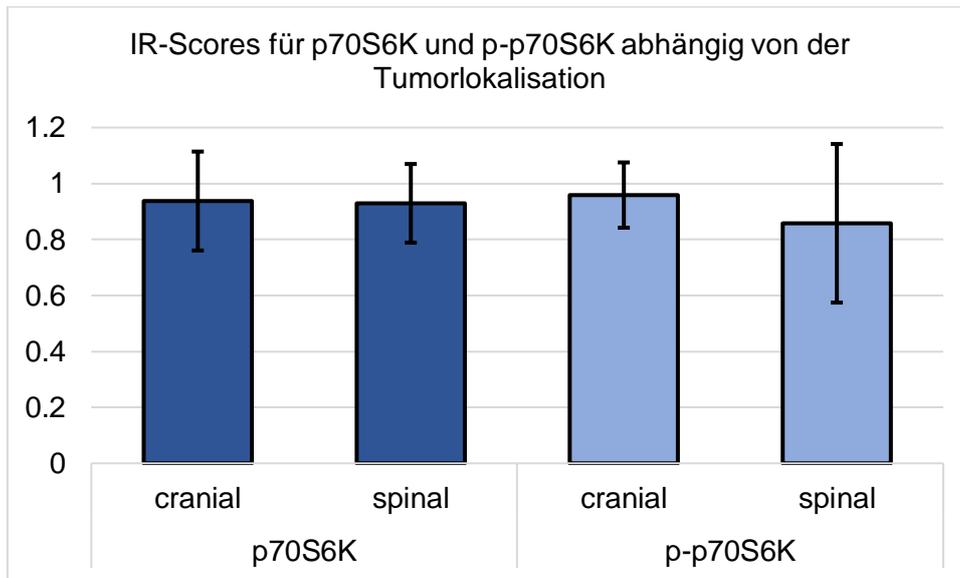


Abbildung 12 (C) IR-Scores für 4E-BP1 und p-4E-BP1 abhängig vom Geschlecht.

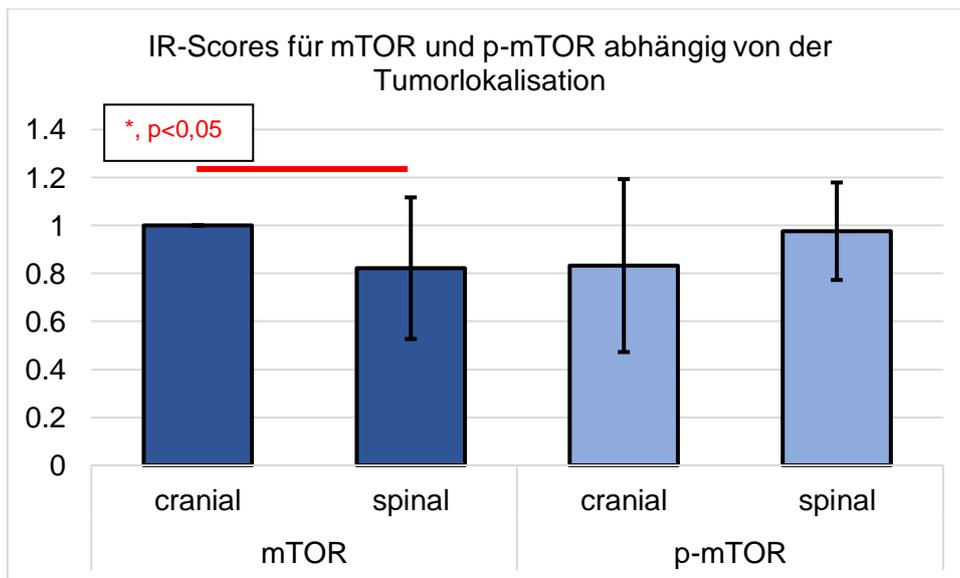
(D) IR-Scores für Akt, p-Akt1 und pAkt2 abhängig vom Geschlecht.

In **Abbildung 13** sind die IR-Scores für die mTOR-assoziierten Proteine relativ zur Tumorlokalisation (kranial, $n = 8$, oder spinal, $n = 14$) dargestellt. Die Expression von mTOR in kranialen Tumoren lag signifikant über der von spinalen Tumoren ($p < 0,05$), die IR-Scores aller anderen Proteine unterschieden sich nicht signifikant zwischen beiden Tumorarten.

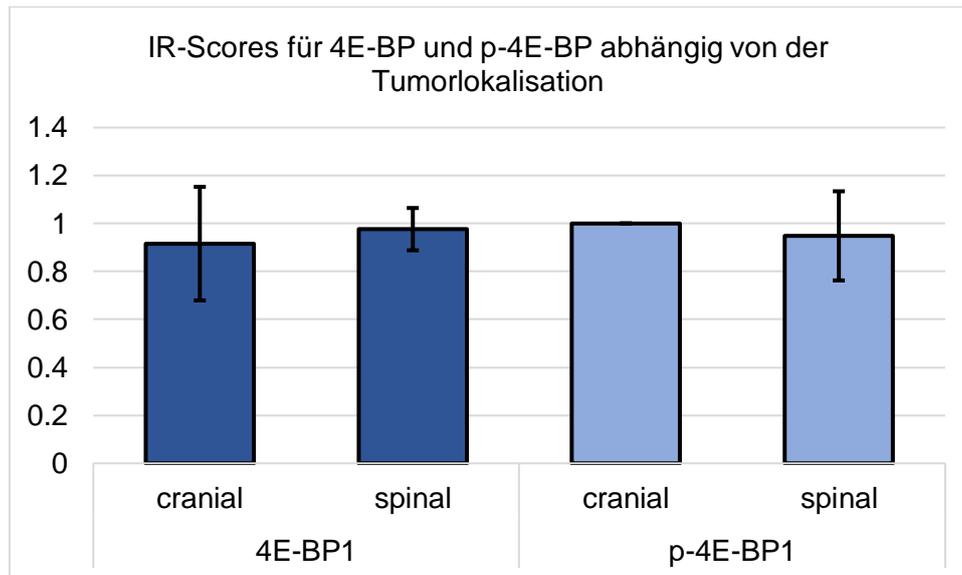
(A)



(B)



(C)



(D)

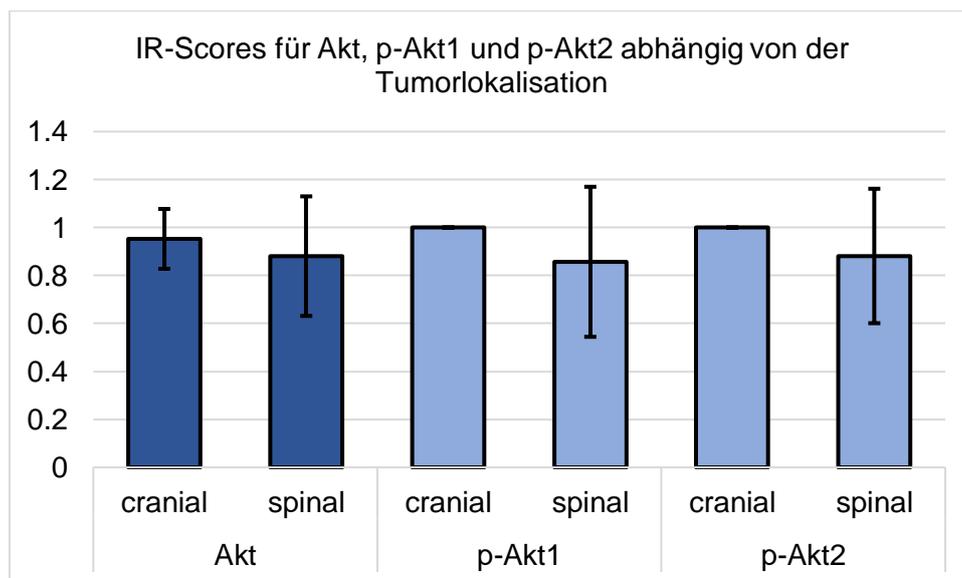
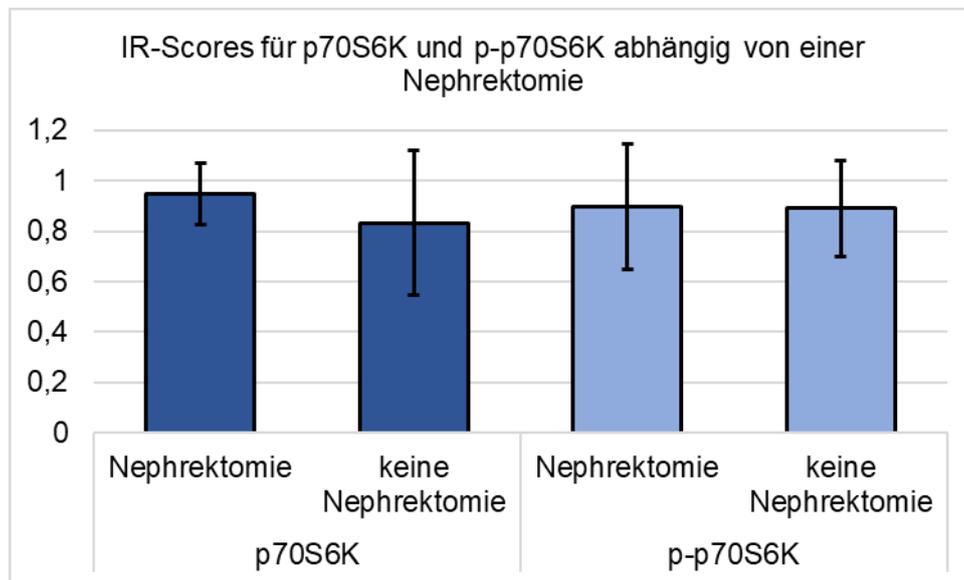


Abbildung 13 IR-Scores für p70S6K und p-p70S6K (A), mTOR und p-mTOR (B), 4E-BP1 und p-4E-BP1 (C) und Akt, p-Akt1 und p-Akt2 (D) abhängig von der Tumorlokalisation (kranial oder spinal).

