

Aus der

Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Immunhistochemische Analyse der Expressionsniveaus von
mTOR und p-mTOR in Metastasen von Nierenzellkarzinomen
unter der Berücksichtigung ihrer prognostischen Relevanz**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Schollenberger, Daniel

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Bedke

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. A. Staebler

Tag der Disputation: 09.02.2021

1 Einleitung	4
1.1 Das Nierenzellkarzinom	4
1.1.1 Epidemiologie	4
1.1.2 Risikofaktoren und Genetik.....	4
1.1.3 Histologische Varianten des Nierenzellkarzinoms	7
1.1.4 Metastasen	9
1.1.5 TNM Klassifikation und histopathologisches Grading	10
1.1.6 Prognose	13
1.1.7 Diagnose und Staging	16
1.1.8 Therapie	19
1.2 Molekulare Signalwege beim Nierenzellkarzinom	23
1.2.1 Der Hypoxie-induzierte-Signalweg.....	23
1.2.2 Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg.....	24
1.2.3 Der mTOR-Signalweg.....	25
1.2.3.1 Ein Überblick	25
1.2.3.2 Genetische Alterationen	32
1.3 Fragestellung	35
2 Material und Methoden	36
2.1 Material	36
2.1.1 Patientenkollektive und Datenerhebung	36
2.1.2 Untersuchungsmaterial	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Tissue Microarray (TMA)	37
2.2.2 Immunhistochemie (IHC)	38
2.3 Auswertung	41
2.3.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	41
2.3.2 Statistische Auswertung	44
3 Ergebnisse	46
3.1 Betrachtung des Patientenkollektivs	46
3.2 Expressionsanalysen	47
3.2.1 Vergleich der mTOR und p-mTOR Expression sowie der Ratio in benignem Gewebe, Primärtumoren und Metastasen.....	47
3.2.2 Expressionsanalysen innerhalb des Metastasenkollektivs	51
3.3 Kontingenzanalyse	55

3.4	Kaplan-Meier Analysen.....	56
3.4.1	OS und CSS ab Erstmetastasierung für die mTOR Expression ...	56
3.4.2	OS und CSS ab Erstmetastasierung für die p-mTOR Expression	59
3.4.3	OS und CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio	61
3.4.4	Überlebensanalysen des Subkollektivs „mTOR-Inhibitoren“	63
3.4.4.1	Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“: OS und CSS ab Erstmetastasierung für mTOR	63
3.4.4.2	Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“: OS und CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR.....	64
3.4.4.3	Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“: OS und CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio	65
3.5	Cox-Regressionen.....	66
3.5.1	OS ab Erstdiagnose RCC.....	67
3.5.2	CSS ab Erstdiagnose RCC.....	67
3.5.3	OS ab Erstmetastasierung.....	67
3.5.4	CSS ab Erstmetastasierung	68
4	Diskussion.....	69
4.1	Expressionsanalysen.....	70
4.2	Kontingenzanalyse.....	79
4.3	Betrachtung der Überlebensanalysen: Kaplan-Meier und Cox- Regression	83
4.4	Kritische Reflexion und Conclusio	90
5	Zusammenfassung	93
6	Literaturverzeichnis	95
7	Anhang	110
7.1	Abkürzungsverzeichnis	110
7.2	Tabellenverzeichnis	115
7.3	Abbildungsverzeichnis	116
7.4	Patientenkollektiv.....	117
7.5	Expressionsanalyse Metastasenkollektiv	122
7.6	Subkollektiv mTOR-Inhibitor-Therapie.....	126
7.7	Kontingenzanalysen	129
7.8	Cox-Regression.....	135
8	Erklärungen zum Eigenanteil.....	145

9 Veröffentlichungen.....	146
10 Danksagungen.....	147

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Nierenzellkarzinome (Renal cell carcinoma, RCC) bilden mit rund 90% den größten Anteil maligner Nierenerkrankungen (1). Mit 338 000 neuen Fällen weltweit im Jahre 2012, zeigten sich Nierentumoren für etwa 2,4% aller Krebserkrankungen verantwortlich, wobei westliche Staaten die höchsten Inzidenzraten zu verzeichnen hatten (2). Bezogen auf die USA entfallen, Zahlen aus dem Jahre 2015 zu Folge, 5% aller malignen Tumoren des Mannes und 3% derer von Frauen auf Tumoren der Niere (3). Im Laufe der letzten 20 Jahre konnte ein Anstieg der Neuerkrankungsraten von rund 2% pro Jahr beobachtet werden (1).

Bezogen auf Deutschland verzeichnete die 9. Ausgabe der Publikation „Krebs in Deutschland“ aus dem Jahre 2013 (4) für das Jahr 2010 14.520 neue Fälle maligner Nierenerkrankungen, wobei 8.950 davon auf Männer und 5.570 auf Frauen entfielen. Die standardisierte Erkrankungsrate lag damit bei 16.2 für Männer gegenüber 8.2 für Frauen und die standardisierte Sterberate bei 5.2 gegenüber 2.4, jeweils bezogen auf 100.000 Einwohner. Das mittlere Erkrankungsalter für Männer betrug 68 Jahren, Frauen erkrankten im Schnitt mit 71 Jahren. Insgesamt ergab sich, bei einer relativen 5-Jahres Überlebenschance von 75% für Männer und 77% für Frauen, eine vergleichsweise günstige Prognose.

1.1.2 Risikofaktoren und Genetik

Zu den bekannten Risikofaktoren für das Auftreten von Nierenzellkarzinomen zählen unter anderem Rauchen, Übergewicht, Bluthochdruck und die durch chronische oder terminale Niereninsuffizienz verursachte erworbene zystische Nierenerkrankungen (ARCD) (5). Die Inzidenz bei Männern scheint im Vergleich

zu Frauen um den Faktor 1.5 erhöht zu sein (6). Für die asiatische Bevölkerung innerhalb sowie außerhalb Asiens wird eine, im Vergleich zur weißen Bevölkerung, geringere Inzidenz ausgewiesen (7).

Tabakrauch stellt einen der etabliertesten Risikofaktoren für die Entwicklung eines RCC dar. Einerseits besitzen Raucher gegenüber Nichtrauchern ein um den Faktor 1.38 erhöhtes relatives Risiko, andererseits liegt im Sinne einer Dosisabhängigkeit zudem eine Risikoerhöhung für starke gegenüber schwachen Rauchern vor (8). Auch der Zusammenhang zwischen einem erhöhten **Körpergewicht** und der Auftrittswahrscheinlichkeit von RCCs konnte gezeigt werden. So wurde bei einem um 5 kg/m² erhöhten Body-Mass-Index (BMI) eine relative Risikoerhöhung von 1.24 für Männer, beziehungsweise 1.34 für Frauen festgestellt (9). Ein erhöhter **Blutdruck** erwies sich in prospektiven Studien ebenfalls als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines RCCs. Probanden mit einem mittleren systolischen Blutdruck von >160mmHg wiesen hierbei gegenüber solchen, mit einem mittleren systolischen Druck von <120mmHg, ein um den Faktor 2.48 erhöhtes relatives Risiko auf (10). Dagegen bleibt ein möglicher Zusammenhang zwischen einem manifesten **Diabetes mellitus** und der Auftrittswahrscheinlichkeit von RCCs strittig (11), auch wenn hierzu Hinweise aus zahlreichen Studien existieren (12-14). Für eine Risikoerhöhung bei Exposition gegenüber Blei, Glasfasern, Mineralwolle sowie Ziegelstäube existieren Hinweise (15, 16) und auch berufsbedingte Belastungen durch Halogenkohlenwasserstoffe sowie Cadmium werden als mögliche Risikofaktoren genannt (4). Als effektivste Primärprävention gilt das Vermeiden von Rauchen und Übergewicht (17).

Daneben kommt auch **genetischen Faktoren** eine bedeutsame Rolle bei der Entstehung von Nierenzellkarzinomen zu. In schätzungsweise 3-5% aller Fälle liegt eine hereditärer Erkrankung vor (18), und vor allem bei frühem Krankheitsbeginn sowie bilateralem oder multifokalem Auftreten sollte das Vorliegen eines familiären Syndroms in Betracht gezogen werden (1). Insgesamt betrachtet wird für Verwandte ersten Grades eines RCC-Patienten von einem zweifach erhöhten Erkrankungsrisiko ausgegangen (19).

Daneben existieren verschiedene genetische Syndrome, welche bevorzugt mit unterschiedlichen histologischen Subtypen des Nierenzellkarzinoms assoziiert sein können:

Das autosomal dominant vererbte **von Hippel-Lindau (vHL) - Syndrom** weist eine Inzidenz von 1 zu 36.000 auf (18) und ist mit dem Auftreten vor allem klarzelliger Nierenzellkarzinome (ccRCC) assoziiert. Das auf Chromosom 3p25-26 gelegene VHL-Tumorsuppressor-Gen (20) kodiert für das VHL-Protein, welches essentiell ist für die Ubiquitin vermittelte Degradation von Hypoxie-induzierten-Faktoren (HIF) (21). Ein Funktionsverlust dieses Gens wird, neben dem Auftreten im Rahmen eines vHL-Syndroms, auch bei 60-90% aller sporadischen ccRCCs beobachtet (22) und führt zu einer Akkumulation von HIFs und in letzter Konsequenz zu Neoangiogenese und Tumorwachstum. Die klinische Manifestation des vHL-Syndrom ist dabei vielgestaltig. Neben Nierenzellkarzinomen treten u.a. gehäuft Hämangioblastome des ZNS, retinale Angiome sowie Phäochromozytome auf (23). Die Penetranz einzelner Tumoren kann dabei variieren, für das RCC wird sie mit etwa 40% angegeben (18). Das RCC ist zugleich die häufigste Todesursache dieses Syndroms (23, 24).

Beim **Hereditären papillären Nierenzellkarzinom** führen Mutation des c-MET Proto-Onkogens auf Chromosom 7q31 (25) zur konstitutiven Aktivierung einer Kaskade von intrazellulären Wachstumsfaktoren und damit Tumorwachstum (26). Vor allem das Typ 1 pRCC steht in Zusammenhang mit dieser Mutation, die auch in sporadischen RCCs beobachtet wird (23) .

Dem **Hereditären Leiomyomatose und Nierenzellkarzinom (HLRCC)-Syndrom** liegen Mutationen des Fumarat-Hydratase (FH) Gens auf Chromosom 1q42.3-q43 zu Grunde (27). Erkrankte entwickeln gehäuft papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 2 sowie Leiomyome der Haut und des Uterus (28).

Mutationen des BHD-Gens 17p11.2 liegen dem autosomal dominante **Birt-Hogg-Dubé (BHD)-Syndrom** zu Grunde und gehen mit einem Verlust von Follikulin und dem Auftreten von Fibrofollikulomen, Lungenzysten sowie chromophoben RCCs und Onkozytomen einher (29). Insgesamt wird die

Auftrittswahrscheinlichkeit für ein Nierenzellkarzinom im Rahmen des BHD-Syndroms auf 20-40% geschätzt (1).

1.1.3 Histologische Varianten des Nierenzellkarzinoms

Unter dem Begriff des Nierenzellkarzinoms werden vielfältige histopathologische Befunde subsummiert und gemäß der Vancouver Klassifikation der International Society of Urological Pathology (ISUP) eingeteilt (30). Innerhalb der Nierenzelltumoren entfallen mehr als 90% aller Diagnosen auf die drei klinisch bedeutsamen Typen der klarzelligen, papillären sowie chromophoben RCCs (31). Eine sarkomatoide Differenzierung kann bei allen Formen von RCCs beobachtet werden und geht mit einem aggressiveren Verhalten des Tumors einher (32).

Klarzellige Nierenzellkarzinome (ccRCC) stellen bei 80% bis 90% aller Nierenzellkarzinome den vorherrschenden histologischen Subtyp dar (6) und gehen von den Epithelzellen des proximalen Tubulus (33) aus. Histologisch zeichnet sich das ccRCC durch Zellen hellen und wasserklaren Zytoplasmas aus, wobei auch eosinophile Charakteristika möglich sind (34). Meist herrschen solide Wachstumsmuster vor, tubuläre, papilläre und mikrozystische Anteile können auftreten (34). Rund 5% der Fälle weisen eine sarkomatoide Differenzierung auf (32). In Abhängigkeit der Ausprägung sarkomatoider Komponenten sowie des Tumorstadiums und Fuhrman-Grades, wird das biologische Verhalten als eher aggressiv beschrieben (31). Während das ccRCC in 95% der Fälle sporadisch auftritt, sind die verbleibenden 5% zumeist assoziiert mit dem von-Hippel-Lindau-Syndrom oder Tuberöser Sklerose (33). Die am engsten mit dem ccRCC in Zusammenhang stehende genetische Alteration ist ein Verlust oder eine Mutation innerhalb des von-Hippel-Lindau-Gens. Dieses auf dem Chromosom 3p 25-26 gelegenen Tumorsuppressorgen ist in bis zu 60-90% aller sporadischen ccRCCs verändert (22). Weitere bekannte Alterationen sind Duplikationen der Position 5q22, sowie Deletionen an den Positionen 6q, 8p, 9p sowie 14q (35). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die große intratumorale genomische Heterogenität, die bei ccRCCs festgestellt werden konnte (36).

Etwa 10-15% der Diagnosen entfallen auf das **papilläre Nierenzellkarzinom (pRCC, auch chromophiles RCC)** (6), dessen Ausgangsgewebe das Tubulusepithel des distalen Nephron darstellt (33). Neben rein papillären Wachstumsmustern treten auch tubulär-papilläre, sowie solide auf (35). Nekrosen sind häufig und sarkomatoide Differenzierungen werden in knapp 2% der Fälle beobachtet (32). Auch wenn das pRCC im Vergleich zum ccRCC eine bessere Prognose besitzt (37), so wird es dennoch in Abhängigkeit von Tumorstadium, Fuhrman-Grade sowie dem Auftreten sarkomatoider Komponenten, als eher aggressiver Subtyp beschrieben (33). Anhand von histologischer Erscheinung und biologischem Verhalten werden zwei Subtypen unterschieden: Typ 1 pRCCs zeichnen sich durch eher kleine Zellen mit blassem oder basophilem Zytoplasma aus, wohingegen sich Typ 2 pRCCs mit großen Zellen und eosinophilem Zytoplasma präsentieren (33). Da Typ 1 pRCCs oft bereits in früheren Tumorstadien und geringeren Fuhrman-Grades diagnostiziert werden, besitzt dieser Subtyp die vergleichsweise bessere Prognose (38). Zu den typischen, mit pRCCs assoziierten, genetischen Veränderungen zählen Trisomien der Chromosomen 7 und 17 sowie ein Verlust des Y-Chromosoms (39). Als familiäre Syndrome, die mit dem papillären Subtyp verknüpft sind, gelten Mutationen im MET proto-Onkogen bei Typ 1 pRCCs , sowie Mutationen im Fumarat-Hydratase (FH) Gen, welche zum HLRCC-Syndrom führen können und mit dem Typ 2 pRCC vergesellschaftet sind (22).

Das **chromophobe Nierenzellkarzinom (chRCC)** macht etwa 4-5% aller RCC-Diagnosen aus (6) und hat seinen Ursprung in den Schaltzellen des distalen Tubulus (33). Es weist große Zellen mit transparentem Zytoplasma in größtenteils soliden Verbänden auf (34). Verluste der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21 und des Y-Chromosoms treten auf (34). Im Rahmen des Birt-Hogg-Dubé-Syndroms kann es zum gehäuftem Auftreten von chRCCs kommen (29). Bei einem vergleichsweise geringen Metastasierungsrisiko von rund 7% (33) und einer Mortalität von 10%, hat das chRCC eine in Relation gesehen günstigere Prognose (31).

Neben diesen drei Haupttypen existieren weitere seltene Tumoren des Nephrons und des Sammelrohrsystems, die jeweils weniger als 5% aller Diagnosen von Nierentumoren ausmachen.

Sammelrohrkarzinome oder **Ductus-Bellini-Karzinome** liegen bei ca. 1% aller malignen Nierentumoren vor. Ausgehend von Zellen des Sammelrohres entwickelt sich ein sehr aggressiver Tumor mit einer Mortalität von 70% gerechnet auf zwei Jahre und einer bereits bei Erstdiagnose manifesten Metastasierung in 30% der Fälle (33).

Auch bei **medullären RCCs**, ebenfalls ca. 1% aller Fälle, liegt ein sehr aggressiver Subtyp vor und es muss mit einem Auftreten der Erkrankung bereits in der zweiten und dritten Lebensdekade gerechnet werden. Ursprungsgewebe hierbei ist das distale Nephron (33).

Weitere, **nicht klassifizierte Fälle**, machen 4-6% der Diagnosen aus und sind bei variabler Histologie und Altersverteilung durch eine in der Regel hohe Mortalität gekennzeichnet (33).

1.1.4 Metastasen

Bei 20-30% aller Patienten liegen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen vor und bei weiteren 20-40% kommt es nach kurativ intendierter Nephrektomie im Rahmen des Follow-ups zum Auftreten von Metastasen (40, 41), wobei bei weniger als 5% eine solitäre Metastasierung vorliegt (42, 43). Die Ausbreitung erfolgt dabei zumeist hämatogen (23). In absteigender Häufigkeit finden sich Absiedlungen des Nierenzellkarzinoms in Lunge (60-70%), regionalen Lymphknoten (60-65%), Knochen (39-40%), Leber (19-40%) und Gehirn (5-7%) (43-45). Des Weiteren können, in seltenen Fällen und meist in größerem zeitlichen Abstand zur Erstmanifestation, Metastasen in Schilddrüse, Herz, Milz und Pankreas beobachtet werden (23). In einer 2005 erschienen Publikation von Patard et al. (46) wiesen 21.5% der Patienten mit einem ccRCC, 14.9% mit einem pRCC und 2.9% derer, mit einem chRCC, Metastasen auf. Die Prognose von Patienten mit Metastasen in Leber oder Knochen ist insgesamt

schlechter, als die von Patienten mit Lungen- oder Lymphknotenmetastasen und auch eine Anzahl der Metastasen >1 beeinflusst die Prognose negativ (47-49).

Hinsichtlich der gewählten Therapie bei metastasierter Erkrankung wird üblicherweise zwischen einer Ära der zytokinbasierten Therapie und einer Ära der Target-Therapeutika differenziert, welche in der Europäischen Union mit der Zulassung der Tyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib und Sorafenib 2006 begann (50). Abhängig von der Wahl des Studiendesigns werden für zytokintherapierte Patienten im Mittel Remissionsraten, partiell sowie komplett, von 12.9% und ein medianes Gesamtüberleben von 13.3 Monaten angegeben (51). Große Unterschiede existieren auch für klinische Studien zu Target-Therapien, unter welchen Ansprechraten von bis zu 40% und ein medianes Gesamtüberleben von bis zu zweieinhalb Jahren beobachtet wurden (52, 53). Eine populationsbasierte schwedische Studie aus dem Jahr 2013 (50) gab für metastasierte Nierenzellkarzinome, die zwischen den Jahren 2002 und 2008 diagnostiziert wurden, eine 5-Jahres-Überlebensrate von 13% aus. Eine Einteilung des schwedischen Metastasenkollektivs in solche Patienten, deren Metastasierungsprozess in die Zeit von 2002-2005, d.h. in die Ära der Zytokintherapie fielen, und solche, die zwischen 2006-2008, d.h. in der beginnenden Ära der Target-Therapeutika, ihre Diagnose erhielten, ergab hinsichtlich des Gesamtüberlebens 9.6 Monate (8.5-10.7) bzw. 12.4 Monate (11.0-13.8) ($p=0,004$). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Macleod et al. im Rahmen einer populationsbasierten Studie (52), die eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens von 11 Monaten für zytokintherapierte Patienten auf 14 Monate unter Target-Therapie für ccRCCs feststellten ($p<0.001$). Für nicht klarzelliges RCCs stieg das mediane Gesamtüberleben von 7 auf 9 Monate ($p=0.008$).

1.1.5 TNM Klassifikation und histopathologisches Grading

Das von der Union internationale contre le cancer (UICC) entwickelte TNM-Klassifikationssystem dient der Beschreibung von Tumoren anhand der Ausdehnung des Primärtumors (T), dem Auftreten von Absiedlungen im

regionären Lymphsystem (N) sowie dem eventuellen Vorliegen von Fernmetastasen (M). Die Tabelle zeigt die TNM-Klassifikation für Nierenzelltumoren Stand 2016 (54).

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor ≤ 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
	T1a Tumor ≤ 4 cm in größter Ausdehnung
	T1b Tumor > 4 cm, aber ≤ 7 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor > 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
	T2a Tumor > 7 cm, aber ≤ 10 cm in größter Ausdehnung
	T2b Tumor > 10 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich in größere Venen aus oder infiltrierte direkt perirenales Gewebe, jedoch nicht in ipsilaterale Nebenniere und nicht über die Gerota-Faszie hinaus
	T3a Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die Nierenvene oder ihre segmentalen Äste (mit muskulärer Wand) oder mit Infiltration des perirenal und/oder peripelvinen Fettgewebes, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus
	T3b Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells
	T3c Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder mit Infiltration der Wand der V. cava
T4	Tumor infiltrierte über die Gerota-Faszie hinaus (eingeschlossen die kontinuierliche Ausbreitung in die ipsilaterale Nebenniere)

Tabelle 1: TNM Klassifikation: Primärtumor, modifiziert nach Brierley et al. (54)

N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten

Tabelle 2: TNM Klassifikation: regionäre Lymphknoten, modifiziert nach Brierley et al. (54)

M	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 3: TNM Klassifikation: Fernmetastasen, modifiziert nach Brierley et al. (54)

TNM Stadiengruppen			
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IV	T4	N0, N1	M0
	Jedes T	N1	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 4: TNM Klassifikation: Stadiengruppen, modifiziert nach Brierley et al. (54)

Als weiteres wichtiges Merkmal zur Beschreibung von Nierenzelltumoren dient das histologische Grading, welches zudem einen eigenständigen prognostischen Faktor darstellt (55).

G	Histopathologisches Grading
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Tabelle 5: TNM Klassifikation: Grading, modifiziert nach Brierley et al. (54)

1.1.6 Prognose

Ein prognostischer Faktor ist, unabhängig von der Wahl der Therapie, assoziiert mit dem Überleben des Patienten oder der Tumorprogression (44). Prognostische Marker bei Nierenzellkarzinomen können unterschieden werden in **anatomische** (z.B. die TNM-Klassifikation), **histologische** (z.B. RCC-Subtyp, Fuhrman-Grading, Nekrosen, sarkomatoide Differenzierung), **klinische** (z.B. Karnofski- oder ECOG-Performance-Status, Anämie, Thrombozytopenie und weitere Laborparameter) sowie **molekulare Faktoren**. Für das RCC wurden im Laufe der Zeit eine Vielzahl solcher Faktoren aufgedeckt, von denen einige mehr, andere weniger gut mit der Prognose des Patienten korrelieren. Die Kombination von mehreren solcher Faktoren führte zur Entwicklung von Prognosemodellen. Nachfolgend soll ein kurzer Überblick über einige prognostische Faktoren sowie wichtige Modelle gegeben werden.

Prognostische Marker

Das **TNM-Stadium** gilt als ein etablierter Prognosefaktor beim Nierenzellkarzinom und findet Eingang in alle drei gängigen Prognosemodelle für lokalisierte Tumoren. Eine von Ficarra et al. (56) im Jahre 2002 veröffentlichte Studie zeigte einen deutlichen Zusammenhang zwischen TNM-Stadium und krebsspezifischem Überleben (CSS). In dieser ergaben sich krebsspezifische 5-Jahres-Überlebensraten von 94% für das Stadium I, 89,7% für das Stadium II sowie 63,4% bzw. 28% für die Stadien III und IV. Auch aktuellere Studien zeigen ein zehnfach erhöhtes Mortalitätsrisiko für Patienten mit einer Stadium IV Erkrankung im Vergleich zu solchen, mit einer Erkrankung im Stadium I (57).

Auch das **Grading nach Fuhrman** des Primärtumors erwies sich in multivariaten Analysen als unabhängiger prognostischer Faktor des CSS (56, 57). Mit einem zunehmenden Grad der Entdifferenzierung ergab sich in oben zitierter Studie von Ficarra et al. (56) ein 5-Jahres-CSS von 94% für G1 Tumoren, 86% für G2 Tumoren, 59% für G3 Tumoren sowie 31% für undifferenzierte G4 Tumoren.