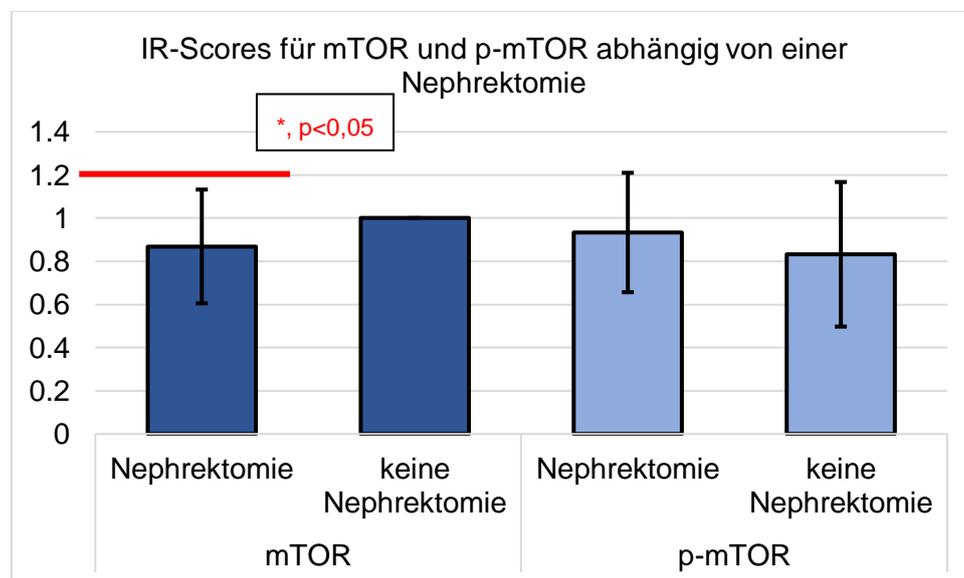
Die IR-Scores der mTOR-assoziierten Proteine in Geweben von Patienten, die eine Nephrektomie erhalten hatten, im Vergleich zu Patienten ohne einen solchen Eingriff sind in **Abbildung 14** dargestellt. Die Expression von mTOR war signifikant höher in Gewebeproben von Patienten ohne eine Nephrektomie ($p < 0,05$), während die

Expression von 4E-BP1 in Geweben von Patienten mit einer Nephrektomie signifikant höher war als in Geweben von Patienten ohne eine Nephrektomie ($p < 0,05$). Die IR-Scores der anderen Proteine unterschieden sich nicht signifikant zwischen beiden Gruppen.

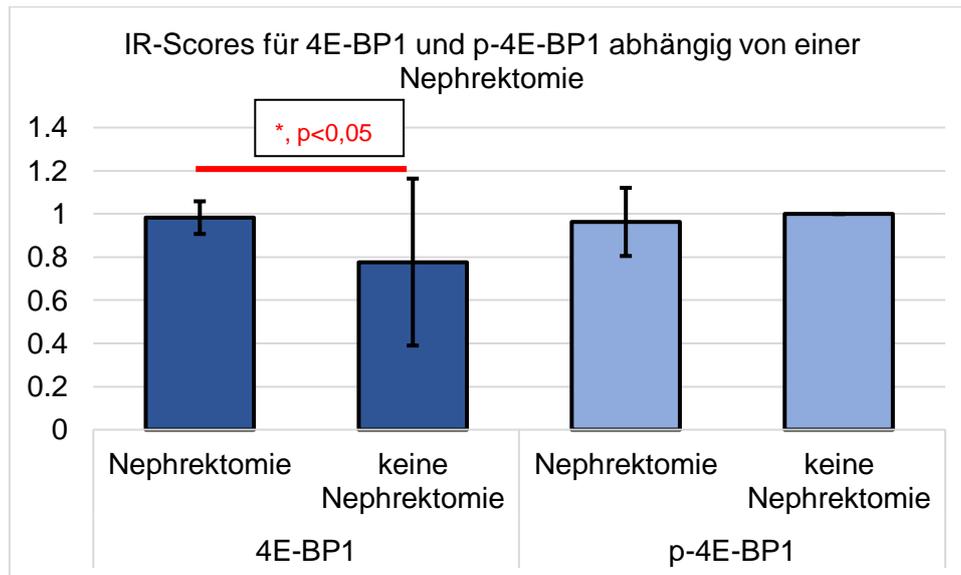
(A)



(B)



(C)



(D)

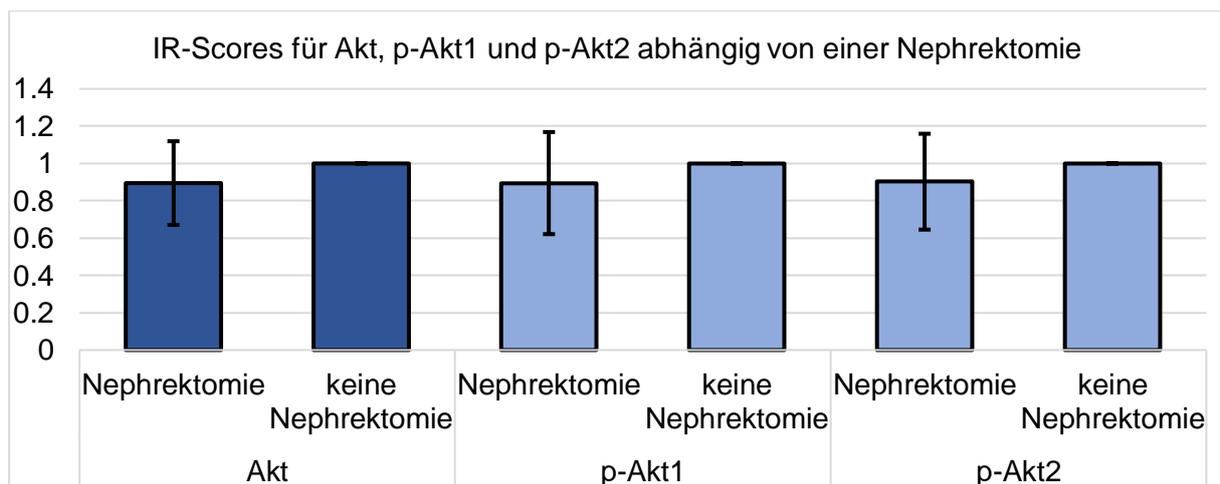


Abbildung 14 IR-Scores für p70S6K und p-p70S6K (A), mTOR und p-mTOR (B), 4E-BP1 und p-4E-BP1 (C) und Akt, p-Akt1 und p-Akt2 (D) in Geweben von Patienten mit und ohne Nephrektomie.

Abbildung 15 zeigt für jede dieser Intensitäten eine beispielhafte Färbung im paarweisen Vergleich von Primärtumor und Metastasen. Die Unterschiede in der Expressionsstärke sind abhängig von der Tumorlokalisation ersichtlich. Beim ersten Paar (1a/1b) fällt dies insbesondere für die Färbung von Akt auf, während die Intensität der Färbungen von p-p70S6K und p-4E-BP1 vergleichbar war. Beim zweiten Paar (2a/2b) liegt für alle drei Proteine, p-p70S6K, p-4E-BP1 und p-Akt T308, eine vergleichbar starke Intensität der Färbung vor. Auch der Vergleich des dritten Paares

(3a/3b), bei dem es sich bei den Proben 3a um den Primärtumor und den Proben 3b um eine Metastase handelt, zeigt, dass die Expression von Akt, p-p70S6K und p-4E-BP1, in beiden Lokalisationen gleich stark ist (**Abbildung 15**).

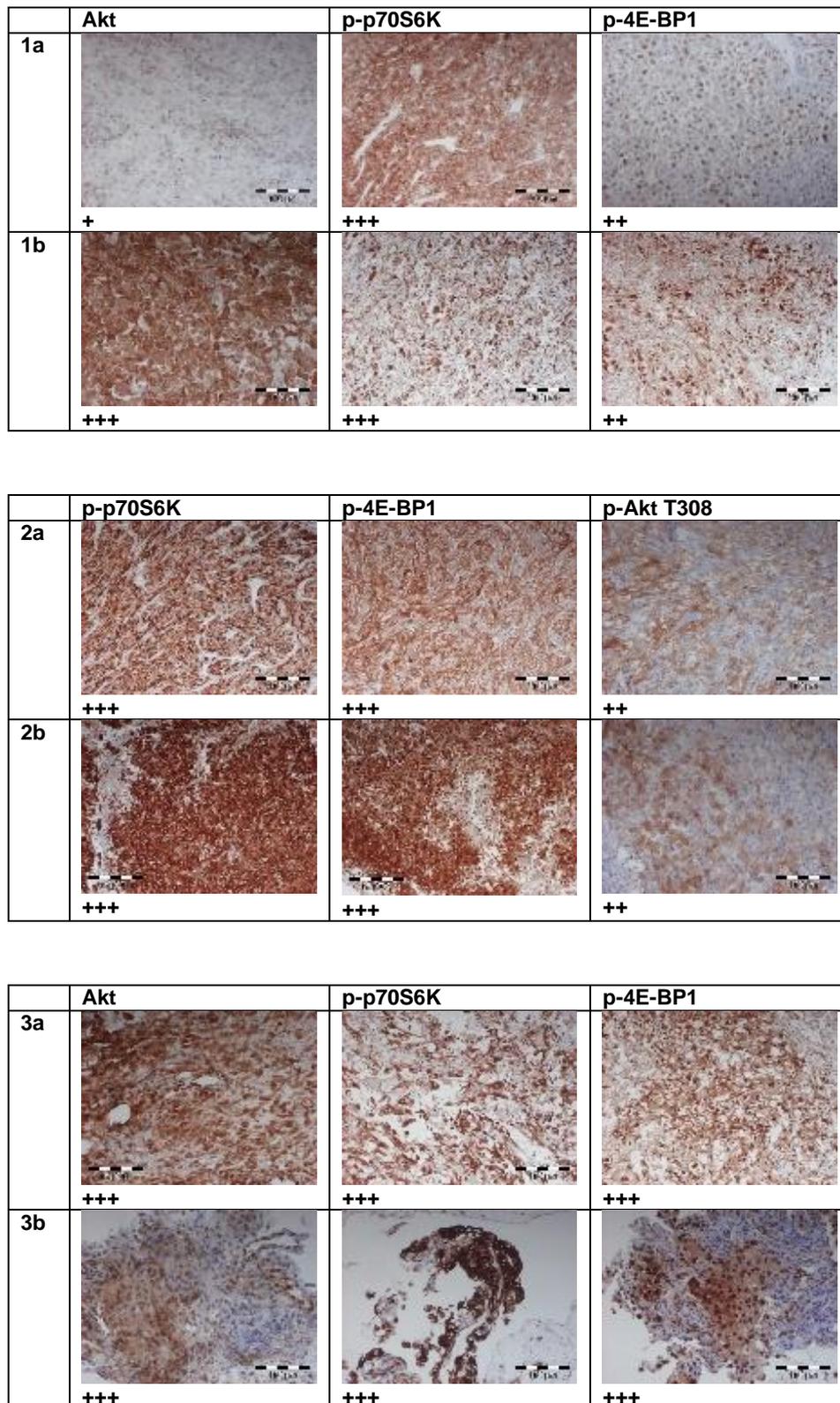


Abbildung 15 Immunhistochemische Färbung im paarweisen Vergleich von Primärtumor (1a, 2a, 3a) und ZNS-Metastase (1b, 2b, 3b)

3.2 Expression der mTOR-assoziierten Proteine in Gewebelysaten von Patienten mit kranialen Nierenzellkarzinommetastasen

Im letzten Schritt wurde die Expression von mTOR und mTOR-assoziierten Proteinen in Gewebelysaten von drei Patienten mit kranialen Nierenzellmetastasen analysiert. Alle Proteine konnten in der Western-Blot-Analyse in den drei Geweben nachgewiesen werden, mit Ausnahme von phosphoryliertem Akt2 in einer Gewebeprobe (**Abbildung 16**). Die beobachteten Molekulargewichte entsprachen dabei den vom Hersteller der Antikörper angegebenen. Da nur so wenige kryokonservierte Gewebeproben zur Verfügung standen, konnte dieser Versuch nur qualitativ ausgewertet werden.