In Bezug auf den **histologischen Subtyp** wurden für radikal nephrektomierte Patienten mit sporadischen, unilateralen RCCs signifikant schlechtere

krebsspezifische 5-Jahres-Überlebensraten für ccRCCs (68,9%) im Vergleich zu pRCCs (87,4%) und chRCCs (86,7%) beschrieben (58). Eine noch schlechtere Prognose weist das Ductus-Bellini-Karzinom mit einer Gesamtüberlebensrate von lediglich 20% bezogen auf 2 Jahre auf (59). In Bezug auf das Überleben nach Firstline Target-Therapie zeigten Untersuchungen von Patienten mit nicht klarzelligen RCCs im Vergleich zu Patienten mit ccRCCs ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben von 12.8 gegenüber 22.3 Monaten (60).

Eine spindelzellige, **sarkomatoide Wachstumskomponente** kann prinzipiell bei allen histologischen Subtypen des RCC auftreten. Im Rahmen einer Studie von de Peralta-Venturina et al. (61) wurde bei 8% der ccRCCs, 3% der pRCCs, 9% der chRCCs, 29% der Ductus-Bellini-Karzinome und 11% der nicht-klassifizierten RCCs eine sarkomatoide Komponente beschrieben. In Abhängigkeit vom Auftreten einer sarkomatoiden Komponente ergab sich ein reduziertes 5-Jahres-CSS von 22% gegenüber 79%; ein Trend, welcher sich auch in einem Kollektiv von VEGF-Inhibitor therapierten Patienten mit einem metastasierten RCC zeigte (62).

Für Patienten mit ccRCC oder chRCC stellt zudem das Vorliegen von **Tumornekrosen** einen unabhängigen prognostischen Marker dar. Für Patienten mit ccRCCs ist hierbei die Wahrscheinlichkeit, an der Tumorerkrankung zu versterben, um den Faktor 5.27 und für das chRCC um den Faktor 4.20 erhöht (63).

Insbesondere bei fortgeschrittener Erkrankung kommt auch **Laborparametern** eine größere Bedeutung zu. So stellen ein erhöhter korrigierter Serum-Kalziumspiegel, das Vorliegen einer Anämie, eine erhöhte Anzahl an Thrombozyten und Neutrophilen Granulozyten, eine LDH-, AP- oder CRP-Erhöhung negative prognostische Faktoren dar (47, 48, 64-68).

Auch die beiden gebräuchlichsten **Performancestatus** finden regelhaft Eingang in prognostische Modelle. So stellen ein hoher Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG-PS) bzw. ein niedriger Karnofsky Performance Status (KPS) relevante negative prognostische Faktoren dar (48, 64, 66, 69-71).

Im metastasierten Erkrankungsstadium zeigen das Vorliegen von mehr als einer Metastasenlokalisierung, ein tendenziell kürzerer Zeitraum zwischen Erstdiagnose des Primärtumors und Erstdiagnose des metastasierten Stadiums sowie die Metastasenlokalisierung in Leber und Knochen eine schlechtere Prognose an (47, 48, 68, 69).

Obwohl bis heute eine Vielzahl molekularer Marker wie u.a. VEGF, HIF, Ki67, p53 untersucht wurden, war bislang kein molekularer Marker in der Lage, bisherige prognostische Modelle signifikant zu verbessern (17).

Prognosemodelle

Die European Association of Urology (EAU) führt in ihrer Leitlinie zum Nierenzellkarzinom (17), Stand 2015, drei Prognosemodelle für das lokalisierte und zwei für das metastasierte Stadium als die am weitesten verbreiteten auf. (siehe Tabelle 6). Im metastasierten Erkrankungsstadium sind dies das von Motzer et al. (65, 66) entwickelte Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) Modell, sowie das International-Database-Consortium (IMDC) Modell von Heng et al. (71). Während das MSKCC-Modell in seiner aktualisierten Version von 2002 (65) noch zu Zeiten einer standardmäßigen Therapie mit INF- α entwickelt wurde, ist das IMDC-Modell bereits in der Ära der Targettherapeutika angesiedelt. Die Vorhersagegenauigkeit liegt für das MSKCC-Modell bei einem c-Index von 0.657 und für das IMDC-Modell bei 0.664 (72).

	Prognosemodelle RCC				
Variablen	Lokalisiertes Stadium			Metastasiertes Stadium	
	UISS	SSIGN	Postoperatives Karakiewicz Nomogramm	MSKCC Prognosesystem	IMDC Modell
TNM Stadium	X	X	X		
ECOG-PS	X				
Karnofsky-PS				X	X
RCC bezogene klinische Symptome			X		
Fuhrman Grade	X	X	X		
Tumornekrose		X			
TumorgroÙe		X	X		
Zeit zwischen Diagnose und Therapie				X	X
Lactatdehydrogenase				X	
Korrigiertes Kalzium				X	X
Hämoglobinwert				X	X
Neutrophilenzahl					X
Thrombozytenzahl					X

Tabelle 6: Prognosemodelle RCC, Übersicht nach EAU-Guideline RCC 2015(17)

Abkürzungsverzeichnis: **ECOG-PS** = Eastern Cooperative Oncology Group performance status, **MSKCC-PS** = Memorial Sloan Kettering Cancer Center performance status, **SSIGN** = Stage Size Grade Necrosis, **UISS** = University of California Los Angeles integrated staging system

1.1.7 Diagnose und Staging

Symptome

Zwischen 50% und 60% aller RCCs werden zufällig im Rahmen bildgebender Untersuchungen entdeckt (6, 73, 74) und zu 75% bereits in den Stadien T1 und T2 diagnostiziert (4). Da das Nierenzellkarzinom in diesen frühen Stadien häufig

asymptomatisch bleibt, wird die klassische Trias aus Flankenschmerz, Makrohämaturie und palpablem abdominalem Tumor in heutiger Zeit nur noch bei knapp 10% aller Patienten beobachtet (23). Häufig weisen diese dann ein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium mit aggressivem histopathologischem Befund (74) sowie eine schlechtere Prognose (75) auf. Paraneoplastische Symptome sind keine Seltenheit und werden bei bis zu 20% aller erstdiagnostizierten Patienten sowie in 40% der Rezidivfälle beobachtet (76). Mögliche Befunde sind unter anderem: Hypertension, Kachexie, Gewichtsverlust, Pyrexie, Polyneuropathie, Polymyositis, Amyloidose, erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), Anämie, Hyperkalziämie, Polyzythämie oder das Stauffer-Syndrom (76). Bei Patienten mit metastasierter Erkrankung besteht zudem die Möglichkeit, aufgrund der Metastasenlokalisation Symptome zu entwickeln. So können Absiedlungen in der Lunge zu persistierendem Husten führen, ossäre Metastasen zu Knochenschmerzen.

Körperliche Untersuchung

Die klassische körperliche Untersuchung ist beim RCC nur von begrenzter diagnostischer Relevanz. Palpable abdominelle Raumforderungen können mögliche Auffälligkeiten bei sehr großen Tumoren darstellen. Eine persistierende Varikozele oder eine pathologische rechtsseitige Varikozele sowie bilaterale Ödeme der unteren Extremität können auf eine Ausbreitung des Tumors in das venöse Gefäßsystem hindeuten (23).

Labor

Gemeinhin erhobene Laborparameter sind ein großes Blutbild, Gerinnungsstatus, Blutsenkungsgeschwindigkeit, Leberfunktionsparameter, Alkalische Phosphatase (AP), Laktatdehydrogenase (LDH), Serumkalzium, Serumkreatinin sowie eine Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) (17). Auch eine Urinanalyse sollte durchgeführt werden, da 60% der Patienten zumindest temporär eine Hämaturie entwickeln (23, 77).

Bildgebende Diagnostik

Die überwiegende Anzahl von RCCs wird im Rahmen von sonographischen Untersuchungen (US), Computertomographien (CT) oder Magnetresonanztomographien (MRT) entdeckt (6, 73, 74). Auf Basis der Befunde aus der Bildgebung wird unterschieden zwischen soliden und zystischen Läsionen. Bei zystischen Auffälligkeiten im CT kann anhand der fünfstufigen Bosniak-Klassifikation der Versuch einer Einstufung von I = benigne bis IV = maligne vorgenommen werden (78, 79). Für solide Befunde gilt das Enhancement, die Kontrastmittelaufnahme, als eines der wichtigsten diagnostischen Kriterien (80) und bietet unter Berücksichtigung der Aufnahmekriterien eine Sensitivität von beinahe 100% (23). In bis zu 91% der Fälle gelingt mittels CT die exakte Einschätzung der lokalen Tumorausbreitung gemäß der TNM-Klassifikation (81), und insbesondere die zweiphasige MDCT-Angiographie erlaubt eine genaue Aussage über die renale Blutversorgung (82). Speziell bei der Frage nach einer Ausbreitung des Tumors in die Vena cava kann auch ein kontrastmittelgestütztes MRT durchgeführt werden (83). Für das weitere Staging wird in aller Regel ein Thorax-CT angestrebt (84) und bei darüber hinausgehenden Fragestellungen, beispielsweise nach Knochen- oder Hirnmetastasen, eine entsprechende Bildgebung durchgeführt.

Biopsie

Zwar erlauben heutige CT- oder MRT-Aufnahmen in einer Vielzahl von Fällen eine valide Diagnose, dennoch kann die Abgrenzung eines RCC beispielsweise gegen ein Onkozytom Schwierigkeiten bereiten (80, 85). So ist die biopsische Sicherung des Befundes vor dem chirurgischen Eingriff zwar nicht immer zwingend notwendig, kann in vielen Fällen aber dennoch einen erheblichen diagnostischen Mehrwert bieten. Sie sollte deshalb in allen Fällen durchgeführt werden, in denen die Bildgebung keine eindeutigen Ergebnisse liefert oder um bei kleinen Befunden ein abwartendes Offenhalten zu rechtfertigen (17). Zudem dient sie bei bereits fortgeschrittener Erkrankung dazu, die passende Form der pharmakologischen Therapie zu definieren (17). Die Biopsie kann CT- oder

Ultraschall-gesteuert und wahlweise als Stanzbiopsie oder Feinnadelbiopsie durchgeführt werden, wobei erstere hierbei die höhere Aussagekraft in Bezug auf Dignität und histologischen Subtyp besitzt (86). Auch ein kombinierter Einsatz beider Verfahren kann die diagnostische Sicherheit erhöhen (87). Trotz hoher Sensitivität und Spezifität der Stanzbiopsie (88) schlägt in bis zu 22% aller Fälle der Versuch der Bestimmung von Malignität und histologischem Subtyp sowie des Fuhrman-Grades fehl, und es kann mittels Biopsie kein aussagekräftiges Material gewonnen werden (17).

1.1.8 Therapie

Im lokalisierten Stadium

Die chirurgische Intervention bleibt der Hauptpfeiler der Therapie bei RCCs und stellt die einzige kurative Therapie hoher Evidenz dar (6). Hinsichtlich des Resektionsausmaßes kann zwischen einer radikalen Tumornephrektomie und einer organerhaltenden, partiellen Nephrektomie unterschieden werden. Beide Verfahren können sowohl offen, als auch laparoskopisch durchgeführt werden. Eine adjuvante zytokinbasierte Therapie beeinflusst sowohl das CSS als auch das OS nicht (89) und findet keine Anwendung. Die EAU-Leitlinien aus dem Jahre 2015 geben hinsichtlich der Wahl des Vorgehens folgende Empfehlungen ab (17): Bei Tumoren des Stadiums T1a-b sollte, sofern möglich, die partielle der totalen Nephrektomie vorgezogen werden. Eine Entfernung der ipsilateralen Nebenniere bleibt dabei Ausnahmefällen vorbehalten. Die standardmäßige erweiterte Lymphadenektomie scheint das Überleben nicht zu verbessern und sollte lediglich zu Staging-Zwecken bei palpablen bzw. vergrößerten Lymphknoten durchgeführt werden. Als Alternativen zur chirurgischen Intervention kann bei Patienten, welche zwar symptomatisch, jedoch inoperabel sind, die Tumorembolisation einen palliativen Ansatz darstellen (90, 91). Auch andere Verfahren, wie das ablativ Vorgehen mittels Kryosonde oder eine Radiofrequenzablation können erwogen werden. Eine Strategie der aktiven

Überwachung kann bei älteren Patienten mit reduzierter Lebenserwartung und kleinen Tumoren angezeigt sein (92, 93).

Lokale Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms

Auch bei metastasierter Erkrankung gilt, dass eine Tumornephrektomie nur dann kurativen Anspruch hat, wenn sämtliche Tumoranteile inklusive der Metastasen entfernt werden können. Dennoch konnte gezeigt werden, dass sowohl eine alleinige zytoreduktive Nephrektomie (94), als auch eine ebensolche in Kombination mit Interferon- α (95) einen Überlebensvorteil bietet. Hinsichtlich einer Metastasenresektion wiesen Patienten mit einer vollständigen Resektion gegenüber solchen, mit einer teilweisen oder unterlassenen Metastasenresektion, ein verlängertes OS und CSS auf (96-99). 5-Jahres-Überlebensraten von bis zu 30% für die Resektion solitärer Metastasen werden erzielt (100) und liegen bei Lungenmetastasen sogar knapp über 40% (101). Bei nicht resektablen Hirnmetastasen kann eine, meist palliative, stereotaktische Bestrahlung zur Symptomreduktion erwogen werden (102), während bei Knochenmetastasen auch eine Kombination aus Immunochemo- und Radiotherapie eine Tumorremission erzielen konnte (103).

Systemische Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms

Chemotherapie und Immuntherapie

Systemische Chemotherapien besitzen beim metastasierten Nierenzellkarzinom in heutiger Zeit keinen Stellenwert mehr, da, möglicherweise bedingt durch die Herabregulierung der Topoisomerase-II, eine Überexpression der Glutathiontransferase oder beteiligter membrangebundener Faktoren wie p-170, kurzzeitige Ansprechraten in nur 6-17% der Fälle beobachtet wurden (23). Bei Patienten mit ccRCC wird eine Chemotherapie, beispielsweise mit 5-FU, deshalb nicht als Therapie empfohlen (17). Auch die systemischen Immuntherapie mit INF- α sowie IL-2 stellen nach Einführung der Target-Therapie in heutiger Zeit

keine Erstlinientherapieoption für das metastasierte Stadium des RCC mehr dar (17).

Target-Therapie

In 60-90% aller sporadischen ccRCCc wird ein Funktionsverlust des vHL-Gens beobachtet (22), der nachfolgend zu einer Akkumulation von HIFs, Anhäufung von u.a. VEGF und PDGF sowie in letzter Konsequenz zu Neoangiogenese und Tumorwachstum führt. Neuere Forschungen haben zur Entwicklung von Therapeutika geführt, welche in diesen Stoffwechsel eingreifen und etwa ab dem Jahre 2005 den Beginn der so genannten „Ära der Targeted-Therapie“ einläuteten. Da das bis zu diesem Zeitpunkt verwendete MSKCC-Prognosemodell auf die Therapie mit Zytokinen angepasst war, wurde die Etablierung eines neuen Modells zur Risikostratifizierung im Zeitalter der Targeted-Therapie nötig. Unter Heng et al. wurde daraufhin das IMDC-Modell entwickelt (71, 72). Das mediane Gesamtüberleben liegt hierbei für eine Gruppe ohne Risikofaktoren und damit günstiger Prognose bei 43.2 Monaten und für Patienten mit 1-2 Risikofaktoren und mittlerer Prognose bei 22.5 Monaten (72). Beim Vorliegen von 3-5 Risikofaktoren erfolgte die Einstufung in eine Gruppe mit tendenziell schlechter Prognose, welche ein medianes Gesamtüberleben von 7.8 Monaten aufweist (72). Einschränkend muss gesagt werden, dass die meisten Studien zu diesen „New-Agents“ an ccRCCs durchgeführt wurden und deshalb für andere histologische Subtypen lediglich eine begrenzte Aussagekraft besteht.

Tyrosinkinaseinhibitoren

Sorafenib ist ein Kinaseinhibitor mit Aktivität gegen Raf-1, B-Raf, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR, FMS-like Tyrosin-Kinase-3 (FLT-3) und c-KIT (104) und beeinflusst dadurch Tumorwachstum sowie Neoangiogenese. Bei Patienten, deren vorangegangene Immuntherapie fehlschlug bzw. die für diese nicht geeignet waren, zeigte Sorafenib ein um knapp 3 Monate verlängertes

progressionsfreies Überleben gegenüber dem Placeboarm der Studie (5.5 vs. 2.8 Monate), wobei mehr als 50% deutliche Nebenwirkungen entwickelten (105).

Sunitinib blockiert als Tyrosinkinaseinhibitor selektiv PDGFR, VEGFR, c-KIT und FLT-3 (35). In einer von Motzer et al. 2007 veröffentlichten Studie (106) konnte bei Erstlinientherapie mit Sunitinib ein gegenüber einer IFN- α -Monotherapie verbessertes Ansprechen (31% vs. 6%) sowie verlängertes medianes progressionsfreies Überleben (11 vs. 5 Monate) gezeigt werden.

Pazopanib blockiert VEGFR, PDGFR sowie c-KIT(35) und konnte bei einer Ansprechrate von 30% ein gegenüber Placebo verbessertes progressionsfreies Überleben sowohl bei bislang unbehandelten mRCC-Patienten (11.1 vs. 2.8 Monate), als auch nachfolgend nach vorangegangener Zytokintherapie (7.4 vs. 4.2 Monate) zeigen (107).

Axitinib wirkt als selektiver Inhibitor der VEGFR-1, -2 und -3 (35). Im Rahmen einer Studie wurde an Patienten, bei denen zuvor eine Zytokin- oder Target-Therapie fehlschlug, ein Vergleich zwischen Axitinib und Sorafenib als Zweitlinientherapie angestellt. Dabei wies der Axitinib-Arm der Studie ein im Vergleich zu Sorafenib verlängertes progressionsfreies Überleben auf (6.7 vs. 4.7 Monate) auf (108).

Monoklonale Antikörper

Bevacizumab stellt einen rekombinanten monoklonalen Antikörper dar, welcher zirkulierendes VEGF binden und dadurch neutralisieren soll (23). Gegenüber einer Monotherapie mit IFN- α zeigte eine Kombination von Bevacizumab + IFN- α ein verbessertes medianes Ansprechen (31% vs. 13%) und verlängertes PFS bei niedrig- und mittel-Risiko Patienten (10.2 vs. 5.4 Monate) (109).

mTOR-Inhibitoren

In einer von Hudes et al. 2007 veröffentlichten Studie (110) erreichte eine Hochrisiko-mRCC-Gruppe, welche mit **Temsirolimus** als Erstlinientherapie

behandelt wurde, ein medianes OS von 10.9 Monaten gegenüber 7.3 Monaten bei IFN- α -Monotherapie. Eine Kombination beider Präparate brachte keinen zusätzlichen Nutzen.

In Studien konnte bei einem Vergleich von **Everolimus** + Best-supportive-Care gegenüber Placebo + Best-supportive-Care nach vorausgegangener und fehlgeschlagener anti-VEGFR-Therapie ein medianes progressionsfreies Überleben von 4 Monaten gegenüber 1.9 Monaten gezeigt werden (111).

1.2 Molekulare Signalwege beim Nierenzellkarzinom

1.2.1 Der Hypoxie-induzierte-Signalweg

Der durch Hypoxie induzierbare Transkriptionsfaktor 1 (HIF-1) spielt durch Steuerung von Angiogenese, Glukosetransport, Glykolyse, pH-Kontrolle, epithelialer Proliferation, Zellmigration und Apoptose beim Nierenzellkarzinom eine zentrale Rolle (112). Dadurch ist es der Zelle möglich, sich an ein hypoxisches Milieu zu adaptieren. Das als Transkriptionsfaktor fungierende HIF-1 besteht als Heterodimer aus zwei verschiedenen Untereinheiten: Dem konstitutiv exprimierten HIF-1 β sowie HIF-1 α , dessen Expression unter hypoxischen Bedingungen ansteigt (113). Die Biosynthese von HIF-1 α wird unter anderem maßgeblich über den mTOR-Signalweg gesteuert. Entsprechend können auch Alterationen innerhalb der mTOR-Kaskade, wie beispielsweise ein PTEN-Verlust, zu einer übermäßigen Expression von HIF-1 α führen (114, 115). Posttranslational wird die Expression von HIF-1 α maßgeblich durch das VHL Suppressor-Protein gesteuert (116), wobei HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen zwar kontinuierlich synthetisiert, anschließend jedoch rasch abgebaut wird (113, 116). Dieser Abbau wird eingeleitet durch die sauerstoffabhängige Hydroxylierung von HIF-1 α , welches nachfolgend unter anderem durch das VHL-Protein gebunden und der Ubiquitin vermittelten

Degradation im Proteasom zugeführt wird (117, 118). Unter hypoxischen Bedingungen findet diese Hydroxylierung nicht statt, es erfolgt keine Bindung durch das VHL-Protein und HIF-1 α akkumuliert und wandert in den Zellkern. Dort dimerisiert es mit HIF-1 β und bindet an Hypoxie-response-elements (HREs) von Genen, welche durch Hypoxie induzierbar sind. Diese werden nachfolgend transkribiert (40). Die in 60-90% (22) aller sporadischen ccRCCs zu beobachtende VHL-Genmutation bzw. der VHL-Genverlust führen entsprechend zu einer fehlerhaften Ubiquitierung von HIF-1 α und zu einer Akkumulation selbst unter normoxischen Bedingungen (116). Die Aktivierung der Downstream-Gene führt zu einer vermehrten Synthese von u.a. VEGF, PDGF, TGF- α und IGF, GLUT-1 und GLUT 3, CA IX zur pH-Regulation sowie Matrix-Metalloproteinasen (119). Daneben bedingt die gesteigerte Expression von HIF-1 α eine Hemmung des für E-Cadherin kodierenden CDH1-Gens, welches für epitheliale Zell-Zell-Adhäsion sowie die Integrität der Gewebearchitektur von Bedeutung ist (120). Zudem kommt es zu einer Aktivierung des MET-Proto-Onkogens und einer damit verbundenen Hochregulation von HGF-Rezeptoren (121). Der Hypoxie-induzierte Signalweg unterhält somit ausgeprägte wechselseitige Verbindungen zum PI3K/Akt/mTOR-Signalweg: Durch die vermehrte Expression von EGF, PDGF und VEGF und deren Bindung an korrespondierende Tyrosinkinaserzeptoren kommt es zur Aktivierung von mTORC1 und mTORC2 und damit zur neuerlichen HIF-Synthese (122, 123) im Sinne einer konstitutiven Selbstverstärkung.

1.2.2 Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg

Über den Ras-Raf-MEK-ERK-Pathway werden Signale von Tyrosinkinaserzeptoren wie EGFR, Her-2, VEGFR, PDGFR und MET in den Nukleus übermittelt (124). Gene, die in diesen Pathway eingebunden sind, sind im Rahmen der Krebsentstehung regelmäßig mutiert und führen zu einer Zellzyklusprogression, verbessertem Zellüberleben, gesteigerter Proliferation und Angiogenese und vermitteln Invasion, Metastasierung, Apoptosehemmung sowie Resistenzen gegenüber Radio- und Chemotherapie (124). Das Binden eines Liganden an einen der genannten Rezeptoren führt zu einer

Phosphorylierung des Rezeptors, der nachfolgenden Bindung von GTP durch Ras und der Aktivierung der Raf-Kinase. Diese Aktivierung hat die Phosphorylierung von MEK zur Folge, welches ERK 1/2 aktiviert. Dadurch kommt es am Ende zur Phosphorylierung und Aktivierung zahlreicher Substrate, wie beispielsweise auch der S6-Kinase (124).

1.2.3 Der mTOR-Signalweg

1.2.3.1 Ein Überblick

mTOR (mammalian target of rapamycin) stellt als Serin-Threonin-Kinase einen zentralen Regulator von Zellwachstum und –proliferation dar (125). In Abhängigkeit von extrazellulären Wachstumsfaktoren und Nährstoffangebot, werden mittels der mTOR-Kaskade vielfältige Zellfunktionen gesteuert, darunter Zellwachstum, -proliferation und –metabolismus sowie ribosomale Biogenese und Angiogenese (126).

Die Entdeckung von mTOR begann 1975 mit der Isolierung einer antifugalen sowie antibiotischen Substanz aus *Streptomyces hygroscopicus* Bakterien, welcher der Name Rapamycin verliehen wurde (127). Nachdem man zusätzlicher immunosuppressiver sowie antitumoraler Effekte dieser Substanz gewahr wurde (128), kam es 1994 zur Identifizierung ihrer intrazellulären Zielstruktur in Säugetieren (129, 130), die in Folge mammalian target of rapamycin (mTOR) getauft wurde.