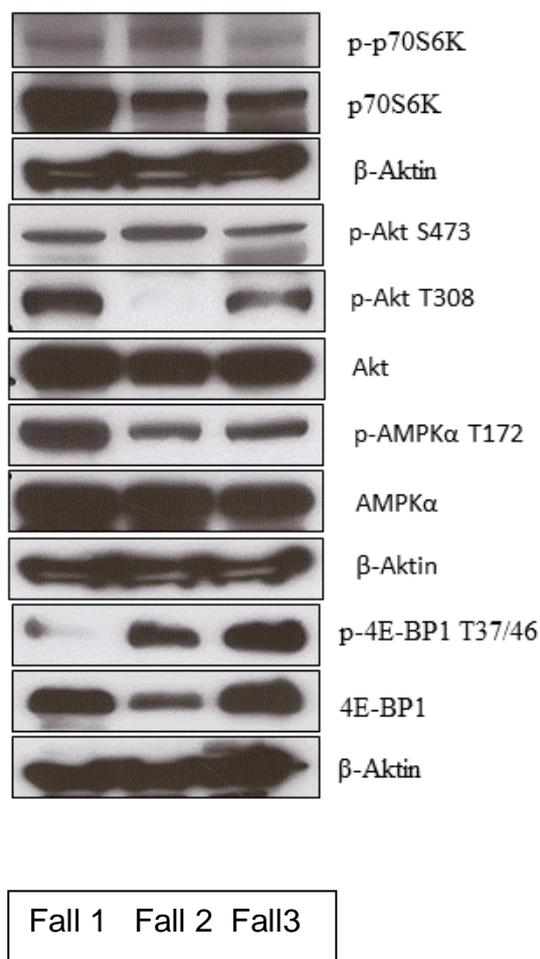


Abbildung 16 Expression von mTOR und mTOR-assoziierten Signalproteinen in Gewebelysaten kranialer Metastasen des Nierenzellkarzinoms.

3.3 Proliferation in spinalen und kranialen Nierenzellkarzinommetastasen

Die Indices der Proliferationsmarker MIB-1 und pHH3 wurden für jedes Gewebe evaluiert, indem positiv gefärbte Zellkerne ausgezählt und der prozentuale Anteil an

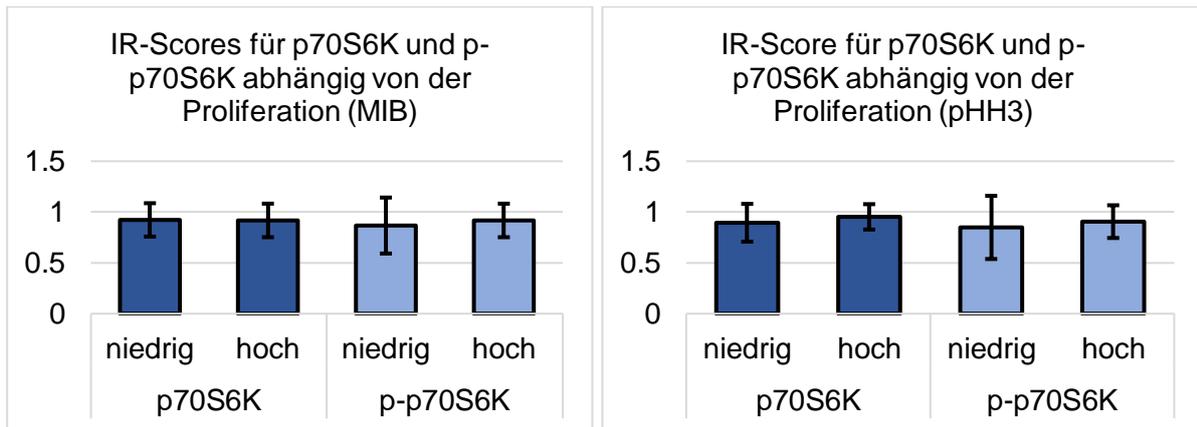
allen Zellkernen berechnet wurde. Die Auswertung erfolgte kategorisiert nach der jeweiligen Lokalisation. In Tabelle 5 sind die Mittelwerte, Mediane und niedrigsten sowie höchsten Indices aufgelistet. In Gewebeproben von spinalen Tumoren lag der Mittelwert des Proliferationsindex für MIB-1 bei 7,5 % ($\pm 13,5$ %) und im Median bei 5 %, wobei in vereinzelt Geweben 80 % der Zellkerne gefärbt waren, während in anderen Gewebeproben alle Zellkerne negativ waren. Ein niedrigerer Index für MIB-1 wurde in kranialen Metastasen beobachtet, mit einem Mittelwert von 2,0 % ($\pm 3,3$ %), einem Median von 0 % und einem maximalen Anteil von 15 %. Ein vergleichbares Bild zeigte sich für den Proliferationsindex von pHH3. Auch hier lag der Mittelwert in spinalen Metastasen höher als in kranialen (7,1 % $\pm 10,3$ % im Vergleich zu 2,3 % $\pm 4,3$ %), mit einem Maximalwert von 65 % in spinalen Tumoren und 17 % in kranialen Tumoren. Für alle Proben ergab sich insgesamt ein Proliferationsindex von 5,4 % ($\pm 11,1$ %) für MIB-1 und 5,3 % ($\pm 8,8$ %) für pHH3.

Tabelle 5 Indices der Proliferationsmarker MIB-1 und pHH3 in spinalen und kranialen Metastasen des Nierenzellkarzinoms

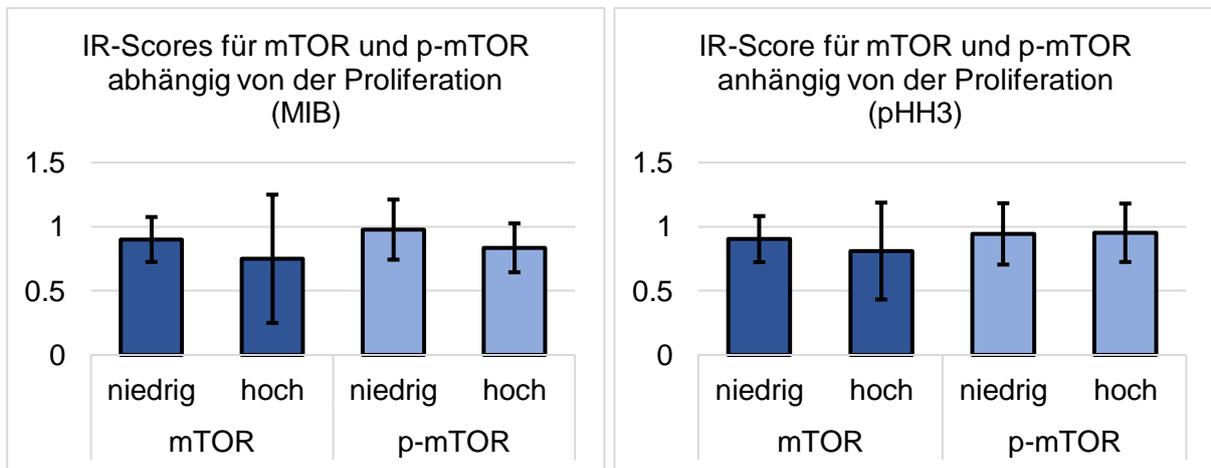
		Spinale Metastasen	Kraniale Metastasen
	MIB-1		
	Mittelwert gesamt, % (\pm SD): 5,4 (11,1)		
Mittelwert, % (\pm SD)		7,5 (13,5)	2,0 (3,3)
Minimum, %		0	0
Maximum, %		80,0	15,0
Median, %		5,0	0
	pHH3		
	Mittelwert gesamt, % (\pm SD): 5,3 (8,8)		
Mittelwert (\pm SD)		7,1 (10,3)	2,3 (4,3)
Minimum, %		0	0
Maximum, %		65,0	17,0
Median, %		5,0	0

Abbildung 17 zeigt den Vergleich der Proteinexpression von mTOR und der mTOR-Effektorproteine (IR-Scores) anhand der Proliferationsrate. Hierfür wurden die Patienten anhand des Mittelwerts des MIB-Scores bzw. des pHH3-Scores in zwei Gruppen eingeteilt, solche mit einer niedrigen Proliferationsrate (kleiner oder gleich dem Mittelwert für MIB bzw. pHH3) und solche mit einer hohen Proliferationsrate (MIB bzw. pHH3 über dem Mittelwert). Basierend auf pHH3 gab es keine signifikanten Unterschiede in den IR-Scores bezüglich der Proliferationsrate. Die Expression von phosphoryliertem 4E-BP1 war signifikant höher in Geweben von Patienten mit einem niedrigen MIB-Index ($p < 0,05$). Die IR-Scores aller anderen Proteine unterschieden sich nicht signifikant zwischen beiden Gruppen.

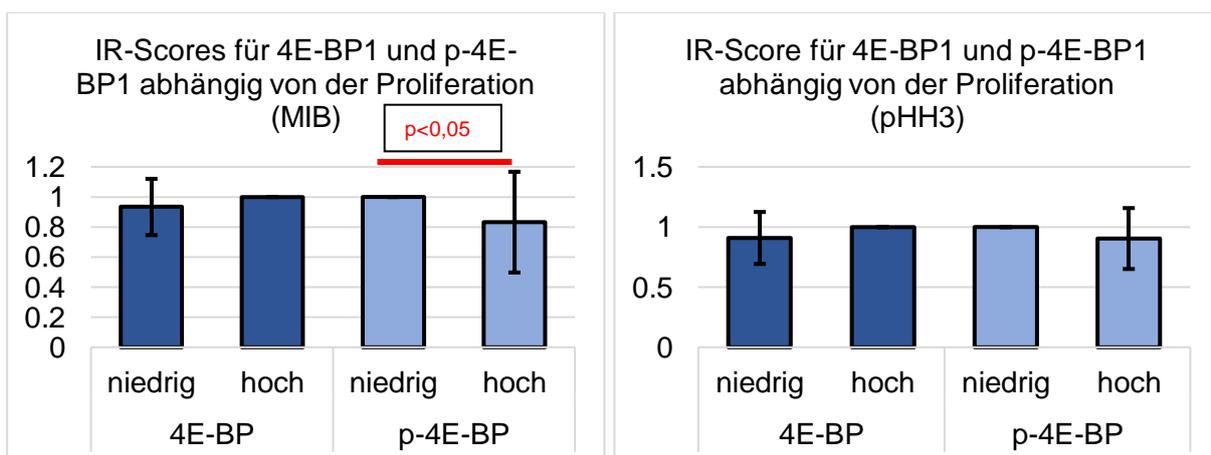
(A)



(B)



(C)



(D)