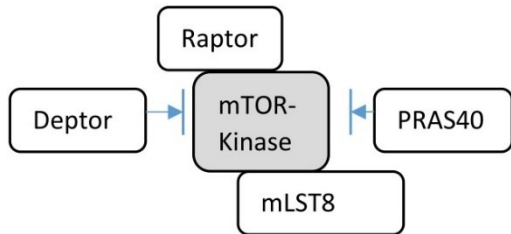
mTOR besteht bei einem Gewicht von 289kDa (129) aus 2549 Aminosäuren (131) und wird zur Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-related-kinase-superfamily gezählt (132). Bestandteile dieser Gruppe sollen den Organismus befähigen, mit umweltabhängigen, metabolischen oder genetischen Formen von Stress umzugehen (125). Das N-terminale Ende mTORs besteht aus 20 so genannter HEAT tandem-repeats, welche wiederum aus je zwei ca. 40 AS umfassenden alpha-Helices bestehen, innerhalb derer sich hydrophile und

hydrophobe Anteile abwechseln und Bedeutung für die Protein-Protein-Interaktion besitzen (133). Das C-terminale Ende besitzt die eigentliche Kinase-Domäne. N-terminal dieses katalytischen Zentrums befindet sich die FRB-Domäne sowie eine relativ große FAT (FRAP, ATM, TRRAP)-Domäne, welche im Rahmen der Interaktion mit anderen Proteinen eine Rolle spielt (125). Auch das C-terminale Ende beinhaltet eine weitere, so genannte FATC-Domäne, deren Intaktheit für die Funktion von mTOR essentiell zu sein scheint (134) und den Abbau von mTOR beeinflusst (135). Es wird vermutet, dass eine Interaktion zwischen diesen beiden Domänen eine Konfiguration bedingt, die die katalytische Einheit offenlegt. Daneben existiert vermutlich eine negativ-regulatorische Domäne zwischen der Katalytischen- sowie FATC-Domäne (136).

mTOR liegt in der Zelle in Form zweier unterschiedlicher Komplexe vor, die an verschiedenen Stellen der Signalkaskade eingebunden sind. Der mTOR-Komplex 1 (**mTORC1**) besteht aus der mTOR Untereinheit sowie den Proteinen Raptor (regulatory-associated protein of mTOR) (137), mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8) (138), PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDA)(139) und DEPTOR (DEP (Dishevelled, EGL-10, pleckstrin) domain-containing mTOR-interacting protein) (140). Raptor dient dabei als Bindungsstelle für S6K1 und 4E-BP1 und ist dadurch essentiell für die Kinasefunktion von mTOR (141). PRAS40 liegt im nicht-phosphoryliertem Zustand an mTORC1 gebunden vor und hemmt dessen Aktivität (142, 143). mLST8 scheint die Assoziation von mTORC1 und Raptor (138) bzw. mTORC2 und Rictor (144) zu stabilisieren. DEPTOR wird derzeit als negativer Regulator der mTORC1 und mTORC2 Funktion verstanden (140).

Der **mTORC2**-Komplex beinhaltet ebenfalls mTOR, mLST8 und DEPTOR, daneben jedoch, anstelle von Raptor, Rictor (rapamycin-independent companion of mTOR) (145) sowie mSin1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein) (146) und Protor (protein observed with Rictor) (147). Ähnlich wie Raptor innerhalb des mTORC1-Komplexes, scheint Rictor, ebenso wie mSin1 (148), eine wesentliche Rolle bei der Interaktion von mTORC2 mit den jeweiligen Substraten zuzukommen. Die Funktion von Protor ist derzeit noch nicht klar definiert (125).

mTORC1



mTORC2

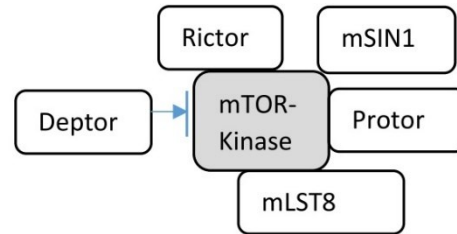


Abbildung 1: Schemazeichnung mTORC1, mTORC2

Abkürzungsverzeichnis: **Deptor** = DEP domain-containing mTOR-interacting protein, **mLST8** = mammalian lethal with SEC13 protein 8, **mSIN1** = mammalian stress-activated protein kinase interacting protein, **mTORC** = mTOR-Complex, **PRAS40** = proline-rich Akt substrate of 40 kDA, **Protor** = protein observed with Rictor, **Raptor** = regulatory-associated protein of mTOR, **Rictor** = rapamycin-independent companion of mTOR

In die **Regulation der Aktivität von mTORC1** spielen in der Hauptsache vier verschiedene Größen eine entscheidende Rolle: das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren, eine Nährstoffversorgung mit beispielsweise Aminosäuren, ausreichende intrazelluläre Energiespeicher sowie das Vorliegen eventueller Zellschäden. Die meisten dieser Einflussfaktoren münden in ihren unterschiedlichen Signalwegen in zwei Regulatoren, die mTORC1 unmittelbar vorgeschaltet sind: Rheb und TSC1/2.

Rheb ist ein zytoplasmatisches G-Protein mit intrinsischer GTPase Aktivität und ist innerhalb der Kaskade mTORC1 direkt vorgeschaltet. In aktiviertem Zustand hält es GPT gebunden und ist in der Lage, die Bindung von S6K1/2 und 4E-BP1 an mTORC1 zu erleichtern und dadurch dessen Kinase-Aktivität zu steuern (149-151).

Die Aktivität von Rheb wiederum wird maßgeblich durch den, der Zellmembran anliegenden, **TSC** (tuberous sclerosis complex) beeinflusst (152, 153), bestehend aus TSC1 (Hamartin), sowie TSC2 (Tuberin). Hypophosphoryliertes

TSC2 fungiert als GTPase aktivierendes Protein (GAP) und führt Rheb aus dem GTP-bindenden und damit aktiven Zustand, in seine GDP-Form über (151). Dadurch inaktiviertes Rheb ist nun nicht in der Lage, die Kinaseaktivität von mTORC1 zu unterstützen.

Die Steuerung von mTORC1 über **Wachstumsfaktoren** wie den Insulin-like-growth-factor (IGF), epidermal-growth-factor (EGF), platelet-derived-growth-factor (PDGF) und vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) beginnt mit deren Bindung an korrespondierende Tyrosinkinase-Rezeptoren an der Zelloberfläche (154, 155). Diese Aktivierung der Tyrosinkinase-Rezeptoren führt zu einer Phosphorylierung der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) an deren regulatorischer p85- α Untereinheit. Daneben ist auch Insulin in der Lage, vermittelt über den Insulinrezeptor und IRS1, PI3K zu aktivieren (156-158). PI3K phosphoryliert in Folge Phosphatidylinositol Bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol Triphosphat (PIP_3). PIP_3 wiederum vermittelt über PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) eine Phosphorylierung an Thr³⁰⁸ und damit Aktivierung von Akt, auch bekannt als Proteinkinase B (154). Die Aktivität von PI3K wird antagonisiert durch PTEN (phosphatase and tensin homolog), einer als Tumorsuppressor fungierenden Phosphatase, welche PIP_3 zu PIP_2 dephosphoryliert (159). Die aktivierte Proteinkinase B (Akt) hebt nachfolgend die Aktivität von zwei negativen Regulatoren der mTORC1 Aktivität auf: TSC2 sowie PRAS40. Eine Phosphorylierung von TSC2 durch Akt (160) führt zu dessen Translokation von der Zellmembran ins Zytosol und damit Loslösung von sowohl TSC1, als auch Rheb (161). Die hemmende Wirkung auf Rheb entfällt, und dieses liegt somit vermehrt im GTP-gebundenen, aktiven Zustand vor. Die Phosphorylierung von PRAS40 durch Akt wiederum hat eine Lösung dieses Proteins aus dem mTOR-1 Komplex zu Folge und hebt den inhibierenden Effekt von PRAS40 auf (140, 142). Daneben beeinflusst Akt auch über weitere Pathways Zellproliferation und Zellüberleben, wie beispielsweise über die Hemmung proapoptotischer Proteine wie BAD oder die Förderung der MDM2 vermittelte Degradation des Tumorsuppressors p53 (162).

Eine Steuerung der mTORC1-Aktivität durch **Aminosäuren** geschieht hingegen unabhängig von TSC2 (163) und maßgeblich über die so genannte Rag-Familie

kleiner zytoplasmatischer G-Proteine (164). Aufgenommene, innerhalb von Lysosomen befindliche Aminosäuren, steuern über einen „Regulator“ genannten Proteinkomplex die Überführung von inaktiven, GDP-beladenen Rag-Heterodimere in ihre aktiven, GTP-beladenen Formen. Diese wiederum sind nun in der Lage, an Raptor zu binden und eine Translokation von mTORC1 an die lysosomale Membran zu vermitteln, wo nachfolgend die Interaktion von mTORC1 mit Rheb stattfindet (165-168).

Das Vorliegen ausreichender **intrazellulärer Energiespeicher** stellt einen weiteren maßgeblichen Einflussfaktor auf die Aktivität von mTORC1 dar. Niedrige Energiereserven und damit einhergehende hohe AMP- und ADP-Spiegel führen zu einer LKB1 vermittelten Phosphorylierung von AMPK (AMP-activated protein kinase) (169) und Verhindern zugleich deren Inaktivierung durch Phosphatasen (170). Eine Erhöhung der ATP-Spiegel und damit ausreichende intrazelluläre Energiespeicher führen hingegen zu einer Dephosphorylierung und damit Inaktivierung von AMPK (170). AMPK ist in der Lage, über eine Phosphorylierung von TSC2 dessen Aktivität zu steuern (171) sowie durch die Phosphorylierung von Raptor die mTORC1 Aktivität direkt zu beeinflussen (172). Die geschilderten Mechanismen führen zu einer Reduktion der mTORC1 Aktivität und damit von Zellteilung und -Proliferation in Zeiten reduzierter Energiereserven. Zuletzt werden, einerseits durch den Wegfall der hemmenden Wirkung von mTORC1 auf ULK1/2 (unc-51 like autophagy activating kinase 1/2), andererseits durch die direkte Phosphorylierung von ULK1/2 durch AMPK, autophagische Prozesse initiiert (173).

Hypoxie führt über eine Erhöhung von HIF-1 α zur verstärkten Synthese von u.a. REDD1 (regulated in development and DNA damage responses 1), einem Protein, welches in der Lage ist, TSC2 zu aktivieren und dadurch ebenfalls einen hemmenden Effekt auf mTORC1 entfaltet (174).

Ein **DNA-Schaden** führt zur Aktivierung von p53, welches einerseits AMPK aktiviert (175) und andererseits zu einer verstärkten Transkription von PTEN führt (176).

Die Phosphorylierung und damit **Aktivierung von mTORC1**, meist an Ser²⁴⁴⁸ (177), führt nunmehr zu einer Aktivierung von im Wesentlichen zwei nachgeschalteten Signalwegen, die für die Regulation von Zellwachstum und Zellproliferation sowie Aufrechterhaltung der Homöostase von wesentlicher Bedeutung sind. Durch die Phosphorylierung von 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor binding protein-1) durch mTORC1 kommt es zu dessen Dissoziation von eIF-4E (eukaryotic initiation factor 4E) (178, 179). Dadurch aktiviertes eIF-4E initiiert nun via weiterer, zwischengeschalteter Faktoren, die Translation von mRNA für Proteine wie Cyclin D1 (180), VEGF, FGF (Fibroblast Growth Factor), und HIF-1 α (181). Damit wird über die mTOR-Kaskade und den u.a. Cyclin-D1 vermittelten Übergang der G1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase einerseits ein direkter Einfluss auf die Zellproliferation ausgeübt (182, 183) und andererseits via VEGF und HIF-1 α Angiogenese und das Zellüberleben im hypoxischen Milieu beeinflusst. Der zweite von mTORC1 gesteuerte Signalweg wird über die Phosphorylierung und damit Aktivierung der S6K1 (S6 kinase 1) vermittelt, welche das Protein 6 der 40S ribosomalen Untereinheit phosphoryliert, was eine gesteigerte Translation von mRNA, beispielsweise für ribosomale Proteine (184), zur Folge hat. Zudem erfolgt eine verstärkte Translation von Transportproteinen wie LAT1 für Aminosäuren sowie GLUT1 für Glucose (185). Daneben entfaltet S6K1 über die Phosphorylierung und den nachfolgenden proteosomalen Abbau von IRS1 (Insulin Rezeptor Substrat 1) eine hemmende Wirkung im Sinne eines negativen Feed-back auf PI3K und damit Akt. Hierbei konnte jedoch auch der umgekehrte Effekt beobachtet werden: Bei längerer Anwendung von mTOR-Inhibitoren kam es zu einer Aufhebung des negativen Feed-back und damit zu einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges, welcher eine erhöhte Aktivität von mTOR zur Folge hatte. Der therapeutische Effekt der mTOR-Inhibitoren ließ in Folge nach (186). Daneben bewirkt mTORC1 unter nährstoffreichen Bedingungen über eine Phosphorylierung der Unc-51-like kinase 1 bzw. 2 (ULK1/2) eine Hemmung autophagischer Prozesse (187, 188). Bei Nährstoffmangel oder dem Einsatz von mTOR-Inhibitoren wird dieser Effekt aufgehoben.

Im Vergleich zu mTORC1 gilt **mTORC2** als der noch weniger gut verstandene Komplex, auch wenn inzwischen einige wesentliche Mechanismen aufgedeckt werden konnten. Die Aktivität von mTORC2 wird im Wesentlichen über Wachstumsfaktoren wie beispielsweise IGF-1 und nachfolgend PI3K gesteuert (189). Über eine Phosphorylierung von Akt an Ser⁴⁷³ (189) sowie der SGK1 (190) durch mTORC2 wiederum wird eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise FoxO (Forkhead Box O), beeinflusst (191). FoxO spielt als Transkriptionsfaktor von proapoptischen Genen wie FasL und Bim sowie Regulatoren des Zellzyklus wie p27Kip1 eine wesentliche Rolle im Rahmen der Tumorsuppression und wird in seiner Funktion durch Akt bzw. SGK1 gehemmt (191-193). Daneben scheint auch die Phosphorylierung von Akt durch PDK1 an Thr³⁰⁸ durch mTORC2 erleichtert und damit die Aktivierung der mTORC1 gebahnt zu werden (189). Über die Aktivierung von PKC α (Protein Kinase C Alpha) übt mTORC2 zudem einen Einfluss auf Zellpolarität und das Aktin-Zytoskelett aus (145, 194).

Die pharmakologische Muttersubstanz **Rapamycin** bindet als Inhibitor von mTOR intrazellulär an das FK506-binding Protein 12 (FKBP-12) (195) und bildet gemeinsam mit diesem einen inhibitorischen Komplex. Dieser ist in der Lage an die FKBP12-rapamycin-binding- (FRB-) Domäne am C-Terminus des mTORC1-Proteins zu binden (195) und eine Assoziation von mTOR mit Raptor zu verhindern (196). Da Raptor als Bindungsstelle für S6K1 und 4E-BP1 fungiert und dadurch essentiell für die Kinasefunktion von mTOR ist, wird somit die Enzymfunktion von mTOR blockiert (197). Während die hemmende Wirkung von Rapamycin auf mTORC1 klar gezeigt werden konnte, wurde zunächst angenommen, dass die mTORC2-Aktivität hiervon unberührt bliebe (198). Eine verlängerte Behandlung mit Rapamycin scheint jedoch auch die Expression von mTORC2 zu beeinflussen (199).

Zusammenfassend wird deutlich, dass unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, einer adäquaten Versorgung mit Nährstoffen wie Aminosäuren sowie ausreichend großen intrazellulären Energiespeichern via mTORC1 einer weiterführenden Sicherung der Nährstoffversorgung durch Hochregulation von Transportproteinen und Angiogenese gewährleistet wird und

Zellwachstum und Zellproliferation initiiert werden. Eine nicht ausreichende Energieversorgung, Hypoxie oder DNA-Schäden führen zu einer Verlangsamung intrazellulären Prozesse und in letzter Konsequenz auch zur Autophagie.

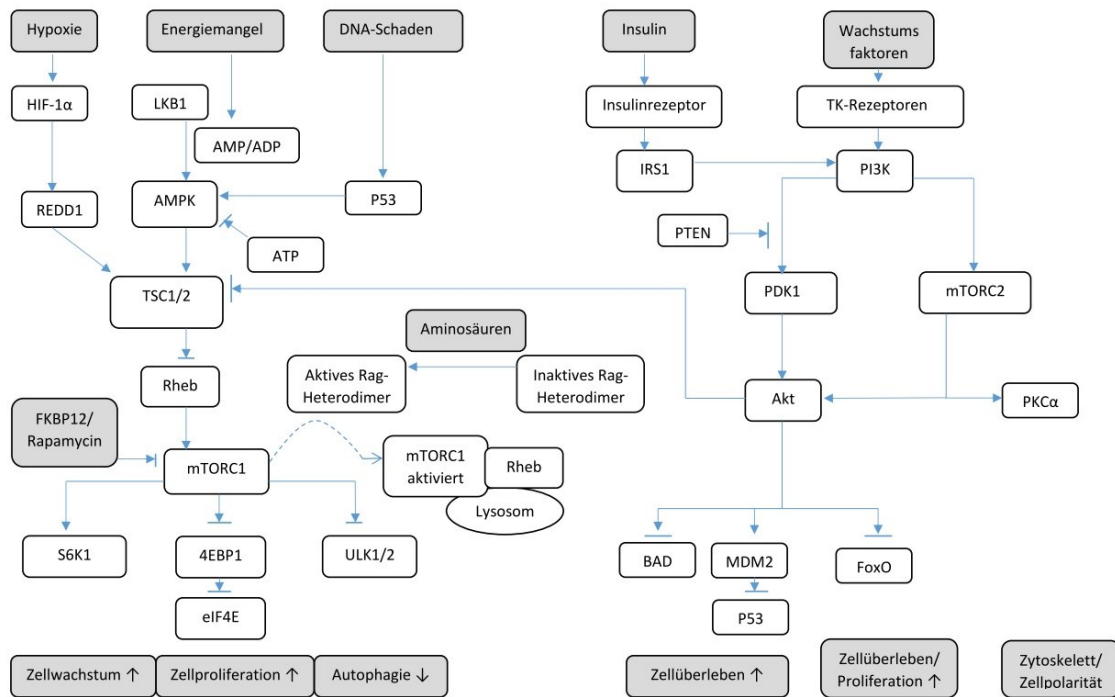


Abbildung 2: Flussdiagramm mTOR-Pathway

Abkürzungsverzeichnis: **4E-BP1** = eukaryotic initiation factor binding protein-1, **ADP** = Adenosindiphosphat, **Akt** = syn.: Proteinkinase B, **AMP** = Adenosinmonophosphat, **AMPK** = Adenosinmonophosphat Kinase, **ATP** = Adenosintriphosphat, **BAD** = BCL2 associated agonist of cell death, **DNA** = deoxyribonucleic acid, **eIF-4E** = eukaryotic initiation factor 4E, **FoxO** = forkhead box O, **FKBP12** = FK binding Protein 12, **HIF** = Hypoxie induzierter Faktor, **IRS1** = Insulin Rezeptor Substrat 1, **LKB1** = liver kinase B1, **MDM2** = Mouse double minute 2 homolog, **mTOR** = mammalian/mechanistic Target of Rapamycin, **mTORC** = mTOR-Complex, **p53** = tumor protein p53, **PDK1** = 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, **PI3K** = Phosphatidylinositol 3-kinase, **PKCα** = protein kinase C alpha, **PTEN** = phosphatase and tensin homolog, **REDD1** = regulated in development and DNA damage responses 1, **Rheb** = Ras homologue enriched in brain, **S6K1** = S6 kinase 1, **TK-Rezeptor** = Tyrosinkinase-Rezeptor, **TSC1** = tuberous sclerosis complex 1 bzw. Tuberin, **TSC2** = tuberous sclerosis complex 2 bzw. Hamartin, **ULK1/2** = unc-51 like autophagy activating kinase 1/2

1.2.3.2 Genetische Alterationen

Als Ursache für eine verstärkte Aktivierung des mTOR-Pathways spielen u.a. genetische Alterationen innerhalb des PI3K/AKT/mTOR-Pathways bei der Entstehung einer Vielzahl von Tumoren eine wesentliche Rolle (200).

Veränderungen können hierbei prinzipiell an beinahe jeder Stelle der Kaskade auftreten.

PI3K. Das PIK3CA-Gen kodiert für die katalytische Untereinheit p110 α von PI3K. Aktivierende Mutationen innerhalb dieses Onkogens stellen mit die am häufigsten zu beobachtenden Alteration bei malignen Tumoren dar (200-203). Mutationen im PI3KR1-Gen hingegen können in selteneren Fällen zu einer Veränderung der regulatorische Untereinheit p85 α führen, was wiederum eine Aktivierung von p110 nach sich zieht (204, 205).

PTEN. Nach p53 ist PTEN, bezogen auf alle malignen Tumoren, das am zweithäufigsten alterierte Tumorsuppressorgen (205). Funktionsstörungen bzw. ein PTEN-Verlust können hierbei nicht nur als Folge von Mutationen oder Deletion innerhalb des Gens auftreten, sondern auch durch Promotermethylierung, Hemmung der Transkription oder posttranslationale Modifikation bedingt sein (205, 206).

Akt. Da Akt einen zentralen Baustein innerhalb der PI3K-Kaskade darstellt, wird eine verstärkte Expression durch Alterationen stromaufwärts gelegener Faktoren häufig beobachtet (207). Aktivierende Mutationen innerhalb des Akt-Gens selbst hingegen wurden bislang nur selten beschrieben (208).

TSC1/2. Mutationen innerhalb dieses Tumorsuppressorgens scheinen relativ selten aufzutreten, finden sich jedoch bei der Tuberösen Sklerose (203).

Rheb. Eine Überexpression von Rheb und damit verstärkte Aktivierung von mTORC1 konnte in verschiedenen malignen Tumoren nachgewiesen werden (203, 209). Auch Mutationen von Rheb, die zu einer verminderten Hemmbarkeit von Rheb durch TSC1/2 führen, wurden beschrieben (210).

mTOR. Während man früher noch annahm, dass mTOR selbst eher selten von Mutationen betroffen sei (211), wiesen neueste Forschungen auch Alterationen innerhalb der beiden mTOR-Komplexe nach (210, 212). Eine Reihe von Mutationen innerhalb der FAT-Domäne führen beispielsweise zu einer veränderten Bindung der negativ regulatorischen Komplexbestandteile DEPTOR

bzw. PRAS40 und führen somit zu einer erhöhten Aktivität von sowohl mTORC1, als auch mTORC2 (210, 213).

Analysen der Daten des Cancer Genome Atlas (TCGA) zeigten für **ccRCCs** Mutationen oder Amplifikationen von PIK3CA in 5%, PTEN-Verlust oder Mutation in 5%, Akt-Mutationen in 2% und mTOR-Mutationen in 6% der Fälle (205, 214). Während die Zahl genetischer Alterationen innerhalb der PI3K-Kaskade somit eher gering ist, ist deren Gesamtaktivität bei ccRCCs dennoch stark erhöht, was sich an hohen Spiegeln von phosphoryliertem Akt bzw. nachgeordneter Substrate ablesen lässt (215, 216). Die bei bis zu 90% (22) aller ccRCCs beobachtete VHL-Genmutation führt hierbei via nachgeschalteter Faktoren wie VEGF und PDGF zu einer Aktivierung des PI3K-Signalweges (siehe 1.2.1).

Auch für **pRCCs** ergaben Auswertungen des TCGA genetische Alterationen in 28% der Fälle, darunter PDK1, RAPTOR oder auch PTEN betreffende (205). Die bei pRCCs Typ 1 vermehrt auftretenden aktivierenden Mutationen von MET können dabei ebenfalls zu einer verstärkten Aktivierung des PI3K-Pathways führen (217). Der bei Typ 2 pRCCs auftretende Funktionsverlust der Fumarat-Hydratase und konsekutiver Anstieg von HIF1 α (218) führt, ähnlich wie bei ccRCCs, über den Hypoxie-induzierten-Pathway zur Aktivierung der PI3K-Kaskade.

Bei **chRCCs** wurden genetische Veränderungen innerhalb der Kaskade bei 32% der TCGA-Fälle beschrieben, darunter in 11% PTEN-Verluste oder Mutationen, sowie Alterationen von PDK1, AKT, TSC1/2 und mTOR (205, 219).