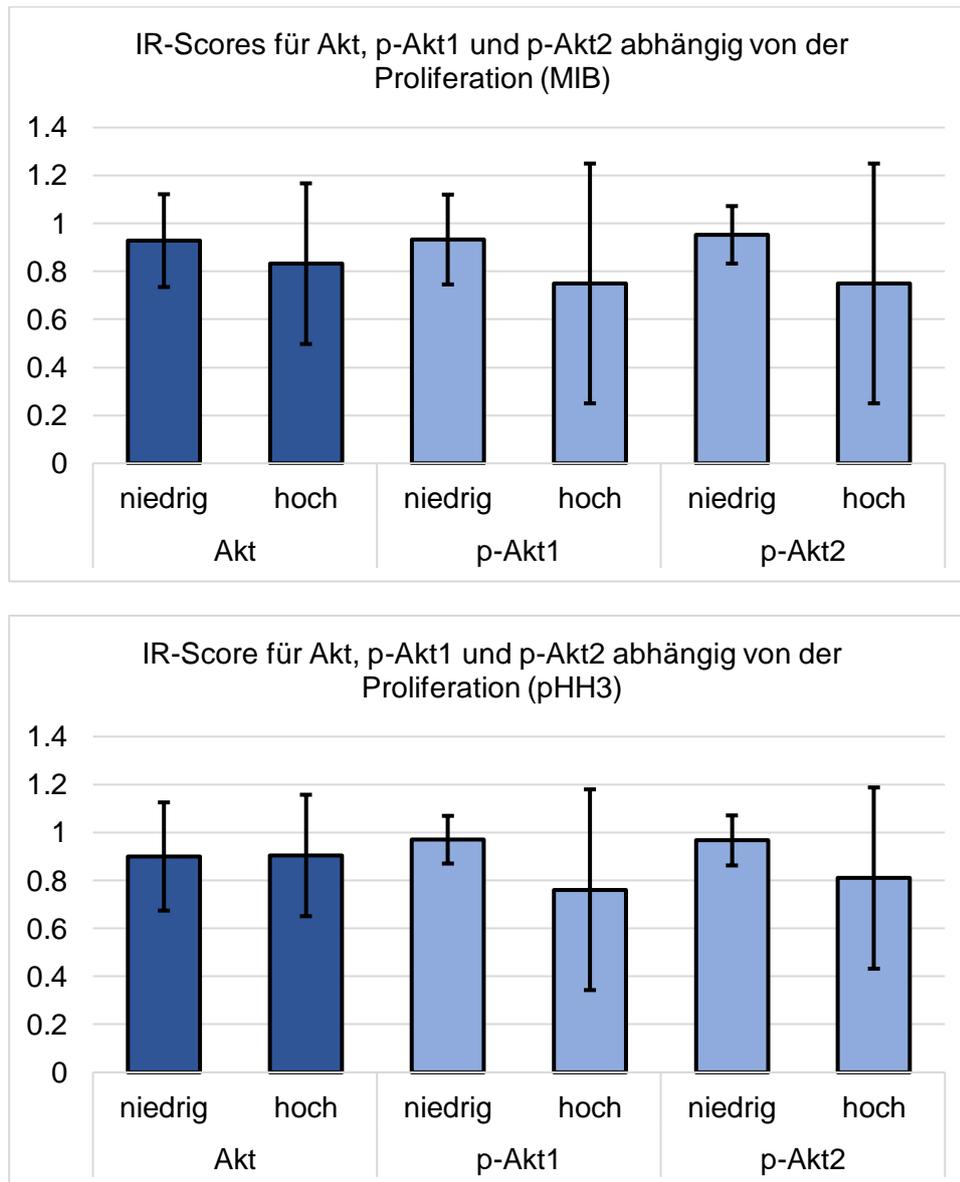


Abbildung 17 IR-Scores für p70S6K und p-p70S6K (A), mTOR und p-mTOR (B), 4E-BP1 und p-4E-BP1 (C) und Akt, p-Akt1 und p-Akt2 (D) in Geweben von Patienten mit einer niedrigen oder hohen Proliferationsrate (MIB und pHH3-Scores).

3.4 Wirkung von AZD8055 auf Nierenzellkarzinom-Linien

Die obigen immunhistochemischen Studien konnten meist keine deutlichen Bezüge von Patientenparametern / klinischen Parametern zu mTOR und seinen assoziierten Proteinen herstellen. Dies betraf auch die phosphorylierten Formen dieser Proteine und insbesondere auch p-p70S6K, dessen Auftreten als klassischer Indikator für die

Aktivität des Komplexes mTORC1 betrachtet wird. Während es also keine klaren Indizien für eine nach diesen Patientengruppen differenzierte Aktivierung von mTOR-Signalwegen gab, so zeigten die obigen Resultate doch, dass mTOR-Signalwege in allen Nierenzellkarzinomen eine Rolle spielen. Besonders auch, weil p-p70S6K grundsätzlich nachgewiesen wurde. Daher stellt sich die Frage nach der möglichen Relevanz einer Hemmung beider mTOR-Komplexe durch einen dualen, ATP-kompetitiven Inhibitor (wie AZD8055) beim Nierenzellkarzinom.

Daher wurden im Folgenden einige diesbezügliche Versuche in vitro durchgeführt.

In **Abbildung 18** sind Photographien der Caki-1-Zellen nach der Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor AZD8055 in verschiedenen Konzentrationen gezeigt. Es ist ersichtlich, dass mit zunehmender Konzentration weniger Zellkolonien gebildet wurden. Während die Koloniebildung sich bei niedriger Konzentration von AZD8055 (20 nM) nicht

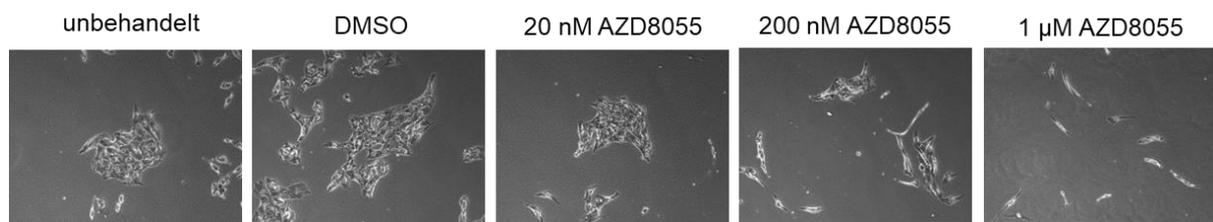


Abbildung 18 Koloniebildung von Caki-1-Zellen nach Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor AZD8055 – Beispielhafte Aufnahmen der Zellen am Ende der Behandlung

signifikant von der der DMSO-behandelten Zellen unterschied, zeigten solche Zellen, die mit 200 nM AZD8055 behandelt worden waren, eine signifikant niedrige Koloniegröße (**Abbildung 19**).

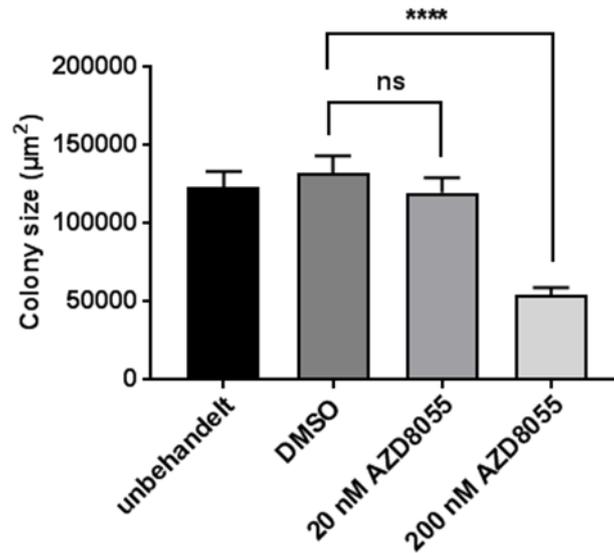


Abbildung 19 Koloniegröße von Caki-1-Zellen nach Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor AZD8055 – Statistische Auswertung der Koloniegröße von 30 Kolonien pro Bedingung nach der Behandlung

Im BrdU-Assay zeigten sich hingegen keine Unterschiede in der Proliferation abhängig von der AZD8055-Konzentration, weder bei Caki1-Zellen noch bei Caki-2-Zellen (**Abbildungen 20 und 21**).

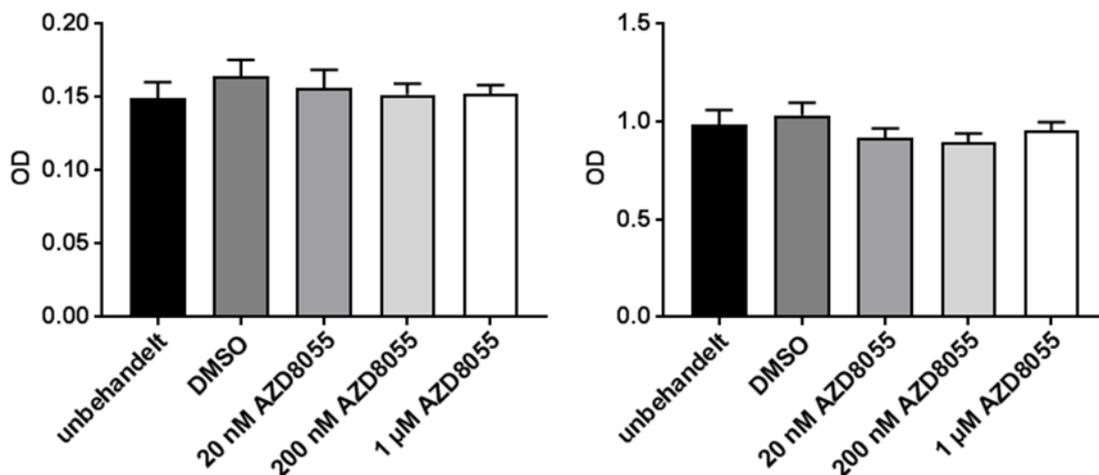


Abbildung 20 BrdU-Assay von Caki-1-Zellen nach Behandlung der Zellen mit dem mTOR-Inhibitor AZD8055 für 24 Stunden (links) und 48 Stunden (rechts). Zehn Messwerte pro Bedingung ± SEM

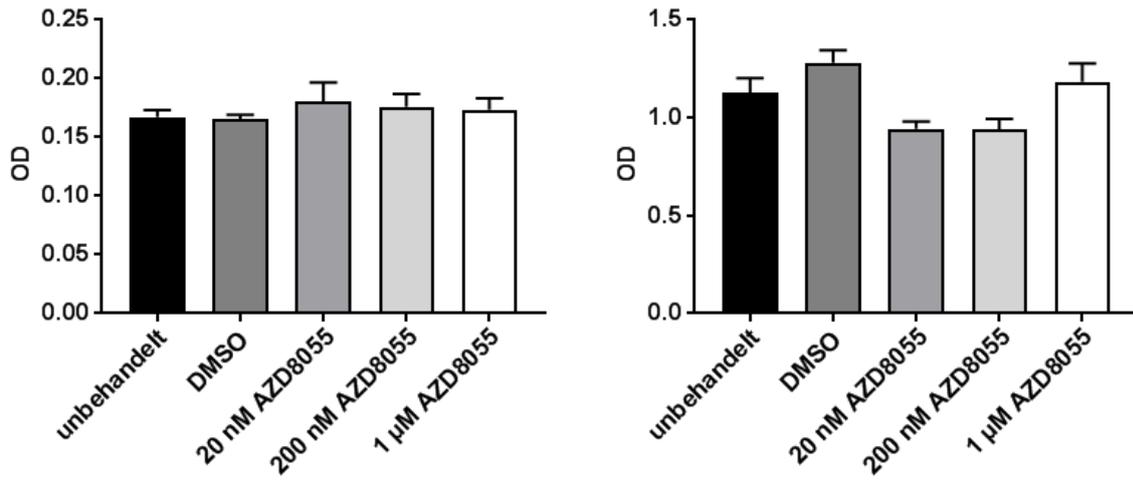


Abbildung 21 BrdU-Assay von Caki-2-Zellen nach Behandlung der Zellen mit dem mTOR-Inhibitor AZD8055 für 24 Stunden (links) und 48 Stunden (rechts). Zehn Messwerte pro Bedingung \pm SEM

4 Diskussion

Das metastatische, klarzellige Nierenzellkarzinom ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert und stellt eine Herausforderung für die onkologische Therapie dar. Die Identifikation von Zielproteinen, die den Fokus von möglichen Behandlungsansätzen darstellen könnten, ist von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Therapie und Prognose von Patienten mit einem solchen fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom. Solche Zielproteine sind mTOR und mit dem mTOR-Signalweg assoziierte Proteine – die Expression dieser Proteine in Nierenzelltumoren sowie ihre Korrelation mit der Prognose der Patienten konnten in vorherigen Studien demonstriert werden. Es ist jedoch noch unklar, inwiefern diese Proteine in Nierenzellkarzinometastasen des zentralen Nervensystems exprimiert sind, ob sie in aktiver, also phosphorylierter Form vorliegen und ob es Unterschiede in ihrer Expression abhängig von der Lokalisation der Metastasen gibt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Zusammenhänge in Gewebeproben von insgesamt 28 Patienten mit Nierenzellkarzinometastasen des zentralen Nervensystems anhand immunhistochemischer Untersuchungen zu analysieren.

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob mTOR und mTOR-assoziierte Proteine in den Geweben exprimiert und anhand immunhistochemischer Färbungen nachzuweisen sind. Es wurde für jedes Protein sowohl ein Antikörper gegen das Gesamtprotein als auch einer gegen das phosphorylierte Protein eingesetzt, um festzustellen, ob die Proteine auch in aktivierter Form in den Geweben vorliegen. Es konnte von allen untersuchten Proteinen (p70S6K, p-p70S6K, mTOR, p-mTOR, 4E-BP1, p-4E-BP1, Akt, p-Akt1, p-Akt2) sowohl das Gesamtprotein als auch das phosphorylierte Protein detektiert werden, d. h., es waren alle Proteine in den Geweben exprimiert und lagen auch in ihrer aktiven Form vor. mTOR-Komplexe (zumindest Komplex 1) wirken anscheinend gleichsinnig auf ihre downstream-Targets p70S6K und 4E-BP1 (Phosphorylierung). Dies führt bei p70S6K zu einer Aktivierung und bei 4E-BP1 zu einer funktionellen Inaktivierung (**Abbildungen 6–9**). Der IR-Score lag allerdings für alle Proteine etwa bei 1, d. h., die Expression der Proteine war insgesamt schwach. Es gab hierbei keine Unterschiede zwischen der Intensität der Expression des Gesamtproteins und des phosphorylierten Proteins, d.h. der Anteil des inaktiven und aktiven Proteins war ausgeglichen. Ein Vergleich von kranialen mit spinalen Metastasen ergab keine signifikanten Unterschiede in der Expression der

untersuchten Proteine zwischen beiden Lokalisationen (**Abbildung 13**), d. h., sowohl kraniale als auch spinale Nierenzellkarzinommetastasen zeigen eine vergleichbar schwache Expression von mTOR und mTOR-assoziierten Proteinen, die alle auch in ihrer phosphorylierten, aktiven Form vorliegen.

Es wurde zusätzlich untersucht, ob die Proliferationsrate der Tumoren einen Einfluss auf die Expression und Aktivität von mTOR und seinen Effektorproteinen hat. Hierfür wurden zwei Proliferationsindices (MIB und pHH3) analysiert und die Proteinexpression in Geweben mit einer niedrigen und Geweben mit einer hohen Proliferation verglichen (**Abbildung 17**). Lediglich die Expression von einem Protein, dem phosphoryliertem 4E-BP1, zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit dem MIB-Index. Die p-4EBP1 war bei einem hohem MIB-Index niedriger. Dies könnte man so interpretieren, dass 4EBP1 hier weniger gehemmt war. Dieser Zusammenhang war nicht signifikant für den pHH3-Index. Für alle anderen Proteine konnte kein Einfluss der Proliferationsrate auf die Expression der untersuchten Proteine festgestellt werden.

Andere Parameter, welche die Expression von mTOR und seinen Effektorproteinen beeinflussen könnten, sind das Alter und Geschlecht der Patienten sowie eine vorherige Nephrektomie. Um diese Zusammenhänge zu untersuchen, wurden die Patienten anhand dieser qualitativen Variablen gruppiert und die Proteinexpression in den Gruppen analysiert. Es gab nur wenige signifikante Zusammenhänge zwischen diesen Variablen und der Expression von mTOR und seinen Effektorproteinen. Lediglich mTOR und 4E-BP1 waren marginal signifikant höher in männlichen Patienten exprimiert als in weiblichen (**Abbildungen 12B und C**). Das Alter hatte bei einer Gruppeneinteilung kleiner/größer als der Mittelwert keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinexpression. Gewebe von Patienten mit einer Nephrektomie zeigten leicht signifikant höhere IR-Scores für 4E-BP1 als in Geweben von Patienten ohne Nephrektomie, während mTOR in letzteren höher exprimiert war als nach einer Nephrektomie. Beide Zusammenhänge waren nur schwach ausgeprägt und alle anderen Proteine zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede abhängig von einer Nierenresektion.

Es stellt sich die Frage, warum die Expression aller Proteine in den untersuchten Geweben vergleichsweise schwach war. Es gab nur sehr vereinzelt IR-Scores größer

als 1. Diese Werte sind allerdings in Übereinstimmung mit der Studie von Rausch et al., bei der ebenfalls eine immunhistochemische Bewertung von Nierenzellkarzinometastasen durchgeführt und ein durchschnittlicher IR-Score von 1,44 für mTOR und 1,14 für p-mTOR festgestellt wurde (130). In dieser Studie wurde allerdings die Expression mit der im Primärtumor und in benignem Tumorgewebe verglichen, und während die Expression in metastatischem Gewebe mit der in benignem Gewebe vergleichbar war, lag die Expression im Primärtumor nur bei 0,78 für mTOR und bei 0,73 für p-mTOR und war somit signifikant niedriger als in benignen Geweben und Metastasen. Ein solcher Vergleich war in der vorliegenden Untersuchung nicht möglich, da kein benignes Kontrollgewebe oder Primärtumorgewebe zur Verfügung stand. Es wurde daher innerhalb der metastatischen Gewebe eine Unterteilung anhand der Lokalisation vorgenommen. Die Studie von Rausch et al. schloss allerdings keine Tumorlokalisierung des zentralen Nervensystems mit ein, was eine direkte Vergleichbarkeit erschwert (130). Aufgrund diverser methodischer Unterschiede können solche Vergleiche von semiquantitativen Immunstudien jedoch als problematisch angesehen werden. Durch die Verwendung des Tissue Microarrays in der vorliegenden Studie konnte eine gleichmäßigere und damit besser vergleichbare Färbung gewährleistet werden.

Eine erhöhte Expression von mTOR und seinen Effektorproteinen in Metastasen des Nierenzellkarzinoms konnte in vorherigen Studien demonstriert werden. Lin et al. fanden in ihren immunhistochemischen und Western-Blotting-Untersuchungen eine signifikant höhere Expression von p-mTOR, p-p70S6K, und p-Akt in metastatischem Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Nierengewebe (131). Die Lokalisation der Metastasen wurde allerdings nicht näher spezifiziert und es ist daher unklar, ob hier auch Metastasen des zentralen Nervensystems miteingeschlossen wurden. Youssif et al. konnten ebenfalls in immunhistochemischen Analysen von 132 Gewebeproben eine hohe Expression von p-mTOR, p-Akt, PI3K und p70S6K in Nierenzellkarzinometastasen feststellen, und diese Expression war signifikant höher im Vergleich zu nicht-neoplastischen Kontrollgeweben (132). Von den 132 untersuchten Metastasen waren 21 Hirnmetastasen, und eine differenzierte Betrachtung der Färbintensität in den verschiedenen Metastasen zeigte, dass insbesondere PI3K, mTOR und pAkt in diesen Metastasen hoch (Färbescore = 2) exprimiert waren. Diese Ergebnisse konnten in den Studien von Hager et al. bestätigt

werden, in denen ebenfalls immunhistochemisch die Expression von p-Akt, p-mTOR, pS6 und PTEN in Gewebeproben von primären Nierenzellkarzinomen und Metastasen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Geweben untersucht wurden und in den metastatischen Geweben eine signifikant erhöhte Expression dieser Proteine beobachtet werden konnte (133).

Liontos et al. untersuchten immunhistochemisch die Expression von p-Akt, p-mTOR, p-4E-BP1, p-p70S6K und VEGF in Gewebeproben von Patienten mit einem metastatischen Nierenzellkarzinom, die mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib therapiert worden waren (134). Sie fanden eine Expression dieser Proteine in nahezu allen untersuchten Geweben, jedoch wurde nur die Anzahl der Metastasen pro Patient erfasst, die Lokalisation der Metastasen aber nicht genauer spezifiziert.

Die Expression und Aktivierung von mTOR und seiner Effektorproteine in Metastasen des Nierenzellkarzinoms sind insbesondere relevant für die Responsivität dieser Tumoren auf eine pharmakologische Therapie. In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse des in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Koloniebildungsassays relevant, da hier anhand der Behandlung von Nierenzellkarzinomzellen, die aus humanen Metastasen stammen, gezeigt werden konnte, dass ein mTOR-Inhibitor das Größenwachstum bzw. die Flächenausdehnung von Kolonien inhibieren konnte. Durch eine duale Hemmung beider mTOR-Komplexe, besonders aber durch die Hemmung von mTORC1, kam es zu einem verringerten Flächenwachstum der Zellkolonien, weil mTOR-Komplexe z.B. über die Proteinbiosynthese die Zellgröße steuern können. Es könnte also sein, dass die durch AZD8055 bewirkte Reduktion der Koloniegröße eine moderat reduzierte Zellgröße widerspiegelt. Es ist derzeit noch nicht genau bekannt, welche Expressionsmuster zu einem Ansprechen auf eine solche Therapie verhelfen und welche die Responsivität mindern. Beispielweise zeigen Patienten mit einer hohen Expression von VEGF ein besseres Ansprechen auf Sunitinib (135), während eine andere Studie das Verhältnis aus einer hohen p-mTOR-Expression und einer niedrigen VEGF-Expression für ein solches Ansprechen fand (134). Li et al. analysierten in einer Pilotstudie den Zusammenhang zwischen der Expression von p-Akt, p-mTOR, p-4E-BP1, und p-S6RP und der Wirksamkeit des Rapalogs Everolimus in Patienten mit metastatischen Nierenzellkarzinomen. Sie fanden, dass bei Patienten mit Tumorgeweben, die immunhistochemisch positiv für p-mTOR and p-S6RP waren, das Rapalog effektiver bezüglich des progressionsfreien

Überlebens und der klinischen Benefits war (136). Panuck et al. untersuchten die Proteine des mTOR-Signalwegs in Gewebe von Patienten mit einem Nierenzellkarzinom nach einer Nephrektomie und fanden, dass sich sowohl p-Akt als auch p-S6 als prognostische Marker für pathologische Parameter und das Überleben eignen, dass jedoch die untersuchten Nierenzellkarzinome in ihrer Responsivität auf eine Rapalogtherapie unterscheiden (121).