1.3 Fragestellung

Der Phosphorylierungsstatus des mTORC1 an mTOR Ser²⁴⁴⁸ stellt einen etablierten Marker für die Aktivität von mTOR bzw. des PI3K-Signalweges (220-222) dar. Während zahlreiche Untersuchungen zur mTOR-Aktivität in Bezug auf nicht metastasierte Nierenzelltumoren vorliegen (223-228), besteht im Hinblick auf eine differenzierte Betrachtung dieses zentralen Komplexes bei metastasierter Erkrankung ein Forschungsbedarf, welcher im Rahmen der hier vorliegende Untersuchung für ein besseres Verständnis einer mTOR Aktivierung beim metastasierten Nierenzellkarzinom untersucht wird.

Besondere Berücksichtigung sollen hierbei die folgenden Punkte erfassen:

1. Bedeutung einer Alteration des mTOR-Pathways anhand der immunhistochemischen Expressionsmuster von mTOR und p-mTOR bei Metastasen von Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu Primärtumoren und benignem Gewebe.
2. Rolle der mTOR-Expressionserhöhung im Vergleich zu dessen Hyperphosphorylierung in Anlehnung und Erweiterung an Kruck et al. (223).
3. Expressionsabweichungen zwischen unterschiedlichen Metastasierungslokalisationen im Hinblick auf eine vorliegende Tumorerheterogenität und deren Bedeutung für eine Therapie mit Hemmstoffen des mTOR-Pathways.
4. Zusammenhang der mTOR und p-mTOR Expression mit klinisch-pathologischen Charakteristika.
5. Einfluss der Expressionsmuster von mTOR und p-mTOR in Metastasen sowie weiterer klinisch-pathologischer Merkmale auf das Überleben von Patienten mit Nierenzellkarzinom.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektive und Datenerhebung

Aus einem Kollektiv von Patienten, bei welchen zwischen den Jahren 2002 und 2014 eine Resektion von Nierenzellkarzinometastasen durchgeführt wurde, beziehungsweise, welche Probiopsien ebendieser durchliefen, wurden im Rahmen einer Datenbankrecherche im Pathologischen Institut der Universität Tübingen geeignete Fälle ausgewählt. Eine Bewilligung zur Durchführung der Studie nach Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Tübingen lag vor (Studennummer 078/2012B02). Für insgesamt 91 Patienten wurden nachfolgend aus dem Patientenarchiv des Urologischen Instituts der Universität Tübingen die in im Anhang unter 7.4 einsehbarer Tabelle aufgeführten Parameter erhoben.

Für einen Vergleich der Expressionswerte von mTOR und p-mTOR aus der Analyse der feingeweblichen Metastasenproben mit benignem Gewebe und Gewebe aus Primärtumoren, wurde ein zweites Kollektiv, bestehend aus 64 Patienten, herangezogen. Mit Ausnahme von vier Patienten, die Teil beider Kollektive waren, wurden für das Kollektiv der benignen Proben und Primärtumoren keine klinischen Daten erhoben.

Eine ausführliche Beschreibung des Metastasenkollektivs, inklusive pathologischer und klinischer Charakteristika, findet sich in der Tabelle 7.4 im Anhang.

2.1.2 Untersuchungsmaterial

Aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Universität Tübingen wurden für die 91 Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom die zugehörigen, in Paraffin fixierten, Metastasenpräparate entnommen. Unter Zuhilfenahme der korrespondierenden Hämatoxylin-Eosin (HE) -gefärbten Schnitte wurden, für das

spätere Stenzen im Rahmen des TMA geeignete, Tumorareale mikroskopisch identifiziert und markiert.

Für das Kollektiv der 64 Patienten mit Proben benignen Nierenparenchyms und Primärtumoren konnte auf bereits vorgefertigte TMAs zurückgegriffen werden.

Insgesamt flossen in die Untersuchung Proben aus 168 Metastasen, 63 Primärtumoren sowie 54 benigne Nierengewebeproben ein.

2.2 Methoden

2.2.1 Tissue Microarray (TMA)

Die erstmals im Jahre 1998 durch Kononen et al. (229) beschriebene und heute weit verbreitete Technik des Tissue Microarray (TMA), erlaubt den direkten Vergleich einer großen Anzahl verschiedener Gewebeproben. Durch Einpflanzen von mehreren hundert Gewebeproben (229) in einen einzigen Paraffinblock, kann mittels eines TMA beispielsweise die immunhistochemische Expression eines bestimmten Proteins innerhalb dieser Gewebeproben untersucht werden, ohne dass eventuelle Unterschiede hinsichtlich der Färbequalität oder Umgebungstemperatur die Vergleichbarkeit der Ergebnisse maßgeblich beeinflussen. Auch für das Nierenzellkarzinom eröffneten sich hierdurch neue Möglichkeiten des Einsatzes einer zeit- und kosteneffizienten Technik, welche in der Lage ist, Diagnostik, Prognostik und letztlich auch die Therapie mit zu beeinflussen (230).

Das Erstellen des TMA erfolgte mittels des Tissue Arrayer MTA-1 der Firma Beecher Instruments (Beecher Instruments Incorporated, Wisconsin, United States of America). In einem ersten Schritt wurde durch eine, in einem Nadelhalter arretierte, 600µm dicke Hohladel ein 2mm tiefes Loch in den, als Empfänger dienenden, noch leeren Paraffinblock gestanzt. Mit einer zweiten, ebenfalls 600µm durchmessenden Hohladel, wurde nun ein 2mm langer Gewebekern aus einem der Metastasenblöcke entnommen. Die Auswahl desjenigen Areals, aus welchem die Entnahme stattfinden sollte, wurde unter Berücksichtigung des korrespondierenden HE-Schnittes und des darauf

eingezeichneten Tumorareals getroffen. Anschließend wurde der Metastasen Kern in den zuvor geschaffenen Hohlraum des Empfängerblockes eingebracht. Auf diese Weise wurden im Abstand von 800µm in der Vertikalen sowie Horizontalen, in Abhängigkeit von der Größe des Empfängerblocks, bis zu 132 Metastasenkerne in einen Paraffinblock eingebracht. Pro Patient beziehungsweise pro Lokalisation der Metastase wurden mindestens zwei solcher Kerne entnommen und nebeneinander in den Empfängerblock eingesetzt. Parallel hierzu wurden die Positionen der jeweiligen Metastasenkerne in einem Lageplan erfasst, anhand dessen die spätere Zuordnung möglich war. Um eine spätere Orientierung am immunhistochemisch gefärbten Schnitt zu erleichtern, wurde die rechte untere Ecke eines jeden Blockes mit Gewebekernen aus einem Leberresektat markiert. Durch nachfolgendes, kurzes Erhitzen der Blöcke wurde die Probenkerne in den Paraffinblöcken fixiert und für das spätere Schneiden stabilisiert.

Die nun folgenden Schritte der immunhistochemischen Färbungen wurden durchgeführt durch das Labor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Mittels Mikrotom wurden 5µm dicke Schnitte der Paraffinblöcke angefertigt und in einem 48°C warmen Wasserbad geglättet. Nach dem Aufziehen auf einen Objektträger wurden die Schnitte auf einer Wärmeplatte getrocknet. Auf diese Weise entstanden drei TMAs mit insgesamt 346 Gewebekernen aus unterschiedlichen Metastasenproben.

2.2.2 Immunhistochemie (IHC)

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem EnVision™ G|2 System/AP (Dako K5355, Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States of America) durchgeführt. Das System wird in einem Dreischritt-Verfahren eingesetzt, wobei Schritt eins die Inkubation der Probe mit einem verdünnten primären Maus- bzw. Kaninchen-Antikörper vorsieht, welcher an das Zielepitop (hier mTOR bzw. p-mTOR) bindet. Schritt zwei umfasst die Inkubation mit dem EnVision™ G|2, Rabbit/Mouse (LINK)-Reagenz, dessen Antikörper gegen die

zuvor applizierten Maus- bzw. Kaninchen-IgG-Antikörper gerichtet sind. Im letzten Schritt wird ein, mit alkalischer Phosphatase markiertes, Polymer zur Amplifikation hinzugefügt und diese Reaktion am Ende mit dem sog. Permanent Red Chromogen sichtbar gemacht.

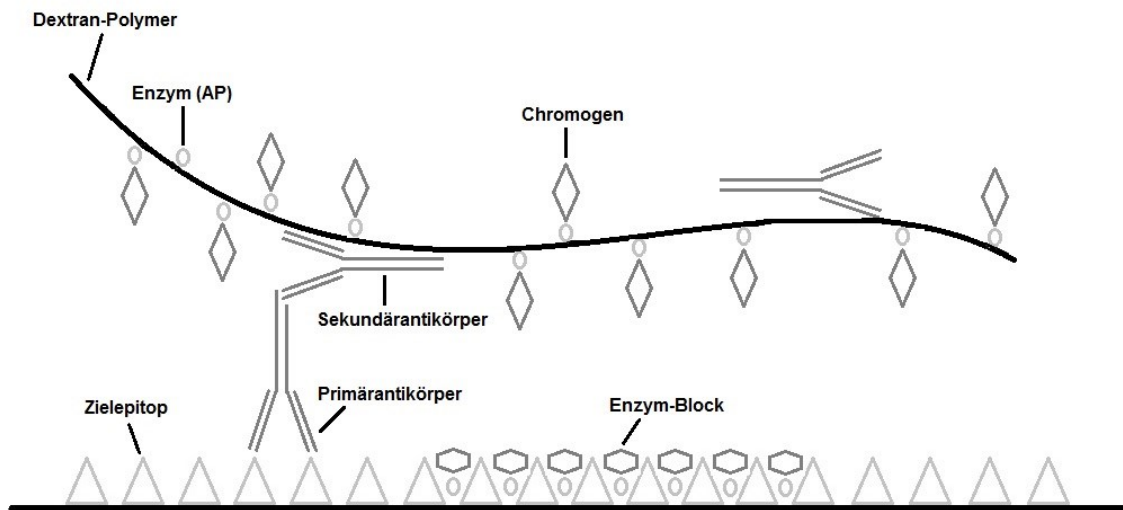


Abbildung 3: Schemazeichnung IHC Färbemethode

Vor Färbebeginn wurden die Schnitte für 30 Minuten bei 58°C in einem Wärmeschrank erwärmt, um das Paraffin abzuschmelzen. Die anschließende Rehydrierung erfolgte durch wiederholtes Einlegen der Schnitte in Xylol (dreimal 10min), 100% Ethanol (zweimal 7min), 96% Ethanol (zweimal 7min), 70% Ethanol (einmal 7min) und fünfminütiges Waschen mit destilliertem Wasser. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Schnitte für 30min in einem Citratpuffer bei einem pH von 6,0 in der Mikrowelle gekocht, anschließend für 30min bei Raumtemperatur abgekühlt und zweimal für 5min in TBST (Tris-buffered saline with Tween20) gewaschen. Durch zehnmünütiges Inkubieren mit dem Dual Endogenous Block (Dako S2003, Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States of America) wurde die Aktivität der endogenen Peroxidase, Pseudoperoxidase und Alkalischen Phosphatase gehemmt und eine

unspezifische bzw. falsch-positive Färbereaktion verhindert. Anschließend erfolgte das erneute Waschen für zweimal 5min in TBST. Der Primärantikörper für mTOR bzw. p-mTOR wurde im Verdünnungsmedium (Dako S0809, Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States of America) auf 1:50 verdünnt und die Schnitte damit bei 4°C über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Der Antikörper mTOR (7C10) Rabbit mAb #2983 (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, United States of America) detektiert hierbei den Gesamtlevel des exprimierten mTOR, der Antikörper Phospho-mTOR (Ser2448) (49F9) Rabbit mAb #2976 (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, United States of America) dagegen nur an der Position Ser2448 phosphoryliertes mTOR (p-mTOR). Danach erfolgte das neuerliche Waschen für dreimal 5min in TBST. Im Anschluss wurden die Schnitte für 30min mit dem LINK-Antikörper (EnVision™ G|2 System/AP, Dako K5355, Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States of America) inkubiert, erneut dreimal 5min in TBST gewaschen und in einem nächsten Schritt ebenfalls für 30min mit einem Alkalische-Phosphatase-Enzym (Enhacer, EnVision™ G|2 System/AP, Dako K5355, Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States of America) inkubiert. Auch hiernach erfolgte wiederum das dreimalige Waschen in TBST für 5min. Nach zwölfminütigem Inkubieren mit der Permanent Red Arbeitslösung (EnVision™ G|2 System/AP, Dako K5355, Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States of America) wiesen positive Proben die charakteristische rote Färbung auf. Anschließend erfolgte das zweimalige Spülen mit destilliertem Wasser für jeweils 5min. Die Gegenfärbung erfolgte durch eine Färbung mit Hämatoxylin nach Meyer für 25 Sekunden. Überflüssiges Hämatoxylin wurde in destilliertem Wasser abgespült und die Schnitte anschließend für 7min in Leitungswasser gebläut. Das abschließende Eindecken erfolgte mit Aquatex (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Als Positivkontrolle dienten Mammakarzinom bzw. Lungenkarzinom bei mTOR sowie Mammakarzinom, Kolonkarzinom und Urothelkarzinom bei p-mTOR. Färbungen erwiesen sich bei positivem mTOR zytoplasmatisch rot, bei positivem p-mTOR zytoplasmatisch leuchtend rot. Negativkontrollen wiesen keine Färbung auf.

2.3 Auswertung

2.3.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die einzelnen gefärbten Objektträger und jeweiligen Negativkontrollen wurden mittels des Miramax-Desk-Scanner (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) eingescannt und als virtuelles Abbild gespeichert. Die digitale Auswertung am Computer erfolgte durch zwei unabhängige Prüfer mittels der Aperio ImageScope Software (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland).

In insgesamt vier Abstufungsgraden wurde dabei einerseits die Färbeintensität bewertet (0 = keine Färbung, 1 = leichte Färbung, 2 = mäßige Färbung, 3 = starke Färbung) sowie andererseits das Färbeausmaß, d.h. die Anzahl gefärbter Zellen in Prozent (0%=keine gefärbten Zellen, 100%=alle Zellen gefärbt) bestimmt. Für das Färbeausmaß fanden in den Färbungen der Metastasen sämtliche, der Metastase zuzuordnenden, Zellen Berücksichtigung. Ebendieses Prinzip galt auch für die Färbungen der primären Nierenzelltumoren. Bei der Einschätzung der benignen Proben wurde die Auswertung auf die Zellen des proximalen Tubulus beschränkt. Färbeunterschiede in einzelnen Zellkompartimenten konnten nur unzureichend differenziert werden, sodass sich die Auswertung auf das zytoplasmatische Färbemuster beschränkte. Durch Multiplikation der Färbeintensität (0-3) und des Färbeausmaßes (0 bis 100%) ergab sich für jede gefärbte Probe ein IHC- Expressionsscore zwischen 0 und 300. Dieser wurde, aufgeschlüsselt nach Patient sowie gegebenenfalls Metastasenlokalisierung, in tabellarischer Form festgehalten. Falls mehrere Färbungen für eine Metastasenlokalisierung vorlagen, wurde das arithmetische Mittel der Expressionsscores berechnet. Ebenso wurde, falls mehrere Metastasenlokalisationen pro Patient vorlagen, ein Gesamtscore pro Patient bestimmt, der als arithmetisches Mittel der jeweiligen Metastasenexpressionsmuster berechnet wurde.

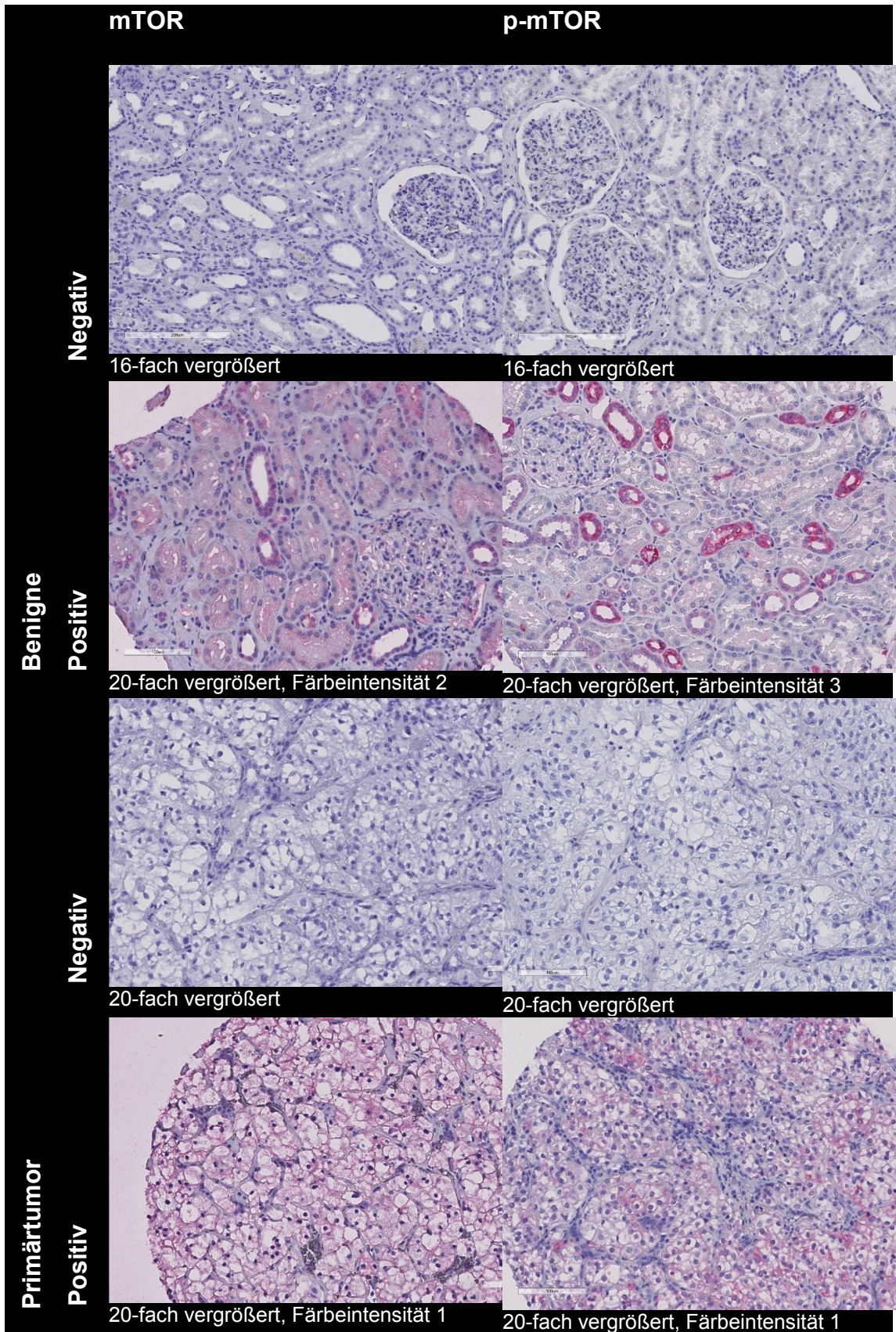


Abbildung 4: Färbebeispiele benignes Nierengewebe und primäres RCC

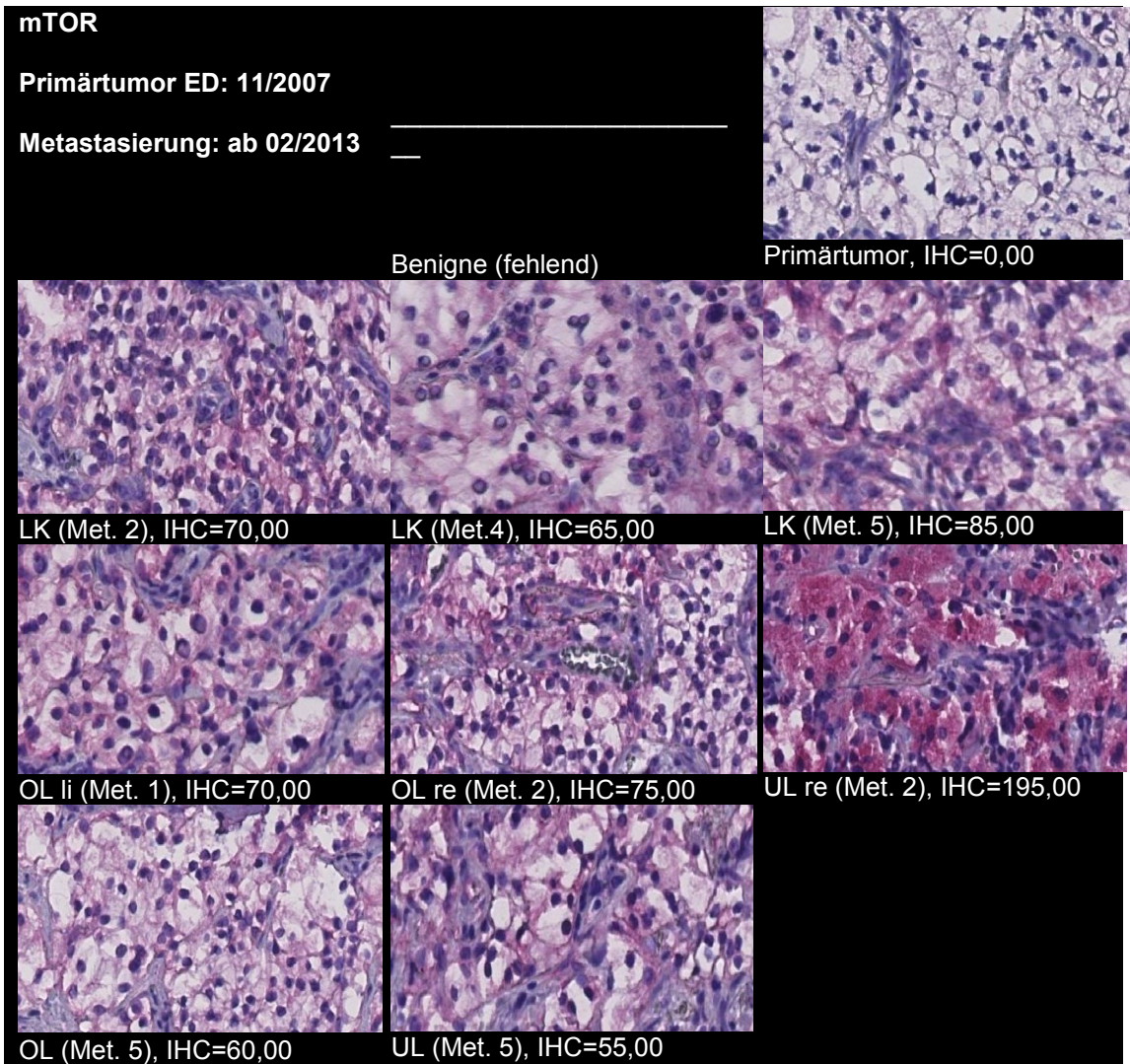


Abbildung 5: Färbebeispiel Fall 004 – Übersicht mTOR

Abkürzungsverzeichnis: **ED**=Erstdiagnose, **IHC**=Immunhistochemischer Expressionswert, **li**=links, **LK**=Lymphknotenmetastase, **Met**=Metastase, **OL**=Lungenoberlappen, **re**=rechts, **UL**=Lungenunterlappen