Insgesamt lässt sich sagen, dass kaum signifikante Unterschiede in der Expression der untersuchten Proteine festgestellt werden konnten. Auch die wenigen Beobachtungen, die statistisch signifikant waren, erreichten die Signifikanz nur marginal (immer $p < 0,05$). Eine mögliche Erklärung könnte die ausschließliche Untersuchung anhand der Immunhistochemie sein. Diese Methode bietet einerseits die Vorteile, dass sie vergleichsweise einfach eine retrospektive Analyse von archiviertem Tumorgewebe erlaubt und durch den Einsatz verschiedener Antikörper sowohl das Gesamtprotein als auch das phosphorylierte Protein von mTOR und seinen Effektorproteinen detektiert werden können (137). Jedoch ist diese Methode dadurch limitiert, dass sie nur einen Teil des Tumors betrachtet und die Evaluierung der immunhistochemischen Färbung und die Einteilung in die IR-Scores mit einer gewissen Subjektivität des Betrachters behaftet sind. Wenn möglich, sollten immunhistochemische Ergebnisse daher mit zusätzlichen Methoden bestätigt werden. Es stand für die vorliegende Studie leider nur von drei Patienten genug Probenmaterial zur Verfügung, um die Proteinexpression in Western Blots zu demonstrieren (**Abbildung 16**). Es konnte allerdings eine starke Expression von AMPK α , p70S6K, Akt und 4E-BP1 und ihrer phosphorylierten Formen in diesen drei kranialen Metastasen demonstriert werden, d. h., diese Methode könnte bei ausreichend vorhandenem Probenmaterial eine geeignetere Expressionsanalyse liefern als die Immunhistochemie.

Die vorliegende Studie hat einige Limitierungen, die möglicherweise zu den bestenfalls marginal signifikanten Ergebnissen beigetragen haben könnten. Eine eindeutige Limitation ist das Fehlen einer nicht-neoplastischen Gewebekontrolle bzw. Primärtumorgewebe, welche leider für diese Untersuchungen nicht zur Verfügung standen. Es konnten somit nur innerhalb der Metastasen des zentralen Nervensystems Subgruppen gebildet werden, die Expression von mTOR und seinen Effektorproteinen konnte jedoch nicht mit anderen Metastasen oder gesundem

Gewebe verglichen werden, d. h., die Ergebnisse erlauben keine Aussage darüber, ob diese Proteine in den Metastasen des zentralen Nervensystems überexprimiert sind. Durch die Untersuchung sowohl des Gesamtproteins als auch des phosphorylierten Proteins konnte aber zumindest gezeigt werden, dass die Proteine alle auch in ihrer aktivierten Form in den Metastasen vorliegen. Eine weitere Limitation ist die vergleichsweise geringe Patientenzahl, die für die immunhistochemische Untersuchung zur Verfügung stand. Nach der Einteilung in Subgruppen verblieben dadurch in jeder Gruppe teilweise weniger als 10 Patienten, wodurch auch der Mangel einer statistischen Signifikanz in den meisten Fällen erklärt werden könnte. Zudem handelte es sich um eine retrospektive Analyse von archiviertem Patientenmaterial. Derartige rückblickende Studien sind *per se* mit einigen Limitationen behaftet. Zum einen besteht das Risiko eines gewissen Selektionsbias, da letztendlich eine gewisse Voreingenommenheit oder eine Fehlklassifizierung bei der Patientenauswahl nicht auszuschließen ist. Das Ableiten einer direkten Kausalität aus einer derartigen Studie ist nur begrenzt möglich, das Evidenzniveau ist im Vergleich zu einer prospektiven Studie als schwächer einzustufen.

Zusammenfassend lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen folgende Schlussfolgerung ziehen: mTOR, p70S6K, 4E-BP1 und Akt sind in kranialen und spinalen Metastasen des Nierenzellkarzinoms exprimiert und liegen auch in ihrer regulierten, phosphorylierten Form vor. Die Expression aller Proteine ist vergleichsweise niedrig und unterscheidet sich insgesamt nicht signifikant zwischen kranialen und spinalen Metastasen, zwischen Patienten mit und ohne eine Nephrektomie, zwischen Männern und Frauen und zwischen älteren und jüngeren Patienten. Ebenso wird die Expression anscheinend nicht von der Proliferationsrate des Tumors beeinflusst.

Zukünftige Studien sollten eine größere Patientenkohorte und Kontrollgruppen mit nicht-neoplastischem Nierengewebe und Primärtumoren miteinschließen, um die Stärke der Expression von mTOR und seinen Effektorproteinen in kranialen und spinalen Metastasen des Nierenzellkarzinoms ins Verhältnis zu setzen.

Literaturverzeichnis

1. RKI. Krebs in Deutschland für 2013/2014. Berlin: RKI; 2017.
2. Fiebig J. Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms in Deutschland. *Der Onkologe*. 2019;25:483–7.
3. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2005;353(23):2477–90.
4. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):93–105.
5. Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Epstein JI, Grignon D et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(10):1469–89.
6. Bergmann L, Bokemeyer C, Casper J, Gailer T, Grünwald V, Kirchner HH, Kuczyk MA, Overkamp F, Peters I, Schmidinger M, Stenner-Liewen F. Leitlinie Nierenzellkarzinom (Hypernephrom) *Onkopedia* [Internet]. 2019.
7. Kuroda N, Toi M, Hiroi M, Enzan H. Review of papillary renal cell carcinoma with focus on clinical and pathobiological aspects. *Histol Histopathol*. 2003;18(2):487–94.
8. Akhtar M, Al-Bozom IA, Al Hussain T. Papillary Renal Cell Carcinoma (PRCC): An Update. *Adv Anat Pathol*. 2019;26(2):124–32.
9. Ljungberg B, Bensalah K, Bex A, Giles RH, Hora M, Kuczyk MA, Lam T, Marconi L, Merseburger AS, Powles T, Staehler M, Volpe A, Dabestani S, Fernández-Pello Montes S, Hofmann F, Tahbaz R. EAU guidelines on renal cell carcinoma 2017 [Available from: <https://uroweb.org/wp-content/uploads/RCC-2017-pocket.pdf>].
10. Ohh M, Takagi Y, Aso T, Stebbins CE, Pavletich NP, Zbar B et al. Synthetic peptides define critical contacts between elongin C, elongin B, and the von Hippel-Lindau protein. *J Clin Invest*. 1999;104(11):1583–91.
11. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*. 2000;2(7):423–7.
12. Kumar A, Kumari N, Gupta V, Prasad R. Renal Cell Carcinoma: Molecular Aspects. *Indian J Clin Biochem*. 2018;33(3):246–54.

13. Mikhailenko DS, Zhinzhilo TA, Kolpakov AV, Kekeeva TV, Strel'nikov VV, Nemtsova MV et al. Specific Localization of Missense Mutations in the VHL Gene in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Bull Exp Biol Med.* 2017;163(4):465–8.
14. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999;399(6733):271–5.
15. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE.* 2007;2007(407):cm8.
16. Schodel J, Grampp S, Maher ER, Moch H, Ratcliffe PJ, Russo P et al. Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer. *Eur Urol.* 2016;69(4):646–57.
17. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M et al. Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17009.
18. Wei EY, Hsieh JJ. A river model to map convergent cancer evolution and guide therapy in RCC. *Nat Rev Urol.* 2015;12(12):706–12.
19. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland: Niere C64 2017 [updated 06.12.2017. Available from: <https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Nierenkrebs/nierenkrebs.html>.
20. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol.* 2010;7(5):245–57.
21. Gelfond J, Al-Bayati O, Kabra A, Iffrig K, Kaushik D, Liss MA. Modifiable risk factors to reduce renal cell carcinoma incidence: Insight from the PLCO trial. *Urol Oncol.* 2018;36(7):340.e1–e6.
22. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol.* 2019;75(1):74–84.
23. Sharifi N, Farrar WL. Perturbations in hypoxia detection: a shared link between hereditary and sporadic tumor formation? *Med Hypotheses.* 2006;66(4):732–5.
24. Clague J, Shao L, Lin J, Chang S, Zhu Y, Wang W et al. Sensitivity to NNKOAc is associated with renal cancer risk. *Carcinogenesis.* 2009;30(4):706–10.
25. Zhu Y, Horikawa Y, Yang H, Wood CG, Habuchi T, Wu X. BPDE induced lymphocytic chromosome 3p deletions may predict renal cell carcinoma risk. *J Urol.* 2008;179(6):2416–21.

26. Hunt JD, Van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*. 2005;114(1):101–8.
27. Wang F, Xu Y. Body mass index and risk of renal cell cancer: a dose-response meta-analysis of published cohort studies. *Int J Cancer*. 2014;135(7):1673–86.
28. Macleod LC, Hotaling JM, Wright JL, Davenport MT, Gore JL, Harper J et al. Risk factors for renal cell carcinoma in the VITAL study. *J Urol*. 2013;190(5):1657–61.
29. Albiges L, Hakimi AA, Xie W, McKay RR, Simantov R, Lin X et al. Body Mass Index and Metastatic Renal Cell Carcinoma: Clinical and Biological Correlations. *J Clin Oncol*. 2016;34(30):3655–63.
30. Donin NM, Pantuck A, Klopfer P, Bevan P, Fall B, Said J et al. Body Mass Index and Survival in a Prospective Randomized Trial of Localized High-Risk Renal Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(9):1326–32.
31. Bagheri M, Speakman JR, Shemirani F, Djafarian K. Renal cell carcinoma survival and body mass index: a dose-response meta-analysis reveals another potential paradox within a paradox. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(12):1817–22.
32. Shen T, Shu XO, Xiang YB, Li HL, Cai H, Gao YT et al. Association of hypertension and obesity with renal cell carcinoma risk: a report from the Shanghai Men's and Women's Health Studies. *Cancer Causes Control*. 2015;26(8):1173–80.
33. Beebe-Dimmer JL, Colt JS, Ruterbusch JJ, Keele GR, Purdue MP, Wacholder S et al. Body mass index and renal cell cancer: the influence of race and sex. *Epidemiology*. 2012;23(6):821–8.
34. Klinghoffer Z, Yang B, Kapoor A, Pinthus JH. Obesity and renal cell carcinoma: epidemiology, underlying mechanisms and management considerations. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009;9(7):975–87.
35. Johansson M, Carreras-Torres R, Scelo G, Purdue MP, Mariosa D, Muller DC et al. The influence of obesity-related factors in the etiology of renal cell carcinoma-A mendelian randomization study. *PLoS Med*. 2019;16(1):e1002724.
36. Lee JE, Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Albanes D, Bernstein L et al. Alcohol intake and renal cell cancer in a pooled analysis of 12 prospective studies. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(10):801–10.
37. Karami S, Daugherty SE, Purdue MP. A prospective study of alcohol consumption and renal cell carcinoma risk. *Int J Cancer*. 2015;137(1):238–42.