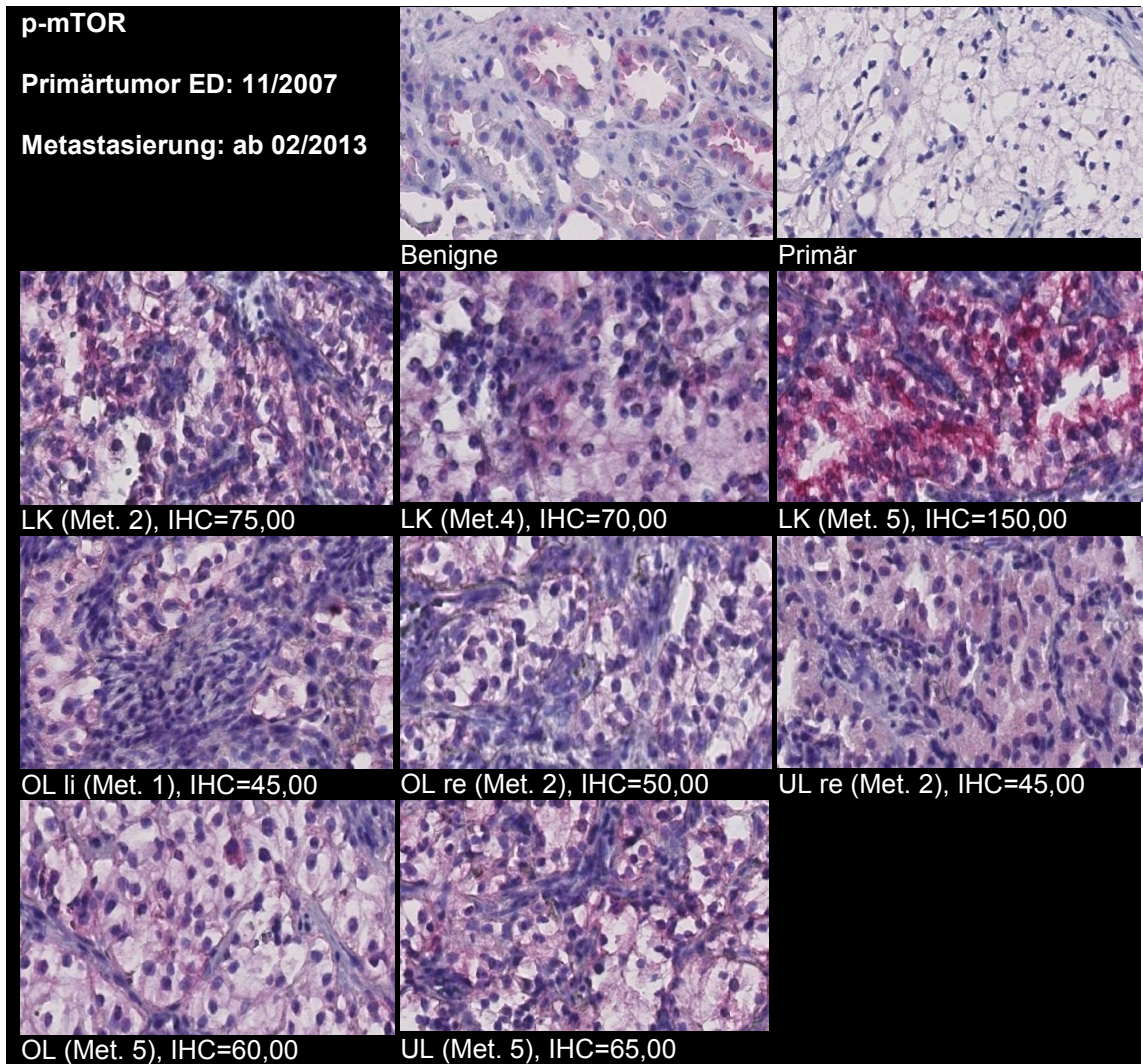


Abbildung 6: Färbebeispiel Fall 004 – Übersicht p-mTOR

Abkürzungsverzeichnis: **ED**=Erstdiagnose, **IHC**=Immunhistochemischer Expressionswert, **li**=links, **LK**=Lymphknotenmetastase, **Met**=Metastase, **OL**=Lungenoberlappen, **re**=rechts, **UL**=Lungenunterlappen

2.3.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der IBM SPSS Statistics Software Version 23 (IBM, Armonk, New York, United States of America). Aufgrund der in aller Regel nicht normalverteilten Daten wurde, sofern nicht anders angegeben, mit dem Median und dem Interquartilsrange (IQR) gearbeitet. Eventuelle Normalverteilung wurde anhand des Shapiro-Wilk Tests überprüft. Für die Expressionsanalyse wurde mit den Mittelwerten der Färbungen pro Metastase gerechnet, während in allen folgenden Schritten, d.h. der Korrelation mit

klinischen Daten, der Überlebensanalyse sowie der Cox-Regression, die Expressionswerte gemittelt pro Patient verwendet wurden. Die direkten Expressionsvergleiche wurden mittels Kruskal-Wallis Analyse und nachfolgender Mann-Whitney-U Tests durchgeführt. Für die Korrelation der Expressionsscores mit klinisch-pathologischen Patientendaten wurde der Chi-Square Test verwendet. Eingeteilt wurden die Expressionsscores bzw. die Ratio in je eine Gruppe, welche Werte oberhalb des für alle Patienten berechneten Medians aufwies, und eine, deren Werte gleich des Medians waren oder darunterlagen. Für die Bestimmung der Signifikanz wurde, da es sich, mit Ausnahme der Betrachtung der MSKCC-Gruppe, um einen Chi-Square-Test mit dem Freiheitsgrad $df=1$ handelte, die Korrektur nach Yates verwendet. Bei der Analyse des Zusammenhangs mit der MSKCC-Gruppe fand der p-Wert nach Pearson Verwendung. Überlebensanalysen in Bezug auf die Expressionswerte wurden anhand von Kaplan-Maier Analysen durchgeführt und eventuelle Signifikanzen mittels Logrank-Test überprüft. Von der Kaplan-Maier Analyse ausgeschlossen wurden im Vorfeld jene sechs Patienten, zu denen keine ausreichenden Daten hinsichtlich des Zeitpunkts der Erstdiagnose bzw. des Rezidiv- oder Sterbedatums vorlagen. In einem Cox-Regressionsmodell wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf das OS sowie CSS uni- bzw. multivariat überprüft. Da bei 6 Patienten keine Follow-up Daten vorlagen, wurden diese aus diesem Auswertungsteil exkludiert.

3 Ergebnisse

3.1 Betrachtung des Patientenkollektivs

Die 91 untersuchten Patienten mit metastasierter Erkrankung verteilten sich zu 75,8% auf Männern und zu 24,2% auf Frauen. Im Median erkrankten die Patienten erstmals im Alter von 61,00 Jahren (IQR = 15,12) an einem Nierenzellkarzinom.

Insgesamt lag das mediane Alter zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von Metastasen bei 65,11 (13,30) Jahren, wobei 29,7% der Patienten eine synchron metastasierte Erkrankung aufwiesen. Während zu 5,5% der Patienten hierzu die entsprechenden Informationen fehlten, entwickelten eine Mehrheit von 64,8 % erst im Krankheitsverlauf Metastasen, welche im Median nach 44,71 (70,51) Monaten auftraten.

Bei 71 (78,0%) Patienten umfasste das Metastasierungsgeschehen mehrere Organsysteme, lediglich bei 20 (22,0%) Fällen war maximal ein Organsystem involviert.

Bei einer Aufgliederung der Metastasierungslokalisationen in Patienten mit ausschließlichen Metastasen in Lunge und/oder Lymphknoten und solchen mit, unter anderem, Metastasen in Leber und Knochen, ließen sich 13 Patienten ersterer und 44 Patienten letzterer Kategorie zuordnen.

Während des medianen Follow-up Zeitraums von 68,58 (IQR = 79,24) Monaten verstarben insgesamt 30 (33%) der 91 Patienten, 56 (61,5%) waren zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups noch am Leben und zu 5 (5,5%) lagen keine Follow-up Daten vor. Von den 30 Todesfällen wurden 28 (93,33%) als RCC abhängig betrachtet und einer (3,33%) war nicht mit der Krebserkrankung assoziiert. Zu einem weiteren Fall (3,33%) konnte diesbezüglich keine eindeutige Aussage getroffen werden.

3.2 Expressionsanalysen

3.2.1 Vergleich der mTOR und p-mTOR Expression sowie der Ratio in benignem Gewebe, Primärtumoren und Metastasen

Im Median (IQR) wiesen die benignen Proben einen mTOR IHC-Score von 130,00 (90,00) auf. Primäre Tumoren lagen mit einem Median von 75,00 (70,00) deutlich darunter, wohingegen Metastasen einen medianen Score von 140,00 (115,00) erreichten.

Die p-mTOR Expression lag bei den benignen Fällen bei 60,00 (60,00). Auch hier wiesen die Primärtumoren mit 40,00 (55,00) den geringsten, Metastasen mit 102,50 (111,30) den höchsten Median auf.

Bei der Betrachtung des Verhältnisses der Expressionen von p-mTOR zu mTOR, im Folgenden als Ratio bezeichnet, wiesen benigne Proben mit 0,5000 (0,4500) sowie Primärtumoren mit 0,5781 (0,6950) die geringeren Mediane auf. Für die Metastasen lag das mediane Verhältnis dagegen bei 0,8000 (0,6248).

Benigne	Parameter	Gesamtanzahl n=54 Gültig (%) / Fehlend (%)	Median (IQR)	MW (±SD)
	mTOR	50 (92,6) / 4 (7,4)	130,00 (90,00)	128,800 (58,7850)
	p-mTOR	52 (96,3) / 2 (3,7)	60,00 (60,00)	66,923 (48,3163)
	Ratio	49 (90,7) / 5 (9,3)	0,5000 (0,4500)	0,6042 (0,4520)

Tabelle 7: Expressionsanalyse benignes Nierengewebe

Primär	Parameter	Gesamtanzahl n=63 Gültig (%) / Fehlend (%)	Median (IQR)	MW (±SD)
	mTOR	58 (92,1) / 5 (7,9)	75,00 (70,00)	84,603 (53,5462)
	p-mTOR	59 (93,7) / 4 (6,3)	40,00 (55,00)	55,610 (53,4574)
	Ratio	56 (88,9) / 7 (11,1)	0,5781 (0,6950)	0,7644 (0,6881)

Tabelle 8: Expressionsanalyse Primärtumoren

Metastase	Parameter	Gesamtanzahl n=168 Gültig (%) / Fehlend (%)	Median (IQR)	MW (±SD)
	mTOR	156 (92,9) / 12 (7,1)	140,00 (115,00)	144,032 (73,9215)
	p-mTOR	158 (94,0) / 10 (6,0)	102,50 (111,30)	112,880 (75,4618)
	Ratio	156 (92,9) / 12 (7,1)	0,8000 (0,6248)	0,90000 (0,9078)

Tabelle 9: Expressionsanalyse Metastasen

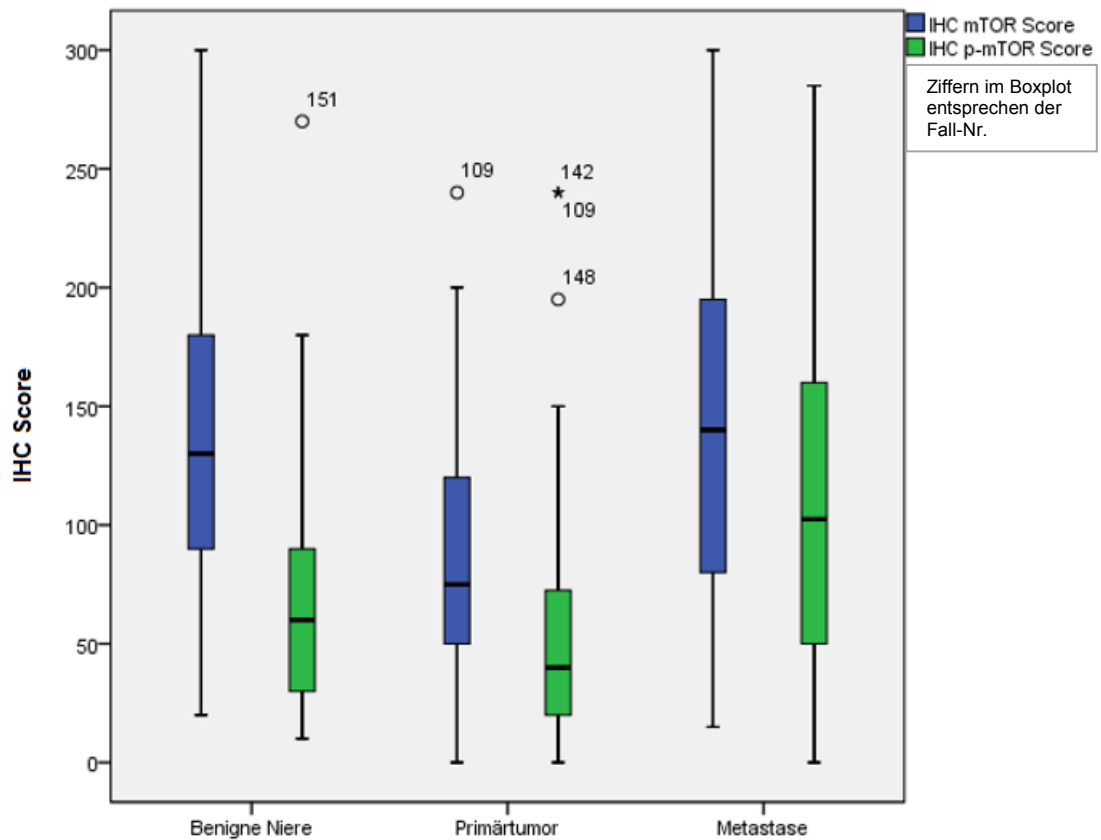


Abbildung 7: Boxplot mTOR und p-mTOR IHC-Score nach Ursprungsgewebe

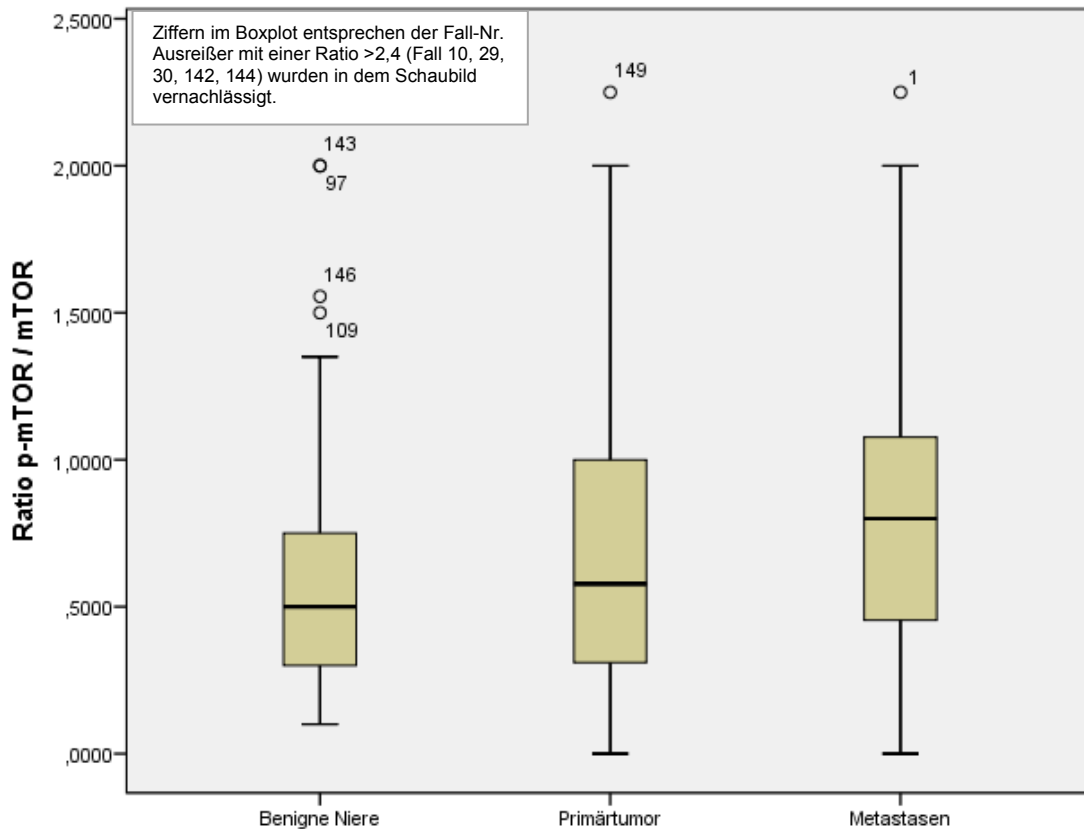


Abbildung 8: Boxplot Ratio nach Ursprungsgewebe

Da eine Überprüfung der Ergebnisse auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test mit Ausnahme der mTOR-Expression im benignen Gewebe ($p=0,057$), auf nicht normalverteilte Daten schließen ließ (p -mTOR für benignes Gewebe: $p=0,002$, alle anderen: $p<0,001$), wurde im Folgenden mit den Medianen sowie Tests für nicht-normalverteilte Daten ausgewertet.

Für jeden der drei Parameter mTOR, p -mTOR sowie Ratio, wies eine Kruskal-Wallis-Analyse auf Signifikanz der unterschiedlichen Ausprägungsniveaus zwischen benignen Proben, Primärtumoren sowie Metastasen hin ($p<0,001$ bzw. $p<0,001$ bzw. $p=0,002$), wobei in Zusammenhang mit diesem Test die drei Gruppen als unzusammenhängend betrachtet worden sind.

Zur Feststellung, zwischen welchen Gruppen diese Signifikanzen vorlagen, wurden für die im Anschluss durchgeführten Mann-Whitney-Tests das Basis-

Signifikanzniveau von $p < 0,05$ durch die Anzahl der jeweils notwendigen drei Testungen dividiert, um hier für multiple Testungen zu adjustieren. Es ergab sich somit ein neues Signifikanzniveau von $p < 0,0167$.

Beim Vergleich der Expressionsniveaus benigner Proben mit jenen aus Primärtumoren, konnte lediglich für die in benignen Proben höhere mTOR-Expression ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) festgestellt werden. Die Expressionen von p-mTOR bzw. das Verhältnis von p-mTOR zu mTOR unterschied sich dagegen nicht signifikant ($p = 0,039$ bzw. $p = 0,332$).

Metastasen wiesen sowohl gegenüber benignem Gewebe als auch Primärtumoren ein signifikant höheres p-mTOR-Expressionsmuster auf (jeweils $p < 0,001$). Hinsichtlich der mTOR-Expression zeigten Metastasen signifikant höhere Expressionsmuster im Vergleich zu Primärtumoren ($p < 0,001$), wohingegen sich Metastasen und benignes Gewebe nicht signifikant unterschieden ($p = 0,382$). Bei der Betrachtung der Ratio wurde die Signifikanz des erhöhten p-mTOR zu mTOR Verhältnisses für den Vergleich von Metastasen zu benignem Gewebe bestätigt ($p = 0,001$). Der Unterschied zwischen Metastasen und Primärtumoren erwies sich demgegenüber als nicht signifikant ($p = 0,047$).

Mann-Whitney Test			
p-Wert / Signifikanz	Met. vs. Primär	Met. vs. Benigne	Benigne vs. Primär
mTOR	< 0,001*	0,382	< 0,001*
p-mTOR	< 0,001*	< 0,001*	0,039
Ratio	0,047	0,001*	0,332

Tabelle 10: Mann-Whitney Test, (*) adjustiertes Signifikanzniveau ($p < 0,0167$)

In einer Untersuchung der Rangkorrelation nach Spearman zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der mTOR sowie p-mTOR Expression in Metastasen ($r = 0,578$, $p < 0,001$) und Primärtumoren ($r = 0,512$, $p < 0,001$) sowie ein geringerer Zusammenhang für das benigne Gewebe ($r = 0,396$, $p = 0,005$).

3.2.2 Expressionsanalysen innerhalb des Metastasenkollektivs

Nachfolgend wurden die 168 analysierten Metastasen gemäß ihrer Lokalisation aufgeführt und in 22 verschiedenen Lokalisationsgruppen zusammengefasst. Zu zwei der untersuchten Metastasen konnte eine genaue Lokalisation nicht ermittelt werden, und sie wurden einer eigenen Kategorie zugeführt. Eine detaillierte Auflistung sämtlicher lokalisationsbezogener Expressionsstatus findet sich in Tabelle unter 7.5 im Anhang. Für den Vergleich der Expressionsniveaus hinsichtlich ihrer Lokalisationen wurde im Folgenden der Median als Bezugsgröße verwendet. In der angefügten Auswertungstabelle werden der Vollständigkeit halber dennoch Mittelwert sowie Standardabweichung mit angegeben.

Mit insgesamt 42 Fällen (25,00%) war die Gruppe der Lungenmetastasen am stärksten repräsentiert. Auch Knochenmetastasen mit 21 Fällen (12,5%), Lymphknotenmetastasen mit 20 Fällen (11,90%) und 11 Metastasen der Nebenniere (6,55%) stellten zahlenmäßig größere Gruppen dar. Die vielfältigen Weichgewebismetastasen wurden in einer Gruppe mit insgesamt 29 Fällen (17,26%) zusammengefasst. Zu den ungewöhnlicheren Metastasierungslokalisationen zählten u.a. die Schilddrüse mit zwei Fällen (1,19%) sowie Milz, Hoden und Uterus mit je einer Metastase (je 0,60%).

Bei der Betrachtung der Expressionsniveaus in Bezug auf die verschiedenen Lokalisationen, wiesen für **mTOR** die Metastase im Mediastinum mit 270,99, jene im Grenzstrang mit 255,00 und die Milzmetastase mit 240,00 die höchsten IHC-Werte auf. Die niedrigsten Werte ergaben sich im Median der fünf Pankreasmetastasen mit 50,00, der Uterusmetastase mit 50,00 und der Hodenmetastase mit 80,00. Bezieht man nur Lokalisationen mit mindestens fünf gültigen Proben mit ein, so ist die mTOR-Expression in den Nebennierenmetastasen mit einem Median von 180,00 (135,00) am höchsten, gefolgt von den Lokalrezidiven mit 172,50 (114,80) sowie den Lymphknotenmetastasen mit 150,00 (95,00). Die niedrigsten Expressionen zeigen sich in den Metastasen des Pankreas mit 50,00 (160,00) und der Knochen mit 120,00 (130,00). Expressionsmediane von 130,00 als drittschwächstem Wert wiesen Metastasen von Lunge, Leber und Weichgewebe auf.

Die hinsichtlich der Lokalisation höchsten **p-mTOR** Expressionswerte wiesen die Mesocolon- sowie Mediastinalmetastasen mit je 180,00 und wiederum die Grenzstrangemetase mit 270,00 auf. Die niedrigsten Werte fanden sich mit 20,00 in der Probe der Peritoneums-Metastase, der Omentum-Metastase mit 15,00 sowie der Hoden-Metastase mit 5,00. Bezieht man nur Lokalisationen mit mindestens fünf gültigen Proben mit ein, so ist die p-mTOR-Expression in Metastasen der Nebenniere mit einem Median von 140,00 (105,00) am höchsten, gefolgt von Lokalrezidiven mit 135,00 (182,50) sowie Weichgewebismetastasen mit 130,00 (110,00). Die niedrigsten medianen Expressionsniveaus zeigen sich in Metastasen des Pankreas mit 30,00 (182,50), Leber mit 45,00 (155,00) und Lunge mit 80,00 (80,00).

Die höchsten **Verhältnisse von p-mTOR zu mTOR** ergaben sich für die Metastase des Uterus mit 1,900, des Mesocolon mit 1,2857 sowie des Grenzstrangs mit 1,0588. Die niedrigsten Ratio-Werte wiesen mit 0,0625 die Hodenmetastase, mit 0,1429 die Peritonealmetastase und mit 0,1364 die Omentummetastase auf. Bezieht man nur Lokalisationen mit mindestens fünf gültigen Proben mit ein, so ergeben sich die höchsten Werte für die Ratio in Weichgewebismetastasen mit einem Median von 1,0000 (0,5084), Lokalrezidiven mit 0,9124 (0,7871) sowie Knochenmetastasen mit 0,8571 (0,8479). Die im Median niedrigsten Verhältnisse weisen Metastasen der Leber mit 0,6000 (0,5059), des Pankreas mit 0,6000 (0,7149) und der Nebenniere mit 0,7143 (0,5500) auf.

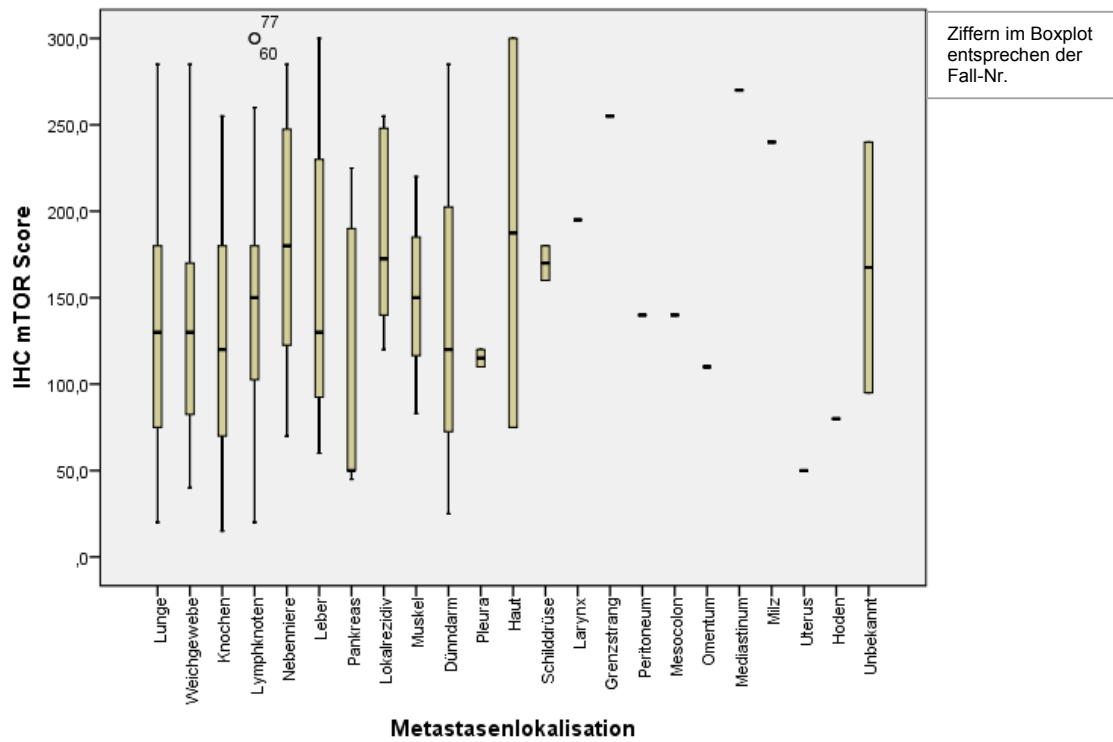


Abbildung 9: Boxplot mTOR nach Metastasenlokalisierung

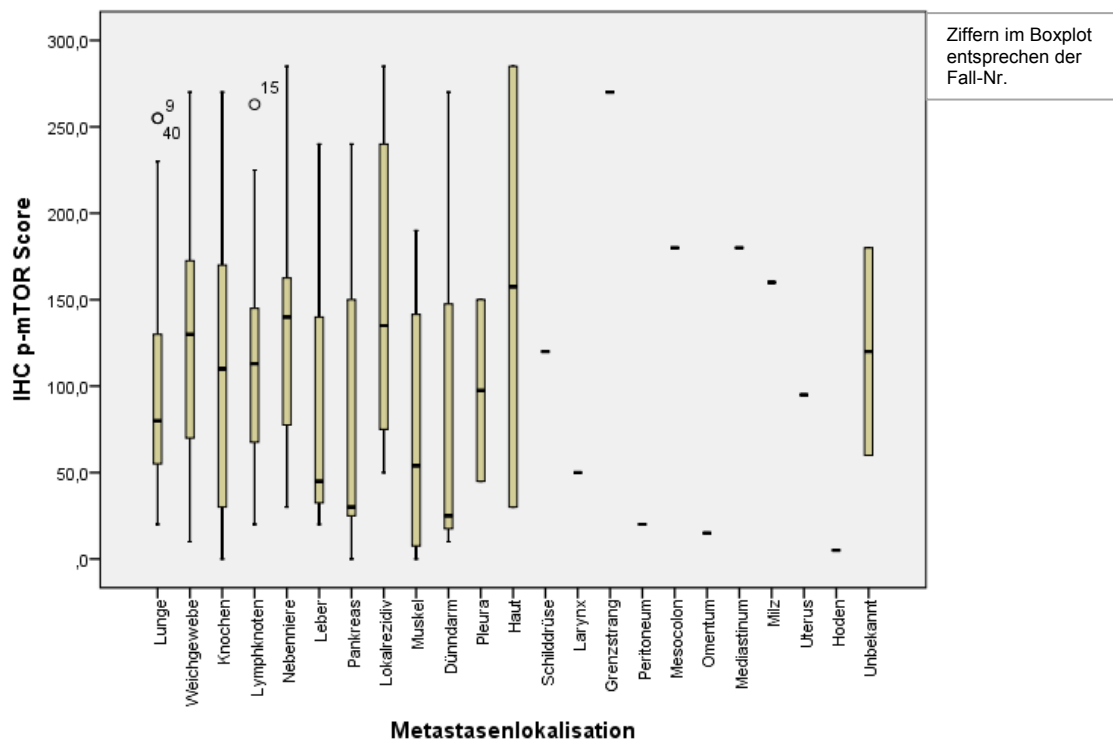


Abbildung 10: Boxplot p-mTOR nach Metastasenlokalisierung

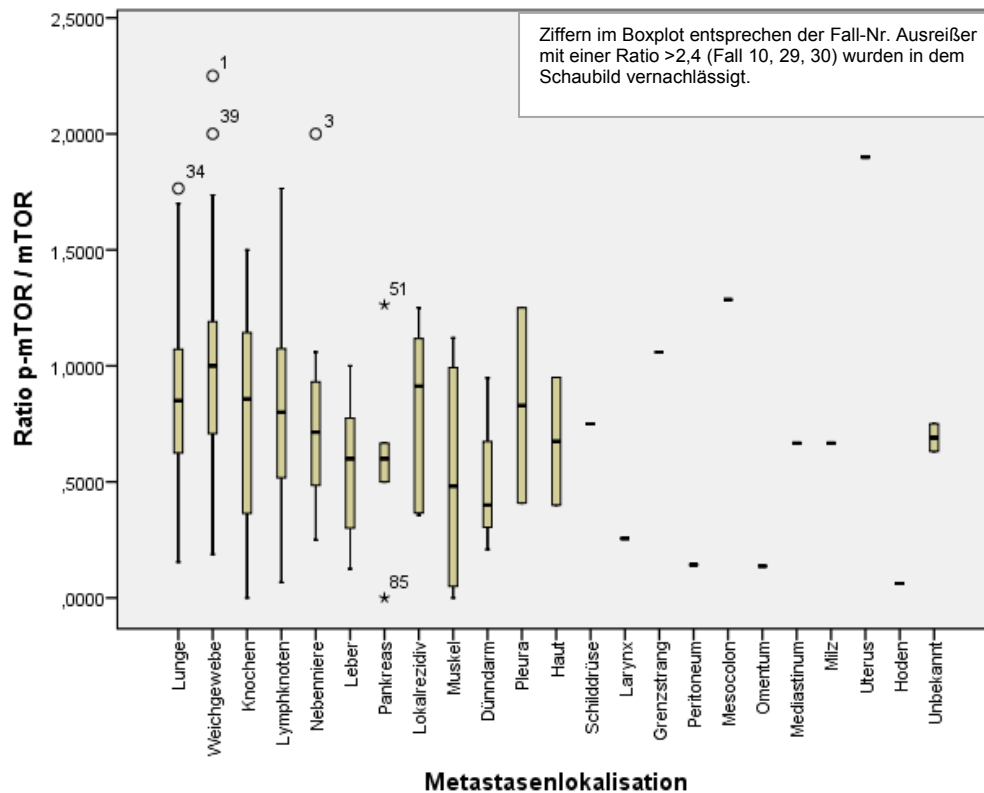


Abbildung 11: Boxplot Ratio nach Metastasenlokalisierung

Eine Kruskal-Wallis Analyse, unter Vernachlässigung der beiden nicht zuzuordnenden Proben, auf mögliche signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Lokalisationen und den zugehörigen Expressionsniveaus wies keine ausreichenden Signifikanzwerte auf.

Kruskal-Wallis Analyse „Metastasenlokalisierungen“			
p-Wert / asymptotische Signifikanz	mTOR	p-mTOR	Ratio
	0,577	0,369	0,245

Tabelle 11: Kruskal-Wallis Analyse „Metastasenlokalisierungen“

In Anlehnung an eine Studie von Li et al. (231), welche zu dem Ergebnis kam, dass Patienten, die mit mTOR-Inhibitoren therapiert wurden und dabei eine positive p-mTOR-Expressionen aufwiesen, ein besseres Ansprechen zeigten, soll ein ähnlicher Vergleich unter Punkt 3.4.4 angestellt werden. Innerhalb des Metastasenkollektivs fanden sich 24 Patienten, welche im Verlauf ihrer

Erkrankung mit den mTOR-Inhibitoren Everolimus und/oder Temsirolimus therapiert wurden. Dabei wiesen sie im Median eine mTOR Expression von 121,00 (113,00) auf und lagen damit etwas unterhalb des Medians des Gesamtkollektivs von 139,00 (107,25). Ähnliches ließ sich auch in Bezug auf die p-mTOR Expression beobachten, bei welcher der Median des Subkollektivs bei 74,00 (70,00) gegenüber 111,50 (105,00) lag. Die Ratio der mTOR-Inhibitor Therapierten betrug im Median 0,8235 (0,6930) gegenüber 0,8297 (0,4676) im Gesamtkollektiv. Die ausführlicheren Expressionstabellen finden sich unter 7.6 im Anhang.

3.3 Kontingenzanalyse

Mittels Pearson Chi-Square-Test wurde nachfolgend die Korrelation der Expressionswerte von mTOR und p-mTOR in Metastasen sowie deren Ratio mit klinisch-pathologischen Patientendaten untersucht. Eingeteilt wurden die Expressionsscores bzw. die Ratio in je eine Gruppe, welche Werte oberhalb des für alle Patienten berechneten Medians aufwies, und eine, deren Werte gleich des Medians waren oder darunterlagen. Ausführliche Auswertungstabellen finden sich im Anhang unter 7.7.

Für die **mTOR Expression** ergaben sich keine signifikanten Assoziationen. Das mediane Alter bei Metastasierung lag für die Gruppe der mTOR Expression \leq Median bei 63,86 (12,97) Jahren und für Patienten mit einem IHC-Score $>$ Median bei 65,89 (14,78) Jahren. Unter Berücksichtigung synchroner sowie metachroner Metastasierung betrug der zeitliche Abstand zwischen Erstdiagnose und Metastasierung für eine Expression \leq Median 15,97 (63,58) Monate bzw. 18,33 (57,95) für eine Expression $>$ Median.

Patienten mit einer **p-mTOR Expression** \leq Median waren bei Metastasierung im Median 63,55 (13,61) Jahre alt und hatten 12,94 (70,87) Monate nach ihrer Erstdiagnose Metastasen entwickelt, während das mediane Alter derer mit einer Expression $>$ Median bei 67,23 (12,50) Jahren lag und diese 18,37 (61,40) Monate nach Erstdiagnose erste Metastasen aufwiesen. Es zeigten sich keine

signifikanten Zusammenhänge zwischen der p-mTOR Expression und untersuchten klinischen sowie pathologischen Parametern.

Für den Teil der Patienten mit einer **Ratio** \leq Median lag die mediane Zeitspanne zwischen Erstdiagnose und Rezidiv bei 10,45 Monaten (49,61) und das mediane Alter bei Metastasierung bei 65,30 (14,70) Jahren. Für Patienten mit einer Ratio $>$ des Median betrug diese Zeitspanne 29,55 (62,22) Monate und das mediane Alter lag bei 63,90 (12,75) Jahren. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Verhältnis von p-mTOR zu mTOR und dem Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ II ($p=0,003$, $\Phi=0,364$).

3.4 Kaplan-Meier Analysen

Die maximale Anzahl auszuwertender Fälle im Rahmen der Kaplan-Meier Analyse lag bei 85. Darunter finden sich 29 Todesfälle insgesamt, von denen 28 als krebsspezifisch gewertet wurden. Bei einem Todesfall konnte keine ursachenspezifische Zuordnung vorgenommen werden. Wie in den Auswertungstabellen aufgeführt, kann die Anzahl tatsächlich in die Analyse eingeflossener Fälle jedoch nochmals unterhalb der maximalen Anzahl von 85 liegen, abhängig davon, von wie vielen Patienten die entsprechenden Expressionswerte vorlagen. Kaplan-Meier Analysen wurden vorgenommen für den Zeitraum zwischen der ersten Diagnose einer metastasierten Erkrankung und dem letzten Follow-up bzw. Sterbedatum. Nicht immer war es möglich, das mediane Überleben anzugeben. In diesen Fällen wurde auf den Mittelwert zurückgegriffen.

3.4.1 OS und CSS ab Erstmetastasierung für die mTOR Expression

Bei der Betrachtung der Zeitspanne zwischen Auftreten erster Metastasen und dem letzten Follow-up / Sterbedatum, ergab sich für die Gruppe der Personen, mit einer mTOR Expression \leq Median ein mittleres Gesamtüberleben von 83,746 Monaten und für jene mit einer Expression $>$ Median 83,802 Monate ($p=0,881$).

Für das krebspezifische Überleben ergaben sich im Mittel entsprechend 83,671 Monate für mTOR ≤ Median bzw. 86,341 Monate für mTOR > Median (p=0,997).

	OS ab Erstmetastasierung		CSS ab Erstmetastasierung	
	Gesamtanzahl	Anzahl Todesfälle	Gesamtanzahl	Anzahl Todesfälle
mTOR ≤ Median	42	12	41	12
mTOR > Median	38	15	38	14
Gesamt	80	27	79	26

Tabelle 12: Kaplan-Meier, Fallzahlen OS/CSS ab Erstmetastasierung für mTOR

	OS ab Erstmetastasierung in Monaten		CSS ab Erstmetastasierung in Monaten	
	MW (95% CI)	Median (95% CI)	MW (95% CI)	Median (95% CI)
mTOR ≤ Median	83,746 (67,522-99,971)	. (.-)	83,671 (67,390-99,951)	. (.-)
mTOR > Median	83,802 (63,962-103,643)	66,168 (39,489-92,847)	86,341 (66,114-106,568)	66,168 (40,445-91,892)
Log Rank p-Wert	0,881		0,997	

Tabelle 13: Kaplan-Meier, OS/CSS ab Erstmetastasierung für mTOR

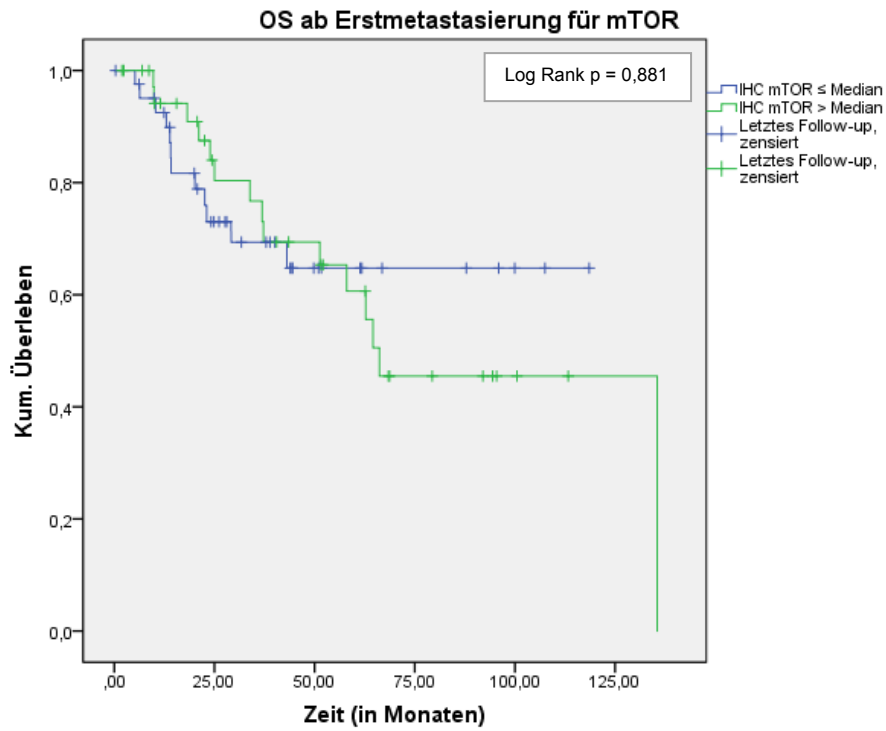


Abbildung 12: Kaplan-Meier, OS ab Erstmetastasierung für mTOR

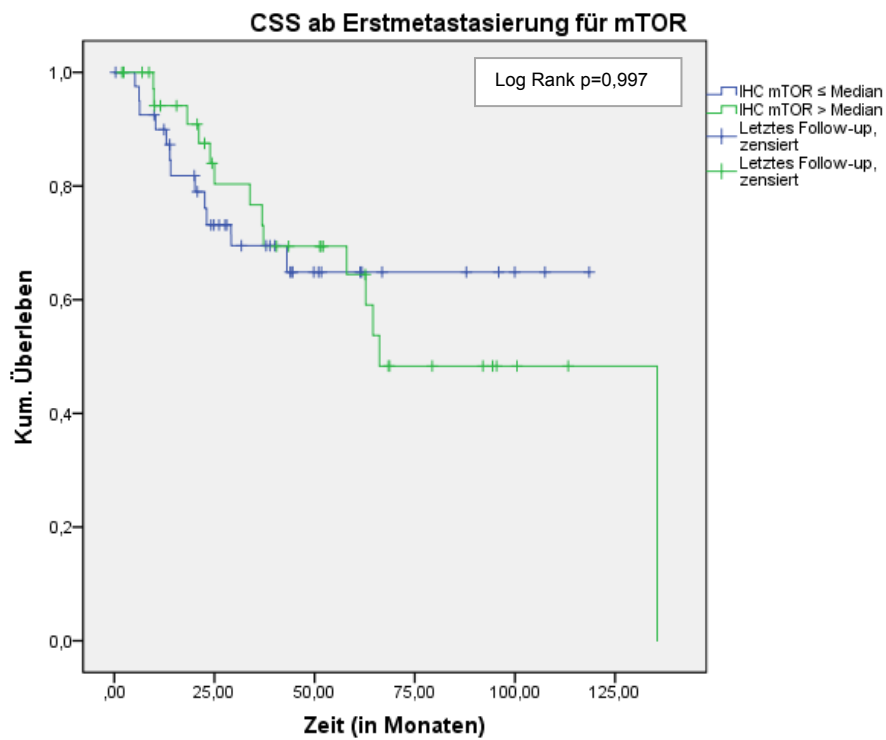


Abbildung 13: Kaplan-Meier, CSS ab Erstmetastasierung für mTOR

3.4.2 OS und CSS ab Erstmetastasierung für die p-mTOR Expression

Für die Zeitspanne zwischen Erstmetastasierung und letztem Follow-up / Sterbedatum lag das mediane Gesamtüberleben für Patienten mit einer p-mTOR Expression \leq Median bei 135,524 Monaten im Vergleich zu 66,168 Monaten für die Gruppe jener mit einer Expression $>$ Median ($p=0,717$). Das krebspezifische Überleben betrug im Median ebenfalls 135,524 Monate für Patienten mit einem p-mTOR Score \leq Median und lag in der Gruppe mit einer Expression $>$ Median bei 66,168 Monaten ($p=0,577$).

	OS ab Erstmetastasierung		CSS ab Erstmetastasierung	
	Gesamtanzahl	Anzahl Todesfälle	Gesamtanzahl	Anzahl Todesfälle
p-mTOR \leq Median	41	16	41	16
p-mTOR $>$ Median	41	11	40	10
Gesamt	82	27	81	26

Tabelle 14: Kaplan-Meier, Fallzahlen OS/CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR

	OS ab Erstmetastasierung in Monaten		CSS ab Erstmetastasierung in Monaten	
	MW (95% CI)	Median (95% CI)	MW (95% CI)	Median (95% CI)
p-mTOR \leq Median	86,274 (66,496-106,052)	135,524 (-.)	86,274 (66,496-106,052)	135,524 (-.)
p-mTOR $>$ Median	68,860 (55,318-82,401)	66,168 (54,313-78,023)	71,099 (57,332-84,866)	66,168 (-.)
Log Rank p-Wert	0,717		0,577	

Tabelle 15: Kaplan-Meier, OS/CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR

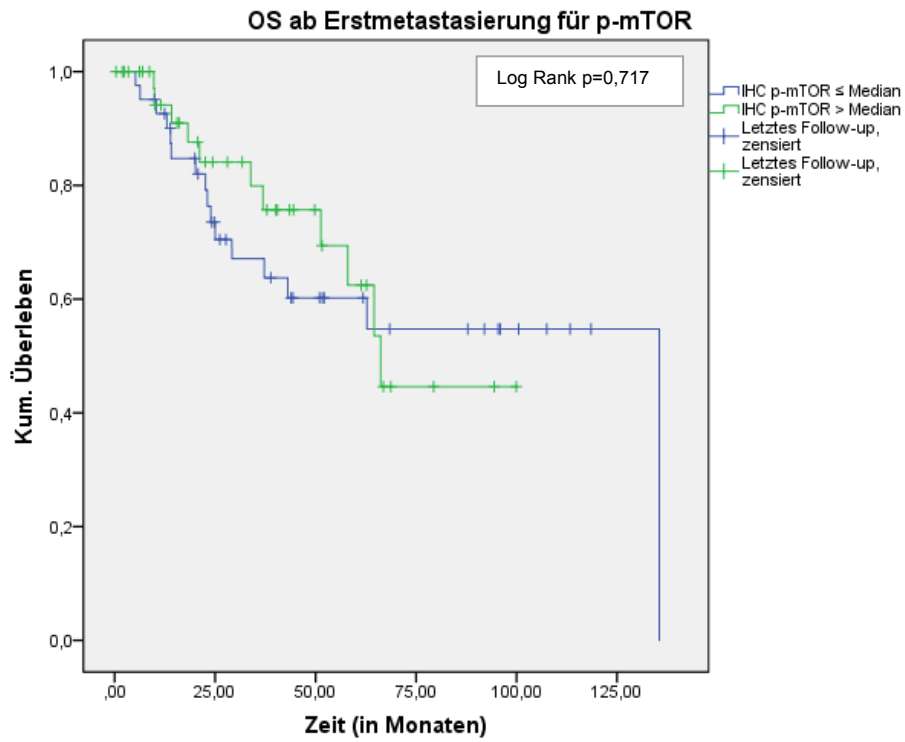


Abbildung 14: Kaplan-Meier, OS ab Erstmetastasierung für p-mTOR

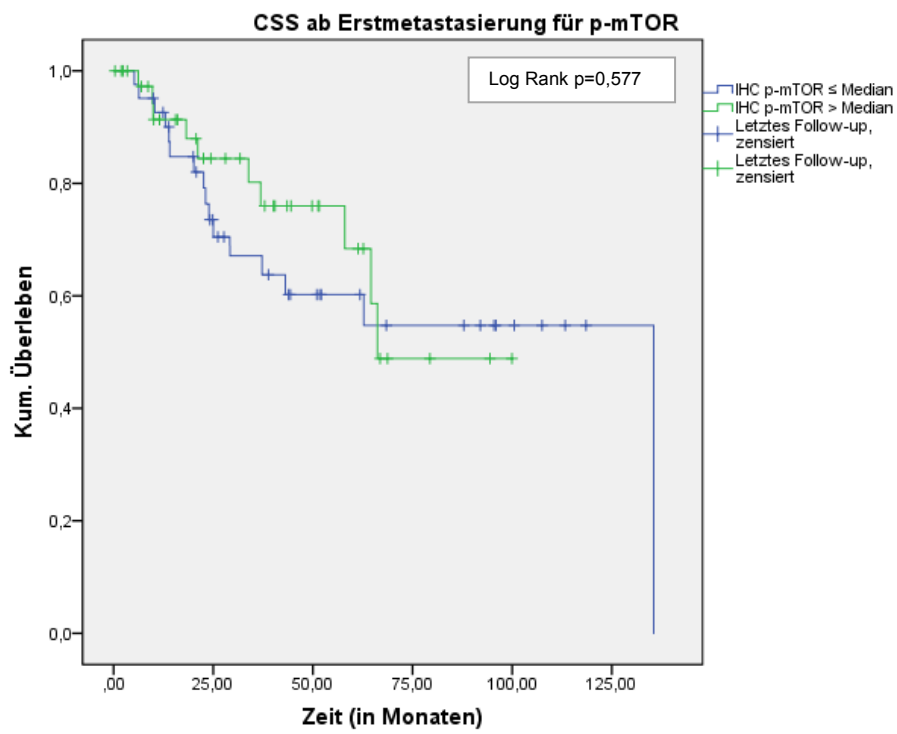


Abbildung 15: Kaplan-Meier, CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR

3.4.3 OS und CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio

Für den Zeitraum zwischen dem Auftreten der ersten Metastasen und letztem Follow-up / Sterbedatum ergab sich bei der Betrachtung der Ratio in der Gruppe \leq Median ein mittlere Gesamtüberlebenszeiten von 82,135 Monaten gegenüber 74,365 Monaten bei einem Wert $>$ Median ($p=0,525$). Das entsprechende krebsspezifische Überleben lag bei 82,135 Monaten für die Gruppe mit einer Ratio \leq Median und bei 77,213 Monaten für jene mit einer Ratio $>$ Median ($p=0,395$).