38. Antwi SO, Eckel-Passow JE, Diehl ND, Serie DJ, Custer KM, Wu KJ et al. Alcohol consumption, variability in alcohol dehydrogenase genes and risk of renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2018;142(4):747–56.
39. Wozniak MB, Brennan P, Brenner DR, Overvad K, Olsen A, Tjonneland A et al. Alcohol consumption and the risk of renal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2015;137(8):1953–66.
40. Christakoudi S, Kakourou A, Markozannes G, Tzoulaki I, Weiderpass E, Brennan P et al. Blood pressure and risk of cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2019.
41. Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF, Jr., Jarvholm B. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med*. 2000;343(18):1305–11.
42. Gago-Dominguez M, Castelao JE, Yuan JM, Ross RK, Yu MC. Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States). *Cancer Causes Control*. 2002;13(3):287–93.
43. Gago-Dominguez M, Castelao JE. Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(4):721–33.
44. Mondul AM, Weinstein SJ, Moy KA, Mannisto S, Albanes D. Vitamin D-binding protein, circulating vitamin D and risk of renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2014;134(11):2699–706.
45. Mondul AM, Weinstein SJ, Parisi D, Um CY, McCullough ML, Albanes D. Vitamin D-Binding Protein and Risk of Renal Cell Carcinoma in the Cancer Prevention Study-II Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27(10):1203–7.
46. Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Behind the scenes of vitamin D binding protein: more than vitamin D binding. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(5):773–86.
47. Grzegorzewska AE, Ostromecki G, Mostowska A, Sowinska A, Jagodzinski PP. Clinical aspects of vitamin D-binding protein gene polymorphisms in hemodialysis patients. *Pol Arch Med Wewn*. 2015;125(1-2):8–17.
48. Lee JH, Kim I, Seok H, Park I, Hwang J, Park JO et al. Case report of renal cell carcinoma in automobile manufacturing factory worker due to trichloroethylene exposure in Korea. *Ann Occup Environ Med*. 2015;27:19.
49. Bruning T, Pesch B, Wiesenhutter B, Rabstein S, Lammert M, Baumuller A et al. Renal cell cancer risk and occupational exposure to trichloroethylene: results of a

- consecutive case-control study in Arnsberg, Germany. *Am J Ind Med.* 2003;43(3):274–85.
50. Brauch H, Weirich G, Hornauer MA, Storkel S, Wohl T, Bruning T. Trichloroethylene exposure and specific somatic mutations in patients with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(10):854–61.
51. Brauch H, Weirich G, Klein B, Rabstein S, Bolt HM, Bruning T. VHL mutations in renal cell cancer: does occupational exposure to trichloroethylene make a difference? *Toxicol Lett.* 2004;151(1):301–10.
52. Mandel JS, McLaughlin JK, Schlehofer B, Møller A, Helmer U, Lindblad P et al. International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *Int J Cancer.* 1995;61(5):601–5.
53. Mattioli S, Truffelli D, Baldasseroni A, Risi A, Marchesini B, Giacomini C et al. Occupational risk factors for renal cell cancer: a case--control study in northern Italy. *J Occup Environ Med.* 2002;44(11):1028–36.
54. Talamini R, Baron AE, Barra S, Bidoli E, La Vecchia C, Negri E et al. A case-control study of risk factor for renal cell cancer in northern Italy. *Cancer Causes Control.* 1990;1(2):125–31.
55. Parent ME, Hua Y, Siemiatycki J. Occupational risk factors for renal cell carcinoma in Montreal. *Am J Ind Med.* 2000;38(6):609–18.
56. Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, Bensalah K, Dabestani S, Fernandez-Pello S et al. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. *Eur Urol.* 2019;75(5):799–810.
57. Bedke J, Buse S, Kuroschi M, Haferkamp A, Jäger D, Hohenfellner M. [Paraneoplastic syndrome in renal cell carcinoma]. *Urologe A.* 2007;46(1):45–8.
58. Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guille F, Lobel B. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2003;44(2):226–32.
59. Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urol Oncol.* 2002;7(4):135–40.
60. Kirchner FK, Jr., Braren V, Smith C, Wilson JP, Foster JH, Hollifield JW et al. Renal carcinoma discovered incidentally by arteriography during evaluation for hypertension. *J Urol.* 1976;115(6):643–5.
61. Ding GX, Feng CC, Song NH, Fang ZJ, Xia GW, Jiang HW et al. Paraneoplastic symptoms: cachexia, polycythemia, and hypercalcemia are, respectively, related to

- vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in renal clear cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2013;31(8):1820–5.
62. Wiesener MS, Munchenhagen P, Glaser M, Sobottka BA, Knaup KX, Jozefowski K et al. Erythropoietin gene expression in renal carcinoma is considerably more frequent than paraneoplastic polycythemia. *Int J Cancer*. 2007;121(11):2434–42.
63. Bientinesi R, Foschi N, Gandi C, D'Agostino D, Pierconti F, Bassi PF et al. Paraneoplastic Hyperinsulinism due to Renal Cell Carcinoma Treated With Robotic Nephrectomy. *Clin Genitourin Cancer*. 2016;14(1):e107–9.
64. Hotakainen K, Ljungberg B, Haglund C, Nordling S, Paju A, Stenman UH. Expression of the free beta-subunit of human chorionic gonadotropin in renal cell carcinoma: prognostic study on tissue and serum. *Int J Cancer*. 2003;104(5):631–5.
65. Stanisc TH, Donovan J. Prolactin secreting renal cell carcinoma. *J Urol*. 1986;136(1):85–6.
66. Laski ME, Vugrin D. Paraneoplastic syndromes in hypernephroma. *Semin Nephrol*. 1987;7(2):123–30.
67. Wu J, Zhang Y, Frilot N, Kim JI, Kim WJ, Daaka Y. Prostaglandin E2 regulates renal cell carcinoma invasion through the EP4 receptor-Rap GTPase signal transduction pathway. *J Biol Chem*. 2011;286(39):33954–62.
68. Papac RJ, Poo-Hwu WJ. Renal cell carcinoma: a paradigm of lanthanic disease. *Am J Clin Oncol*. 1999;22(3):223–31.
69. Jacobi GH, Abdelhamid S, Philipp T. [Stauffer syndrome, paraneoplastic hepatic dysfunction syndrome associated with renal cell carcinoma (author's transl)]. *Urologe A*. 1976;15(2):78–82.
70. Giannakos G, Papanicolaou X, Trafalis D, Michaelidis I, Margaritis G, Christofilakis C. Stauffer's syndrome variant associated with renal cell carcinoma. *Int J Urol*. 2005;12(8):757–9.
71. Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol*. 2015;67(5):913–24.
72. MacLennan S, Imamura M, Lapitan MC, Omar MI, Lam TB, Hilvano-Cabungcal AM et al. Systematic review of oncological outcomes following surgical management of localised renal cancer. *Eur Urol*. 2012;61(5):972–93.
73. Jonasch E, Gao J, Rathmell WK. Renal cell carcinoma. *Bmj*. 2014;349:g4797.
74. Capitanio U, Terrone C, Antonelli A, Minervini A, Volpe A, Furlan M et al. Nephron-sparing techniques independently decrease the risk of cardiovascular events

relative to radical nephrectomy in patients with a T1a-T1b renal mass and normal preoperative renal function. *Eur Urol.* 2015;67(4):683–9.

75. Alam R, Patel HD, Osumah T, Srivastava A, Gorin MA, Johnson MH et al. Comparative effectiveness of management options for patients with small renal masses: a prospective cohort study. *BJU Int.* 2019;123(1):42–50.

76. Sprenkle PC, Power N, Ghoneim T, Touijer KA, Dalbagni G, Russo P et al. Comparison of open and minimally invasive partial nephrectomy for renal tumors 4-7 centimeters. *Eur Urol.* 2012;61(3):593–9.

77. Badalato GM, Kates M, Wisnivesky JP, Choudhury AR, McKiernan JM. Survival after partial and radical nephrectomy for the treatment of stage T1bN0M0 renal cell carcinoma (RCC) in the USA: a propensity scoring approach. *BJU Int.* 2012;109(10):1457–62.

78. Marszalek M, Meixl H, Polajnar M, Rauchenwald M, Jeschke K, Madersbacher S. Laparoscopic and open partial nephrectomy: a matched-pair comparison of 200 patients. *Eur Urol.* 2009;55(5):1171–8.

79. Gill IS, Kavoussi LR, Lane BR, Blute ML, Babineau D, Colombo JR, Jr. et al. Comparison of 1,800 laparoscopic and open partial nephrectomies for single renal tumors. *J Urol.* 2007;178(1):41–6.

80. Jewett MA, Mattar K, Basiuk J, Morash CG, Pautler SE, Siemens DR et al. Active surveillance of small renal masses: progression patterns of early stage kidney cancer. *Eur Urol.* 2011;60(1):39–44.

81. Wagener N. [Renal cell carcinoma in older and geriatric patients]. *Urologe A.* 2017;56(8):1019–24.

82. Mir MC, Capitanio U, Bertolo R, Ouzaid I, Salagierski M, Kriegmair M et al. Role of Active Surveillance for Localized Small Renal Masses. *Eur Urol Oncol.* 2018;1(3):177–87.

83. Wendler JJ, Friebe B, Baumunk D, Blana A, Franiel T, Ganzer R et al. [Focal therapy for small renal masses : Observation, ablation or surgery]. *Urologe A.* 2016;55(5):594–606.

84. Wagstaff P, Ingels A, Zondervan P, De la Rosette JJ, Laguna MP. Thermal ablation in renal cell carcinoma management: a comprehensive review. *Curr Opin Urol.* 2014;24(5):474–82.