	OS ab Erstmetastasierung		CSS ab Erstmetastasierung	
	Gesamtanzahl	Anzahl Todesfälle	Gesamtanzahl	Anzahl Todesfälle
Ratio \leq Median	41	17	41	17
Ratio $>$ Median	39	10	38	9
Gesamt	80	27	79	26

Tabelle 16: Kaplan-Meier, Fallzahlen OS/CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio

	OS ab Erstmetastasierung in Monaten		CSS ab Erstmetastasierung in Monaten	
	MW (95% CI)	Median (95% CI)	MW (95% CI)	Median (95% CI)
Ratio \leq Median	82,135 (62,623-101,648)	66,168 (36,420-95,917)	82,135 (62,623-101,648)	66,168 (36,420-95,917)
Ratio $>$ Median	74,365 (57,808-90,922)	. (.-.)	77,213 (60,377-94,050)	. (.-.)
Log Rank p-Wert	0,525		0,395	

Tabelle 17: Kaplan-Meier, OS/CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio

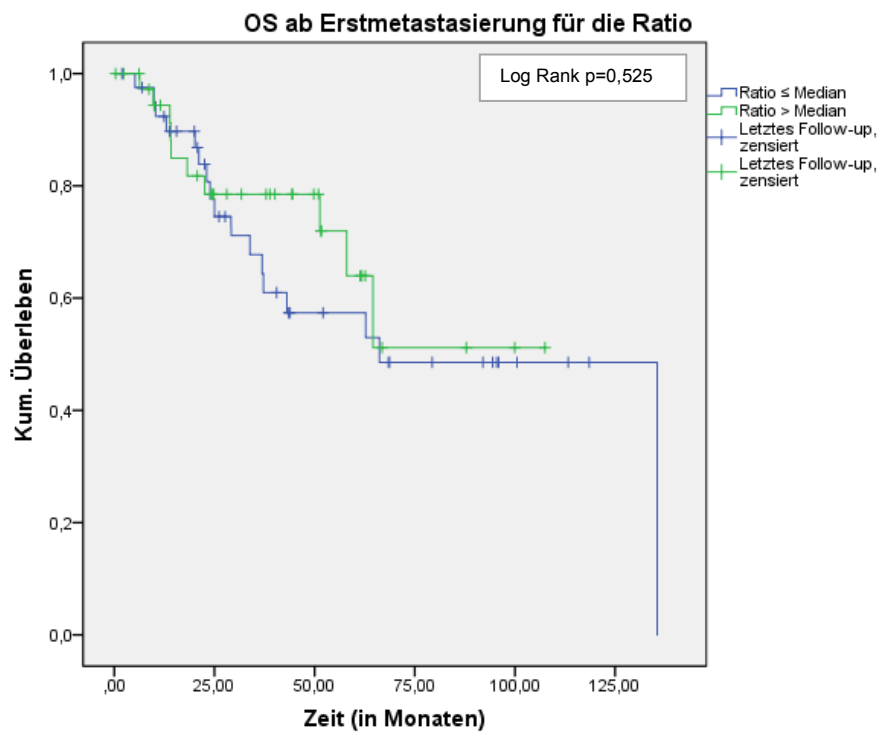


Abbildung 16: OS ab Erstmetastasierung für die Ratio

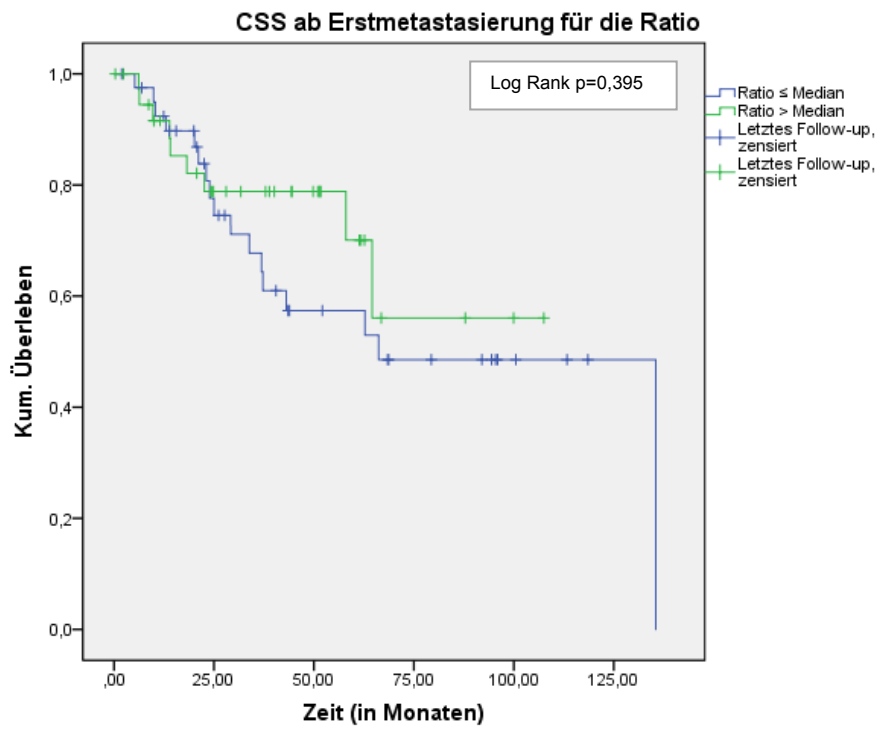


Abbildung 17: CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio

3.4.4 Überlebensanalysen des Subkollektivs „mTOR-Inhibitoren“

Nachfolgend wurden für das Subkollektiv der insgesamt 24 Patienten, welche im Rahmen ihrer Behandlung unter anderem auch mit mTOR-Inhibitoren therapiert wurden, Kaplan-Meier-Analysen in Abhängigkeit vom mTOR und p-mTOR Expressionsstatus sowie der Ratio durchgeführt. Da die, diesem Subkollektiv zugehörigen, Todesfälle allesamt tumorabhängige Sterbefälle waren, entsprechen sich die Daten und Kurven für das Gesamt- sowie krebsspezifische Überleben.

3.4.4.1 Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“: OS und CSS ab Erstmetastasierung für mTOR

Für das OS bzw. CSS ergab sich für eine mTOR Expression \leq Median ein mittleres Überleben von 58,366 Monaten, wohingegen Patienten mit einer mTOR Expression $>$ Median ein ebensolches von 70,459 Monaten aufwiesen ($p=0,277$).

	OS/CSS ab Erstmetastasierung			OS/CSS ab Erstmetastasierung in Monaten	
	Gesamt-anzahl	Anzahl Todesfälle		MW (95% CI)	Median (95% CI)
mTOR \leq Median	13	6		58,366 (34,429-82,303)	. (.-)
mTOR $>$ Median	10	4		70,459 (51,377-89,541)	. (.-)
Gesamt	23	10	Log Rank p-Wert	0,277	

Tabelle 18: Kaplan-Meier, Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“, OS/CSS ab Erstmetastasierung für mTOR

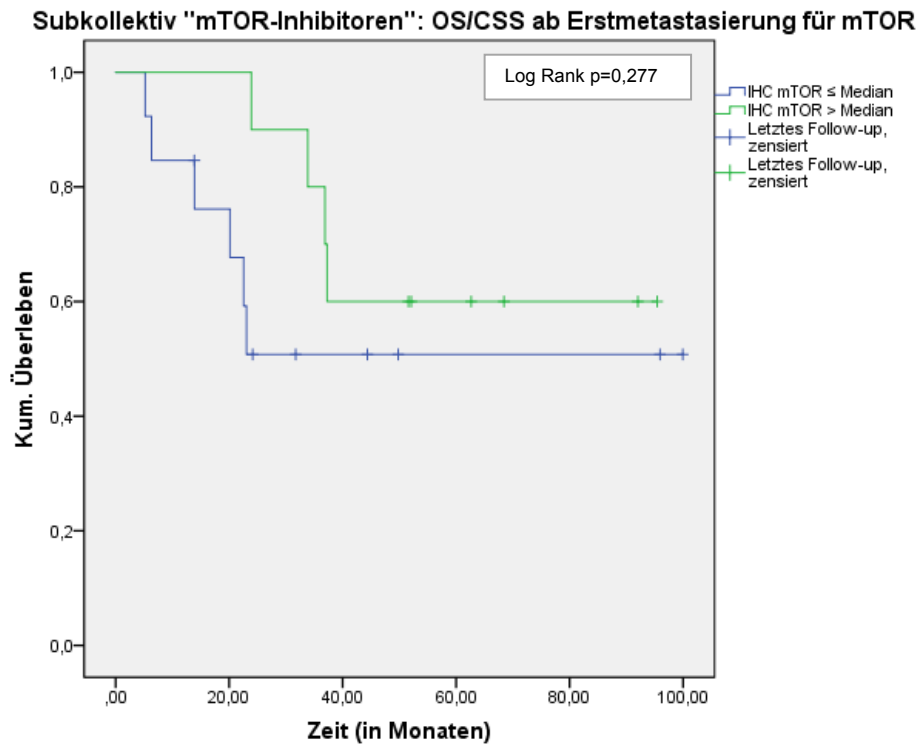


Abbildung 18: Kaplan-Meier, Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“, OS/CSS ab Erstmetastasierung für mTOR

3.4.4.2 Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“: OS und CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR

Bezogen auf die Expression von p-mTOR ergab sich ein ähnliches Bild. So lag das mittlere OS bzw. CSS für eine Expression von p-mTOR \leq Median bei 54,834 Monaten gegenüber 78,423 Monaten für Patienten mit einer Expression $>$ Median ($p = 0,234$).

	OS/CSS ab Erstmetastasierung			OS/CSS ab Erstmetastasierung in Monaten	
	Gesamtanzahl	Anzahl Todesfälle		MW (95% CI)	Median (95% CI)
p-mTOR \leq Median	16	8		54,834 (35,084-74,585)	37,257 (.-)
p-mTOR $>$ Median	7	2		78,423 (54,061-102,785)	. (.-)
Gesamt	23	10	Log Rank p-Wert	0,234	

Tabelle 19: Kaplan-Meier, Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“, OS/CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR

Subkollektiv "mTOR-Inhibitoren": OS/CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR

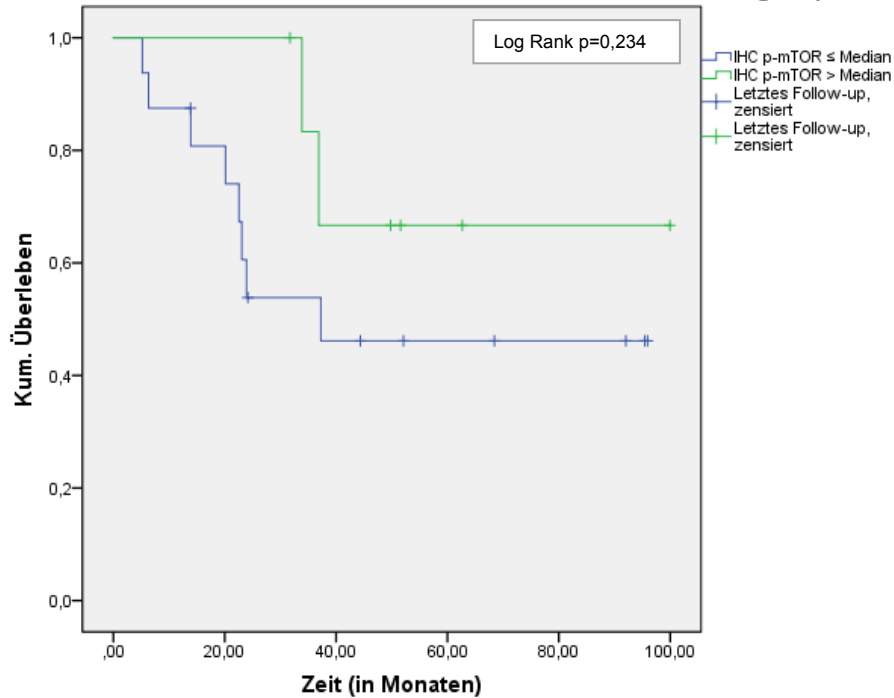


Abbildung 19: Kaplan-Meier, Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“, OS/CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR

3.4.4.3 Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“: OS und CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio

Dieser Trend setzte sich auch bei Einbeziehung der Ratio fort. Hierbei wiesen Patienten mit einer Ratio \leq Median ein mittleres Überleben von 55,349 Monaten auf, wohingegen bei Vorliegen einer Ratio $>$ Median im Mittel ein OS bzw. CSS von 74,237 Monaten zu verzeichnen war ($p=0,402$).

	OS/CSS ab Erstmetastasierung			OS/CSS ab Erstmetastasierung in Monaten	
	Gesamtanzahl	Anzahl Todesfälle		MW (95% CI)	Median (95% CI)
Ratio \leq Median	13	7		55,349 (35,385-75,313)	37,257 (31,621-42,892)
Ratio $>$ Median	10	3		74,237 (49,796-98,679)	. (.-.)
Gesamt	23	10	Log Rank p-Wert	0,402	

Tabelle 20: Kaplan-Meier, Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“, OS/CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio

Subkollektiv "mTOR-Inhibitoren": OS/CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio

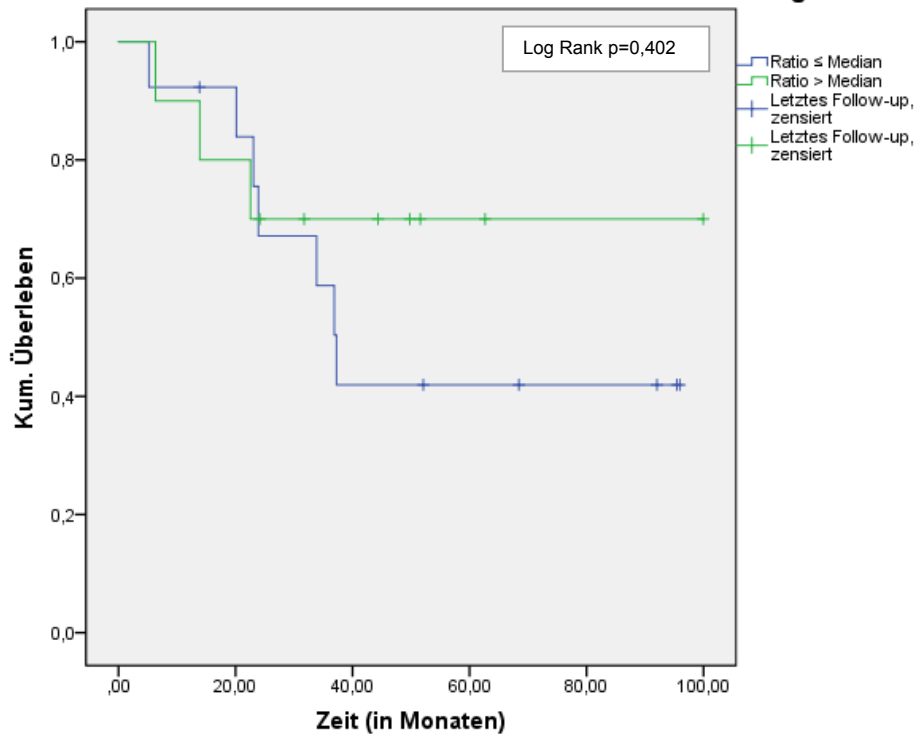


Abbildung 20: Kaplan-Meier, Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“, OS/CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio

3.5 Cox-Regressionen

Da bei sechs Patienten lediglich unvollständige Follow-up Daten vorlagen, fanden diese Fälle keine Verwendung in der Cox-Regression. Die maximale Anzahl auszuwertender Fälle lag demnach bei 85 statt 91. Unter diesen fanden sich insgesamt 29 Todesfälle. 28 davon konnten als tumorabhängig eingestuft werden, bei einem war eine kausale Zuordnung nicht sicher möglich. Cox-Regressionen wurden innerhalb des Metastasenkollektivs angefertigt für die Zeitspannen zwischen Erstdiagnose des Tumors bzw. dem Zeitpunkt der Erstmetastasierung und letztem Follow-up / Sterbedatum der Gesamt- sowie krebsabhängigen Todesfälle. Nachfolgend aufgeführt sind detektierte uni- bzw. multivariat signifikante prognostische Faktoren. Gesamttabellen mit sämtlichen ausgewerteten Parametern finden sich im Anhang (Tabelle 7.8).

3.5.1 OS ab Erstdiagnose RCC

Im Rahmen des univariaten Cox-Regressionsmodells waren, bezogen auf den Zeitraum zwischen Erstdiagnose und letztem Follow-up bzw. Sterbedatum, ein Erkrankungsalter > 70 Jahre (HR=2,713, p=0,031), ein synchrones Metastasierungsgeschehen (HR=4,249, p=0,001), ein Fuhrman-Grading des Primärtumors > 2 (HR=3,431, p=0,002) sowie sarkomatoide Komponenten innerhalb des Primärtumors (HR=4,726, p=0,010) mit einem signifikant verkürzten Gesamtüberleben verknüpft. Weiterhin zeigten eine Anämie (HR=2,771, p=0,009) und ein erhöhter CRP-Spiegel (HR=3,121, p=0,027) neben einem Karnofsky-PS < 80 (HR=3,932, p=0,006) und einem ASA-Wert > 2 (HR=2,508, p=0,023) ein verkürztes Überleben an. Im Rahmen der multivariaten Analyse konnte keiner der Faktoren als unabhängiger Prädiktor eines verkürzten Gesamtüberlebens bestätigt werden.

3.5.2 CSS ab Erstdiagnose RCC

Für das krebsspezifische Überleben erwiesen sich univariat ebenfalls ein synchroner Metastasierungsprozess (HR=4,326, p=0,001), ein Fuhrman-Grading des Primärtumors > 2 (HR=3,236, p=0,006), sarkomatoide Komponenten innerhalb des Primärtumors (HR=4,726, p=0,010) sowie eine Anämie (HR=2,227, p=0,044), ein erhöhter CRP-Spiegel (HR=3,805, p=0,018), eine GOT-Erhöhung (HR=5,006, p=0,014) und ein Karnofsky-PS < 80 (HR=2,880, p=0,045) als signifikante negative Prädiktoren des Überlebens. Multivariat konnte dagegen keiner dieser Faktoren bestätigt werden.

3.5.3 OS ab Erstmetastasierung

Für das Gesamtüberleben bezogen auf die Zeitspanne zwischen erstmaligem Auftreten von Metastasen und dem Zeitpunkt des letzten Follow-ups / Sterbedatums erwiesen sich das Auftreten von Knochenmetastasen (HR=2,810, p=0,007) sowie insgesamt die Zugehörigkeit zu einer nachteiligen Prognosegruppe, bestehend aus Patienten mit Leber und/oder Knochenmetastasen (HR=2,787, p=0,011) univariat als signifikante negativ

prognostische Faktoren. Für einen pro Patienten gemittelten mTOR-Score > des Medians (HR=1,061, p=0,881) bzw. p-mTOR-Score > des Medians (HR=0,866, p=0,717) bzw. einer Ratio > des Medians (HR=0,773, p=0,526) konnte kein Zusammenhang zur Gesamtüberlebensrate gezeigt werden. Multivariat konnte keiner der univariat signifikanten Faktoren bestätigt werden.

3.5.4 CSS ab Erstmetastasierung

Bei der Betrachtung des krebsspezifischen Überlebens ab Erstmetastasierung wurden folgende Parameter univariat als negative prognostische Faktoren identifiziert: das Auftreten von Knochenmetastasen (HR=2,997, p=0,005) sowie die Zugehörigkeit zu einer nachteiligen Prognosegruppe, bestehend aus Patienten mit Leber und/oder Knochenmetastasen (HR=3,078, p=0,008). Für einen pro Patienten gemittelten mTOR-Score > des Medians (HR=0,998, p=0,997) bzw. p-mTOR-Score > des Medians (HR=0,797, p=0,578) bzw. einer Ratio > des Medians (HR=0,701, p=0,397) konnte kein Zusammenhang zur krebsspezifischen Überlebensrate gezeigt werden. Multivariat konnte keiner der univariat signifikanten Faktoren bestätigt werden.

4 Diskussion

Nierenzellkarzinome repräsentieren mit rund 90% den größten Anteil maligner Nierenerkrankungen (1) und zeichnen sich Zahlen der USA aus dem Jahre 2015 zu Folge für 5% aller malignen Tumoren des Mannes und 3% derer von Frauen verantwortlich (3). Eine Vielzahl der Betroffenen erleidet im Rahmen ihrer Erkrankung einen Metastasierungsprozess. So liegen bei 20-30% aller Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Metastasen vor und bei weiteren 20-40% kommt es nach kurativ intendierter Nephrektomie im Rahmen des Follow-ups zu Metastasierungsprozessen (40, 41). Neben der histologischen Klassifikation der Nierenzellkarzinome und verschiedenen prognostischen Modellen, erlauben in zunehmendem Maße molekulare und genetische Analysen ein besseres Verständnis der individuellen Tumorbilogie. Eine der am weitesten verbreiteten genetischen Alteration bei klarzelligem Nierenzellkarzinomen stellt ein Verlust oder eine Mutation innerhalb des von-Hippel-Lindau-Gens dar. Diese Veränderung kann bei 60-90% aller sporadischen ccRCCs beobachtet werden (22) und führt zur Akkumulation von HIF-1 α und damit zur Aktivierung des Hypoxie-induzierten-Signalweges. Mit Beginn der so genannten „Ära der Target Therapie“ etwa ab dem Jahre 2006 und weiterführender molekularer Diagnostik, rückte in den vergangenen Jahren ein weiterer, eng mit dem Hypoxie-induzierten-Signalweg verbundener, Pathway in den Fokus des Interesses: der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg. Über diesen Signalweg werden in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, einer adäquaten Versorgung mit Nährstoffen wie Aminosäuren sowie ausreichend großen intrazellulären Energiespeichern Zellwachstum und Zellproliferation gesteuert. Innerhalb dieses Pathways nimmt die Serin-Threonin-Kinase mTOR, vor allem innerhalb des mTORC-1, eine wichtige Schlüsselrolle ein. Bereits den Beginn der Erforschung von mTOR ab dem Jahre 1994 markierte zunächst die Entdeckung der antitumoral wirksamen Substanz Rapamycin im Jahre 1975, welche in Folge als wirksamer Inhibitor vor allem von mTORC-1 erkannt wurde. In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Hemmstoffe von mTOR entwickelt und in der Behandlung von Nierenzellkarzinomen etabliert.

Im Zusammenhang mit der Entwicklung dieser Hemmstoffe treten insbesondere in Zeiten einer personalisierten Therapie Fragen danach auf, wie weit verbreitet Alterationen innerhalb des mTOR-Signalweges sind, welche prognostische Relevanz sie besitzen und welche Patienten insbesondere von einer Therapie mit mTOR-Inhibitoren profitieren könnten.

Im Folgenden soll eine Darstellung und Diskussion der im Rahmen der Arbeit erhobenen Ergebnisse erfolgen und ein detaillierter Überblick über bisherige Studienergebnisse auch in Bezug auf weitere Bestandteile der mTOR-Signalkaskade geboten werden.

4.1 Expressionsanalysen

Hinsichtlich der mTOR-Expression zeigten sich die höchsten medianen Expressionswerte in Metastasen (140,00), noch vor benignen Gewebeproben (130,00) sowie primären Tumoren (75,00). Gleiches zeigte sich auch für die p-mTOR-Färbungen, bei denen Metastasen den höchsten Wert aufwiesen (102,50), vor benignem Gewebe (60,00) und Primärtumoren (40,00). Für die Ratio lagen ebenfalls die Metastasen an erster Stelle (0,8000), vor den Primärtumoren (0,5781) und den benignen Proben (0,5000). In der Zusammenschau zeigt sich damit zweierlei: Erstens scheint der Übergang von benignem Gewebe zum primären Tumor mehr durch eine relative Überexpression von p-mTOR im Vergleich zu mTOR begleitet zu sein, während die absoluten Expressionswerte unterhalb derer von benignem Nierengewebe liegen. Zweitens scheint es bei der Betrachtung der Metastasen, neben einem nochmals erhöhten relativen Verhältnis von p-mTOR zu mTOR, zudem zu einer auch absoluten Erhöhung der Expression zu kommen. Bei der Betrachtung der detektierten signifikanten Unterschiede spiegelt sich dies folgendermaßen wider: Benignes Nierengewebe und Primärtumoren unterschieden sich lediglich hinsichtlich der erhöhten mTOR Ausprägung der benignen Proben signifikant, wenngleich auch die p-mTOR Expression absolut betrachtet größer war. Lediglich bei der Betrachtung der Ratio lagen primäre Tumoren vor benignen Proben, allerdings nicht signifikant. Dennoch könnte dies einen Hinweis darauf

darstellen, dass die Hyperphosphorylierung einen bedeutsamen Schritt in Richtung Tumorgenese darstellt. Metastasen wiesen einen signifikant höheren p-mTOR und Ratio Wert im Vergleich zu benignem Nierengewebe auf, während sich hier mTOR nicht signifikant unterschied - trotz absolut gesehen höherer Werte. Metastasen erreichten zudem gegenüber den nicht korrelierten Primärtumoren signifikant höhere Ausprägungen für mTOR und p-mTOR, während die Ratio absolut zwar höher war, allerdings nicht signifikant. Dies könnte als Ausdruck der intensivierten Aktivierung der Proliferation bei Metastasen, sowohl durch Überexpression von mTOR selbst, als auch durch dessen Hyperphosphorylierung, gesehen werden, wofür auch die Ergebnisse der Rangkorrelation nach Spearman sprechen würden, welche einen deutlichen Zusammenhang für die Entwicklung beider Expressionswerte auswies.