85. Curry D, Yassin M, Thwaini A, Pahuja A, Alanbuki AH, Rajan TN et al. Radiofrequency ablation of renal cell carcinoma: a follow up of outcomes. *Can J Urol.* 2014;21(1):7135–40.
86. Uhlig A, Hahn O, Strauss A, Lotz J, Trojan L, Muller-Wille R et al. Treatment for Localized T1a Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Survival Benefit for Cryosurgery and Thermal Ablation Compared to Deferred Therapy. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2018;41(2):277–83.
87. Tegos T, Tegos K, Dimitriadou A, Dimitriadis G. Current and emerging first-line systemic therapies in metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *J buon.* 2019;24(4):1340–53.
88. Pachella LA, Madsen LT, Dains JE. The Toxicity and Benefit of Various Dosing Strategies for Interleukin-2 in Metastatic Melanoma and Renal Cell Carcinoma. *J Adv Pract Oncol.* 2015;6(3):212–21.
89. Unverzagt S, Moldenhauer I, Nothacker M, Rossmeyssl D, Hadjinicolaou AV, Peinemann F et al. Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;5:Cd011673.
90. Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Aronson F, Margolin K, Louie A et al. Outpatient subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha for metastatic renal cell cancer: five-year follow-up of the Cytokine Working Group Study. *Cancer J Sci Am.* 1997;3(3):157–62.
91. Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard JY, Savary J, Chevreau C et al. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Francais d'Immunotherapie. N Engl J Med.* 1998;338(18):1272–8.
92. MacFarlane MP, Yang JC, Guleria AS, White RL, Jr., Seipp CA, Einhorn JH et al. The hematologic toxicity of interleukin-2 in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Cancer.* 1995;75(4):1030–7.
93. Sullivan RJ. Back to the Future: Rethinking and Retooling IL2 in the Immune Checkpoint Inhibitor Era. *Cancer Discov.* 2019;9(6):694–5.
94. Bentebibel SE, Hurwitz ME, Bernatchez C, Haymaker C, Hudgens CW, Kluger HM et al. A First-in-Human Study and Biomarker Analysis of NKTR-214, a Novel IL2Rbetagamma-Biased Cytokine, in Patients with Advanced or Metastatic Solid Tumors. *Cancer Discov.* 2019;9(6):711–21.

95. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*. 2007;12(1):9–22.
96. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*. 2007;25(6):903–15.
97. Kim DH, Sabatini DM. Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004;279:259–70.
98. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*. 2006;11(6):859–71.
99. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 2002;110(2):177–89.
100. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004;14(14):1296–302.
101. Pearce LR, Sommer EM, Sakamoto K, Wullschleger S, Alessi DR. Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *Biochem J*. 2011;436(1):169–79.
102. Liu P, Gan W, Chin YR, Ogura K, Guo J, Zhang J et al. PtdIns(3,4,5)P3-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discov*. 2015;5(11):1194–209.
103. Betz C, Hall MN. Where is mTOR and what is it doing there? *J Cell Biol*. 2013;203(4):563–74.
104. Ebner M, Sinkovics B, Szczygiel M, Ribeiro DW, Yudushkin I. Localization of mTORC2 activity inside cells. *J Cell Biol*. 2017;216(2):343–53.
105. Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*. 2007;9(3):316–23.
106. Huang B, Porter G. Expression of proline-rich Akt-substrate PRAS40 in cell survival pathway and carcinogenesis. *Acta Pharmacol Sin*. 2005;26(10):1253–8.
107. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*. 2002;4(9):648–57.

108. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(1):7–24.
109. Kim LC, Cook RS, Chen J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene*. 2017;36(16):2191–201.
110. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003;115(5):577–90.
111. Wang S, Tsun ZY, Wolfson RL, Shen K, Wyant GA, Plovianich ME et al. Metabolism. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science*. 2015;347(6218):188–94.
112. Lee M, Kim JH, Yoon I, Lee C, Fallahi Sichani M, Kang JS et al. Coordination of the leucine-sensing Rag GTPase cycle by leucyl-tRNA synthetase in the mTORC1 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(23):E5279–e88.
113. Stracka D, Jozefczuk S, Rudroff F, Sauer U, Hall MN. Nitrogen source activates TOR (target of rapamycin) complex 1 via glutamine and independently of Gtr/Rag proteins. *J Biol Chem*. 2014;289(36):25010–20.
114. Rosenwald IB, Kaspar R, Rousseau D, Gehrke L, Leboulch P, Chen JJ et al. Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem*. 1995;270(36):21176–80.
115. Yu Y, Sato JD. MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and p70 S6 kinase mediate the mitogenic response of human endothelial cells to vascular endothelial growth factor. *J Cell Physiol*. 1999;178(2):235–46.
116. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(5):307–18.
117. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*. 2011;144(5):757–68.
118. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014;505(7484):495–501.
119. Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, Chen WW, Ottina KA, Grabiner BC et al. A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science*. 2013;340(6136):1100–6.
120. Menon S, Manning BD. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*. 2008;27 Suppl 2:S43–51.

121. Pantuck AJ, Seligson DB, Klatter T, Yu H, Leppert JT, Moore L et al. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer*. 2007;109(11):2257–67.
122. Robb VA, Karbowniczek M, Klein-Szanto AJ, Henske EP. Activation of the mTOR signaling pathway in renal clear cell carcinoma. *J Urol*. 2007;177(1):346–52.
123. Wu X, Wang L, Han Y, Regan N, Li PK, Villalona MA et al. Creating diverse target-binding surfaces on FKBP12: synthesis and evaluation of a rapamycin analogue library. *ACS Comb Sci*. 2011;13(5):486–95.
124. Grgic T, Mis L, Hammond JM. Everolimus: a new mammalian target of rapamycin inhibitor for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Ann Pharmacother*. 2011;45(1):78–83.
125. Hudes GR, Berkenblit A, Feingold J, Atkins MB, Rini BI, Dutcher J. Clinical trial experience with temsirolimus in patients with advanced renal cell carcinoma. *Semin Oncol*. 2009;36 Suppl 3:S26–36.
126. Voss MH, Hakimi AA, Pham CG, Brannon AR, Chen YB, Cunha LF et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic renal cell carcinoma and extended benefit from mTOR inhibitor therapy. *Clin Cancer Res*. 2014;20(7):1955–64.
127. Nassar AH, Hamieh L, Gray KP, Thorner AR, Fay AP, Lasseter KD et al. Mutations and Response to Rapalogs in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2019.
128. Roldan-Romero JM, Beuselinck B, Santos M, Rodriguez-Moreno JF, Lanillos J, Calsina B et al. PTEN expression and mutations in TSC1, TSC2 and MTOR are associated with response to rapalogs in patients with renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2019.
129. Kwiatkowski DJ, Choueiri TK, Fay AP, Rini BI, Thorner AR, De Velasco G et al. Mutations in TSC1, TSC2, and MTOR Are Associated with Response to Rapalogs in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(10):2445–52.
130. Rausch S, Schollenberger D, Hennenlotter J, Stuhler V, Kruck S, Stenzl A et al. mTOR and mTOR phosphorylation status in primary and metastatic renal cell carcinoma tissue: differential expression and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(1):153–63.

131. Lin F, Zhang PL, Yang XJ, Prichard JW, Lun M, Brown RE. Morphoproteomic and molecular concomitants of an overexpressed and activated mTOR pathway in renal cell carcinomas. *Ann Clin Lab Sci.* 2006;36(3):283–93.
132. Abou Youssif T, Fahmy MA, Koumakpayi IH, Ayala F, Al Marzooqi S, Chen G et al. The mammalian target of rapamycin pathway is widely activated without PTEN deletion in renal cell carcinoma metastases. *Cancer.* 2011;117(2):290–300.
133. Hager M, Haufe H, Lusuardi L, Schmeller N, Kolbitsch C. PTEN, pAKT, and pmTOR expression and subcellular distribution in primary renal cell carcinomas and their metastases. *Cancer Invest.* 2011;29(7):427–38.
134. Liontos M, Trigka EA, Korkolopoulou P, Tzannis K, Lainakis G, Koutsoukos K et al. Expression and prognostic significance of VEGF and mTOR pathway proteins in metastatic renal cell carcinoma patients: a prognostic immunohistochemical profile for kidney cancer patients. *World J Urol.* 2017;35(3):411–9.
135. Travnicek I, Branzovsky J, Kalusova K, Hes O, Holubec L, Pele KB et al. Tissue Biomarkers in Predicting Response to Sunitinib Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* 2015;35(10):5661–6.
136. Li S, Kong Y, Si L, Chi Z, Cui C, Sheng X et al. Phosphorylation of mTOR and S6RP predicts the efficacy of everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2014;14:376.
137. Harter PN, Jennewein L, Baumgarten P, Ilina E, Burger MC, Thiebold AL et al. Immunohistochemical Assessment of Phosphorylated mTORC1-Pathway Proteins in Human Brain Tumors. *PLoS One.* 2015;10(5):e0127123.

Anhang

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Expression und klinische Bedeutung mTOR-assoziiierter Proteine in Nierenzellkarzinom-Metastasen“, in der Paracelsus-Klinik Zwickau, Klinik für Neurochirurgie und dem Institut für Neuropathologie der medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg mit Unterstützung durch **Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Mawrin** ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät des Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Ort und Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c Christian Mawrin für die geduldige und ausführliche Betreuung, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt dem gesamten Personal der neurochirurgischen Abteilung der Paracelsus-Kliniken Sachsen, Standort Zwickau, sowie dem Institut für Neuropathologie und der Neurochirurgischen Klinik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, die mir ermöglicht haben, diese Dissertation zu schreiben.

Des Weiteren richtet sich mein Dank an Herrn apl. Prof. Dr. rer. nat. Kirches, Frau Wildt, Herrn Hanke, Frau Weber - Mitarbeiter der Neuropathologischen Arbeitsgruppe des Neuropathologischen Instituts der Universitätsmedizin Magdeburg.

Ich bedanke mich auch sehr bei der Klinik für Urologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen (Herr Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert), welche die Nieren-CA-Zellen Caki-1 und Caki-2 für die in vitro-Experimente zur Verfügung gestellt hat.

Lebenslauf

Aslan Germanishvili

Adresse Spiegelstraße 40
08056 Zwickau

Kontaktdaten Tel: 0176 / 89055539
aslan_germanischvili@yahoo.de
aslan.germanishvili@paracelsus-kliniken.de

Geboren 08.12.1985 in Tbilissi/ Georgien

Familienstand verheiratet, zwei Kinder

Berufserfahrung

Seit Juli 2016	Paracelsus-Klinik Zwickau, Abteilung für Neurochirurgie als Oberarzt
01.07.2015 – 30.06.2016	Paracelsus-Klinik Zwickau, Abteilung für Neurochirurgie als Facharzt
01.08.2014 – 30.06.2015	Paracelsus-Klinik Zwickau, Abteilung für Neurochirurgie als Assistenzarzt
10.08.2008 – 01.07.2014	Universitätsklinikum der FSU, Abteilung für Neurochirurgie als Assistenzarzt

Akademische und schulische Ausbildung

09.2002 – 06.2008	Studium an der staatlichen medizinischen Universität von Tbilissi
09.2001 - 06.2002	Studium am College der staatlichen

medizinischen Universität von Tbilissi

09.1991 - 06.2001

Physikalisch-mathematische Wekua-
Mittelschule Nr. 42 von Tbilissi

Mitgliedschaft in Fachgesellschaften

Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie

Deutsche Gesellschaft für Neuroradiologie

Deutsche Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie

Zwickau, 15.07.2020