Innerhalb des Metastasenkollektivs stellte die Gruppe der Lungenmetastasen hinsichtlich der Anzahl ausgewerteter Proben mit 25% der Fälle die größte Gruppe dar. Zu beachten ist hierbei, dass in diese 42 Fälle auch mehrfache pulmonale Metastasierungsprozesse derselben Patienten eingingen. Die vielfältigen Weichgewebismetastasen stellten die zweitgrößte Gruppe mit 17,26% dar, noch vor Knochenmetastasen mit 12,5% und Lymphknotenmetastasen mit 11,90%. Damit liegen die Ergebnisse im Trend anderer Erhebungen, wonach Lungen-, Lymphknoten-, und Knochenmetastasen neben Leber- und Hirnmetastasen zu den am häufigsten auftretenden zählen (43-45).

Bei der Untersuchung des Expressionsniveaus in Bezug auf die verschiedenen Lokalisationen ergaben sich, auch aufgrund teils nur geringer Fallzahlen, in der statistischen Analyse keine signifikanten Unterschiede. Dennoch bleibt festzuhalten, dass, gerade auch bei Betrachtung derjenigen Metastasierungslokalisationen, die mit mindestens fünf gültigen Proben in die Auswertung mit einfließen, durchaus messbare Unterschiede in den Expressionen von mTOR, p-mTOR sowie der daraus resultierenden Ratio existieren. Ob diese Unterschiede tatsächlich beispielsweise eine Begründung bieten für eine bevorzugte Therapie einzelner Metastasierungslokalisationen mit mTOR-Inhibitoren, wird von Studien an größeren Kollektiven zu untersuchen sein.

Beim Vergleich der im Rahmen der vorliegenden Untersuchung erhobenen Expressionswerte mit aktueller Literatur ergeben sich Gemeinsamkeiten aber auch Widersprüche. Kruck et al. (223) untersuchten bei zehn Patienten mit primärem ccRCC immunhistochemisch sowie mittels Western-Blot Expressionsmuster von mTOR und p-mTOR und verglichen diese mit korrespondierenden benignen Gewebeproben. Im Rahmen der immunhistochemischen Auswertung waren mTOR und p-mTOR, wie in der hier vorliegenden Arbeit, hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert. Der Auswertungsscore berechnete sich gemäß des auch im Rahmen dieser Arbeit verwendeten semiquantitativen Verfahrens.

	RCC	Benigne
IHC-Score mTOR MW± SD (% von max.=300)	61±24 (20)	148±24 (49)
IHC-Score p-mTOR MW± SD (% von max.=300)	126±27 (42)	119±13 (40)

Tabelle 21: Auswertung nach Kruck et al. (223)

Abkürzungsverzeichnis: **IHC** = Immunhistochemie, **mTOR** = mammalian Target of Rapamycin, **MW** = Mittelwert, **p-mTOR** = phosphoryliertes mammalian Target of Rapamycin, **RCC** = Nierenzellkarzinom, **SD** = Standardabweichung

Es zeigten sich eine mit jeweils $p < 0,05$ signifikante Verringerung von mTOR bzw. Erhöhung von p-mTOR beim Vergleich von benignem Gewebe zu primärem RCC. Dieses veränderte Verhältnis von p-mTOR zu mTOR führte für die Autoren zu dem Schluss, dass nicht eine Überexpression von mTOR, sondern vielmehr die Hyperphosphorylierung desselben, den entscheidenden Schritt der Tumoraktivierung und Tumorprogression bei RCCs darzustellen scheint. Dieses Verhältnis von mTOR zu p-mTOR könnte laut Autoren einen Prädiktor für Überleben oder Ansprechen auf eine Therapie mit mTOR-Inhibitoren darstellen. Dabei stimmen die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung erhobenen Befunde hinsichtlich der im benignen Gewebe im Vergleich zu Primärtumoren erhöhten Expressionsscores für mTOR mit den Ergebnissen von Kruck et al. überein, wohingegen sich bei einem Vergleich der erhobenen Messwerte für p-mTOR deutlichere Unterschiede ergeben. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte die Beobachtung einer starken Expression von p-mTOR auf Kosten einer verringerten mTOR Expression bei Primärtumoren im Vergleich zu benignem

Nierengewebe nicht bestätigt werden. Da prinzipiell gleiche Auswertungsstrategien verwendet wurden, könnte eine mögliche Ursache in der geringeren Stichprobengröße sowie Auswertung über Mittelwerte in der Untersuchung von Kruck et al. liegen. Dass die Hyperphosphorylierung dennoch eine entscheidende Rolle zu spielen scheint, zeigt ein Vergleich der Ratios, bei welchen Primärtumoren in beiden Untersuchungen zwar nicht signifikant, aber dennoch absolut betrachtet höhere Werte im Vergleich zum benignem Gewebe aufwiesen.

Schultz et al. (224) untersuchten den Expressionsstatus und prognostischen Wert verschiedener Komponenten der mTOR-Kaskade anhand von 135 primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen (p-ccRCC) sowie 41 nicht gematchten Metastasen (m-ccRCC). Einbezogene Komponenten waren: PTEN, p-AKT, p-S6 und p-4EBP1 aus der mTOR-Kaskade, sowie zudem c-MYC, p27 und HIF1- α . Nukleäre und/oder zytoplasmatische PTEN Level waren dabei sowohl in den Metastasen als auch in den primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu benignem Gewebe signifikant verringert (jeweils $p < 0,0001$), während die Expression in den Metastasen nicht signifikant über den Werten der Primärtumoren lag ($p = 0,813$). Dies könnte als Hinweis darauf gesehen werden, dass ein Verlust von PTEN einen wichtigen und frühen Schritt in der Karzinomentstehung darstellt und deckt sich mit den an anderer Stelle angeführten Ergebnissen von Pantuck et al. (226). Nukleäre p-AKT Level dagegen waren in Metastasen im Vergleich zu den Primärtumoren sowie benignem Gewebe signifikant erhöht ($p = 0,0011$ bzw. $p = 0,0021$). Diese Ergebnisse decken sich im Trend mit u.g. Befunden von Hager et al. (232, 233) und könnte den in Metastasen verstärkt ablaufenden Signaltransduktionsprozess von p-Akt nach dessen Aktivierung an der Zellmembran und nachfolgender Phosphorylierung weiterer Substrate in Zytoplasma und Nukleus widerspiegeln (233-235). Zytoplasmatische p-S6 Level waren in den Metastasen signifikant höher als in den Primärtumoren und benignem Gewebe (jeweils $p < 0,0001$) und in Primärtumoren wiederum signifikant höher als im benignen Gewebe ($p = 0,0006$), was sich mit u.g. Untersuchungen durch Hager et al. (236) deckt. Zytoplasmatische p-4EBP1 Level waren in Metastasen ebenfalls signifikant

höher als in Primärtumoren und in Primärtumoren wiederum signifikant höher als im benignen Gewebe (alle $p < 0,0001$). Als Conclusio der Befunde einer signifikanten Überexpression von p-AKT, p-S6 und 4EBP1 in Metastasen gegenüber Primärtumoren wurde von den Autoren gefolgert, dass eine Aktivierung des mTOR-Pathway bei RCCs mit einem aggressiveren Phänotyp einhergeht.

Lin et al. (225) untersuchten die Expression von p-Akt, p-mTOR und p-p70S6K anhand feingeweblicher Proben von 128 lokalisierten primären RCCs, 22 primären metastasierten RCCs und 24 benignen Nierengewebeproben. Es wurden Lokalisation, Verteilungsmuster sowie Intensität der IHC-Färbungen beurteilt und die benignen Proben als Vergleichspunkt gewählt. Dabei konnte eine Expression von p-Akt, p-mTOR und p-p70S6K in allen benignen Proben sowie beinahe allen metastasierten primären RCCs und lokalisierten primären RCCs beobachtet werden. Lediglich 4 chromophobe RCCs waren negativ für p-Akt. p-p70S6K war generell im Nucleus lokalisiert, p-Akt in Nucleus und Zytoplasma der benignen Gewebe sowie im Nucleus, Zytoplasma und Zellmembran der RCCs. Eine p-mTOR Expression wurde in den Zellmembranen der benignen Proben sowie der Zellmembranen und den Nuclei der RCCs beobachtet. Die Gesamtexpression aller drei Parametern war in RCCs signifikant höher als im benignen Gewebe ($p < 0,05$). Eine exemplarische Überprüfung dieser Ergebnisse anhand eines Western-Blots dreier ccRCCs gegen korrespondierendes benignes Nierengewebe bestätigte die immunhistochemischen Ergebnisse und wies ebenfalls für alle drei Parameter signifikant höhere Levels in den RCC-Proben aus ($p < 0,05$).

Gewebe	Probenzahl mit Färbeintensität für p- mTOR			Anzahl gefärbter Zellen von 0-100%	Expressionsscore von 0-300 MW (SD)
	Schwach	Mäßig	Stark		
Niere	2	16	6	28	65.8 (9.1)
ccRCC	6	9	55	79	213.1 (9.9)
pRCC	2	1	37	92	237.8 (12.1)
chRCC	4	4	10	61	152.2 (23.6)
mPRCC	1	0	21	98	290.0 (10.0)

Tabelle 22: Auswertungsergebnisse für p-mTOR nach Lin et al. (225)

Abkürzungsverzeichnis: **ccRCC** = Klarzelliges Nierenzellkarzinom, **chRCC** = chromophobes Nierenzellkarzinom, **mPRCC** = metastasiertes primäres Nierenzellkarzinom, **MW** = Mittelwert, **p-mTOR** = phosphoryliertes mammalian Target of Rapamycin, **pRCC** = papilläres Nierenzellkarzinom, **SD** = Standardabweichung

Hierbei fallen die, im Vergleich zu den im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Werte, sehr hohen Mittelwerte der Expressionsscores für metastasierte primäre RCCs und lokalisierte primäre RCCs auf, während die Ergebnisse der benignen Gewebeproben eine gute Übereinstimmung zeigen. Dabei muss hinzugefügt werden, dass aufgrund einer im Regelfall nicht gegebenen Normalverteilung der eigenen Daten eine Betrachtung der Mittelwerte nur eingeschränkt zulässig ist. Die dennoch gegebenen Unterschiede könnten durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren verursacht worden sein. Zum einen könnte die Verwendung eines von dem im Rahmen dieser Arbeit abweichenden Antikörper-Kit (Vectastain) durch unterschiedliches Bindungs- oder Färbeverhalten unterschiedliche Ergebnisse bedingen. Dieses könnte ebenfalls im Zusammenhang damit stehen, dass bei Lin et al. (225) p-mTOR vor allem im Bereich der Zellmembranen der benignen Proben bzw. Zellmembranen und Nuklei der primären RCCs und Metastasen beobachtet, während im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit, wie auch bei Kruck et al. (223), in erster Linie zytoplasmatische Färbemuster und damit Auswertungsschemata vorlagen. Einen Erklärungsansatz könnten auch die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Auswertungsstrategie bieten, wonach maßgeblich die Zellen der proximalen

Tubuli Eingang in die Auswertung der benignen Proben fanden, während Lin et al. (225) unter Umständen sämtliche Zellen des benignen Gewebes auswerteten, worauf auch die relativ geringe prozentuale Verteilung der detektierten Färbungen hinweisen könnte.

Auch **Hager et al.** (232, 233, 236) untersuchten in unterschiedlichen Studien die Expression und intrazelluläre Verteilung verschiedener Bestandteile der mTOR-Signalkaskade an einem Kollektiv von 45 metastasierten primären RCCs, 45 korrespondierenden Metastasen und 45 Proben korrespondierenden normalen Nierengewebes sowie teilweise unter Hinzunahme von 35 lokalisierten primären RCCs. In Ihrer 2011 veröffentlichten Studie (233) untersuchten Hager et al. die p-mTOR Expression anhand der 45 metastasierten primären RCCs sowie 45 korrespondierenden Metastasen und 45 Proben korrespondierenden normalen Nierengewebes. Der maximale immunhistochemische Score-Wert von 12 berechnet sich wie folgt: Der Score entspricht dem Produkt aus Färbeintensität (0-3, entsprechend der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Unterteilung) und Prozentsatz gefärbter Zellen (0: 0%, 1: 1-10%, 2: 11-50%, 3: 51-75%, 4: 76-100%). Im Rahmen der Auswertung wurde eine Unterscheidung getroffen zwischen membranöser sowie zytoplasmatischer Färbung, wobei eine membranöse Färbung ausschließlich in Metastasen und Primärtumoren beobachtet wurde. Die zytoplasmatische Färbung war dabei signifikant schwächer und die membranöse Färbung signifikant stärker in metastasierten primären RCCs sowie deren Metastasen im Vergleich zum benignen Gewebe.

Gewebe	p-mTOR Gesamtscore MW (SD)	Zytoplasmatischer p-mTOR Score MW (SD)	Membranöser p-mTOR Score MW (SD)
mPRCC	3.57 (3.19) a	2.05 (2.24) a	1.52 (2.24) a
Metastase	4.46 (3.77)	2.41 (2.40) a	2.05 (2.55) a
Normalgewebe	4.55 (1.34)	4.55 (1.34)	0 (0)

Tabelle 23: Auswertung p-mTOR nach Hager et al. (233)

Abkürzungsverzeichnis: a entspricht signifikantem Unterschied zum Normalgewebe ($p < 0,05$), mPRCC = metastasiertes primäres Nierenzellkarzinom, p-mTOR = phosphoryliertes mammalian Target of Rapamycin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Bemerkenswert sind die hierbei detektierten sehr hohen zytoplasmatischen Expressionswerte für das Normalgewebe im Vergleich zu sowohl Primärtumoren als auch Metastasen, welche sich in dieser Ausprägung sowohl von den im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Werte unterscheiden, als auch von den oben genannten Ergebnissen von Kruck et al. (223) sowie Lin et al. (225). Unter Umständen könnte der Auswertungsmodus sowie das von Hager et al. verwendete Antikörper-Kit eine Rolle spielen (Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen p-mTOR: Cell Signaling, Danvers, MA, USA. Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper: Dako, Glostrup, Denmark. Staining-Kit: ABC-Kit, Vectastain, Vector, Burlingame, CA, USA). Dies könnte auch einen Erklärungsansatz dafür bieten, weshalb Hager et al. eine Unterscheidung treffen konnten zwischen zytoplasmatischer und membranöser Färbung. Allerdings weicht auch der Befund fehlender membranöser p-mTOR-Färbungen im Normalgewebe von den Ergebnissen von Lin et al. (225) ab, welche eine ebensolche Expression feststellten. Lymphknotenmetastasen zeigten in den Untersuchungen von Hager et al. eine signifikant stärkere mittlere zytoplasmatische p-mTOR-Expression als hämatogene Metastasen [3,33 (SD 2,40) vs. 1,7 (SD 2,18), $p < 0,05$] und auch die Gesamtexpression lag nicht signifikant über der von hämatogenen Metastasen [5,11 (SD 4,04) vs. 3,96 (SD 3,55)]. Zwar wiesen auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten eine mediane p-mTOR Expression für Lymphknotenmetastasen aus, welche mit 113,0 über dem Gesamtmedian von 102,5 lag, ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich daraus jedoch nicht. Bei der Betrachtung einer synchronen gegenüber einer metachronen Metastasierung zeigte sich bei Hager et al. eine nicht signifikante Expressionserhöhung für den p-mTOR-Gesamtscore sowie für die zytoplasmatische Färbung [4,83 (SD 4,08) vs. 3,94 (SD 3,33) und 2,75 (SD 2,45) vs. 1,94 (SD 2,03)]. In Bezug auf mTOR vorgeschaltete Elemente der Signalkaskade wurden zudem die Expressionsmuster von pAkt und PTEN untersucht. Dabei zeigte sich die nukleäre, membranöse sowie gesamt pAkt-Expression bei metastasierten primären RCCs und ihren Metastasen gegenüber dem Normalgewebe signifikant erhöht, wohingegen die zytoplasmatische Expression signifikant erniedrigt war

(jeweils $p < 0,05$). Die nukleäre p-Akt-Expression lag in metastasierten primären RCCs signifikant unter der in Metastasen ($p < 0,05$) und die pAkt-Gesamtexpression in Metastasen nicht-signifikant über der Expression in metastasierten primären RCCs, was, entsprechend den Befunden von Schultz et al. (224), für eine weitergehende Aktivierung der mTOR-Signalkaskade im metastatischen Gewebe sprechen könnte. Zwischen der pAkt-Gesamtexpression und der p-mTOR-Gesamtexpression konnte sowohl für die metastasierten primären RCCs und deren Metastasen, als auch das benigne Gewebe eine positive Korrelation gezeigt werden, wodurch nochmals die enge Verzahnung zwischen einer p-Akt- und konsekutiven p-mTOR-Aktivierung innerhalb des Pathways deutlich wird. Lymphknotenmetastasen sowie synchrone Metastasen zeigten signifikant stärkere nukleäre pAkt-Expressionen als hämatogene bzw. metachrone Metastasen, was sich bezüglich der lymphogenen Metastasierung mit der festgestellten signifikant erhöhten p-mTOR Expression deckt. Die Tatsache, dass synchrone Metastasen eine stärkere pAkt-Expression aufweisen, könnte als Zeichen einer aggressiveren Erkrankung gedeutet werden und spiegelt sich auch in der oben genannten erhöhten p-mTOR-Expression synchroner Metastasen wider.

Hinsichtlich der PTEN-Expression zeigte sich die zytoplasmatische Färbung in metastasierten primären RCCs und deren Metastasen signifikant schwächer und nukleäre Färbung signifikant stärker im Vergleich zu den benignen Proben. Nukleäre, zytoplasmatische sowie Gesamtexpression waren in Metastasen stärker als in den metastasierten primären RCCs. Damit scheint eine erhöhte nukleäre Expression ein eher fortgeschrittenes Tumorstadium anzuzeigen, während eine zytoplasmatische Reduktion einen frühen Schritt der Tumorgenese darstellt. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass zytoplasmatisches PTEN die pAkt-Expression absenken und Apoptose fördern soll, während eine nukleäre Expression, beispielsweise über die Herabregulation von Cyclin D1, eine Rolle beim Zellzyklusarrest spielt. In Metastasen korrelierten p-mTOR und PTEN in der Regel positiv und in metastasierten primären RCCs galt dies für das zytoplasmatische Kompartiment.

Darüber hinaus untersuchten Hager et al. mit pS6 einen weiteren Bestandteil der mTOR-Signalkaskade (236) und seinen Zusammengang mit der p-mTOR-Expression anhand von 35 lokalisierten primären RCCs, 45 metastasierten primären RCCs sowie deren 45 gematchten Metastasen und 45 Proben normalen Nierengewebes. Es zeigte sich eine stärkere pS6 Expression in metastasierten primären RCCs und deren Metastasen im Vergleich zu normalen Nierengewebe und lokalisierten primären RCCs, was sich mit den o.g. Untersuchungen durch Schultz et al. (224) deckt. Eine p-S6-Überexpression zeigte sich in 88.9% der Metastasen im Vergleich zu 53.3% der metastasierten primären RCCs. Hinsichtlich des zytoplasmatischen Expressionsscores von p-mTOR korrelierte dieser sowohl im normalen Nierengewebe als auch in metastasierten primären RCCs und deren Metastasen positiv mit dem pS6-Score.

4.2 Kontingenzanalyse

Es zeigte sich im Rahmen der vorliegenden Untersuchung einzig für ein erhöhtes Verhältnis von p-mTOR zu mTOR ein signifikanter Zusammenhang mit dem Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ II ($p=0,003$, $\Phi=0,364$), während sich für p-mTOR ein numerischer Unterschied zeigte, welcher bei einem p-Wert von 0,051 jedoch keine Signifikanz erreichte. Dabei stehen diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit einer Studie von Habib et al. (237), welche bei primären RCCs von Patienten mit Diabetes mellitus im Vergleich zu Patienten ohne diabetische Erkrankung eine verstärkte Expression von p-Akt und p-70S6K nachgewiesen hatten.

Während sich darüber hinaus für ein metastasiertes Krankheitsstadium keine signifikanten Zusammenhänge ergaben, existieren hinsichtlich Korrelationen des Expressionsstatus von Bestandteilen der mTOR Signalkaskade und klinisch-pathologischen Merkmalen bei Primärtumoren zahlreiche Studien.

In der oben zitierten Studie untersuchten **Schultz et al.** (224) für die primären ccRCCs signifikante Korrelationen in Bezug auf pT-Stadium, Fuhrman-Grade und Tumorgroße. Die PTEN-Expression war dabei signifikant assoziiert mit dem pT-Stadium ($p=0,032$), ebenso wie die p-Akt-Expression ($p=0,004$) und die p-S6-Expression ($p=0,0004$). 4EBP1 war signifikant assoziiert mit dem pT-Stadium ($p=0,036$) und der Tumorgroße ($p=0,025$).

Pantuck et al. (226) untersuchten anhand von Nephrektomiepräparaten die immunhistochemische Expression von p-Akt, PTEN, p27 sowie pS6 bei 375 Patienten mit RCC und korrelierten diese mit klinischen sowie pathologischen Merkmalen. Von diesen 375 Patienten besaßen 52 tumorpositive Lymphknoten und bei 59 lagen Organmetastasen vor. Eine signifikant erhöhte zytoplasmatische pAkt-Expression war zu beobachten beim Vergleich von ccRCCs gegen nicht-ccRCCs ($p=0,01$). Dagegen lag bei Patienten mit lokalisierter Erkrankung im Vergleich zu metastasierter Erkrankung eine signifikant höhere nukleäre Expression ($p=0,02$) vor. Weiterhin lag eine inverse Korrelation mit der Tumorgroße vor ($R=-0.13$, $p=0,01$). Die PTEN-Expression war in Tumoren mit niedrigem T-Stadium (T1/2 gegen T3/4, $p=0,04$) sowie in nicht-ccRCCs ($p<0,001$) ebenso wie im Falle eines lokalisierten Erkrankungsstadiums ($p=0,07$) erhöht. Die nukleäre p27-Expression war in ccRCCs erhöht ($p=0,02$) und korrelierte negativ mit der Tumorgroße ($R=-0.12$, $p=0,02$) und die zytoplasmatische Expression war im metastasierten Erkrankungsstadium signifikant erhöht ($p=0,01$). Eine verstärkte pS6-Expression war verbunden mit einem höheren T-Stadium ($p<0,001$), einem erhöhten Fuhrman-Grading ($p<0,001$), einem metastasierten Erkrankungsstadium ($p<0,01$) sowie dem Vorliegen eines ccRCCs ($p=0,01$).

Darwish et al. (227) untersuchten an einem Kollektiv von 419 Patienten mit nicht metastasierten ccRCCs die Assoziation abweichender immunhistochemischer Expressionsmuster bestimmter Komponenten der mTOR-Signalkaskade mit dem onkologischen Outcome und klinisch-pathologischen Charakteristika der Patienten. Abhängig von der Anzahl alterierter Parameter im Vergleich zum jeweils benignen Kontrollgewebe wurden folgende Risikogruppen etabliert: niedrig (≤ 3 alterierte Marker, entsprechend 51% der Proben), moderat (4-5

alterierte Parameter, entsprechend 36% der Proben) und hoch (>5 alterierte Parameter, entsprechend 13% der Proben). Es konnte festgestellt werden, dass eine insgesamt steigende Anzahl alterierter Parameter signifikant korrelierte mit dem Tumor-Stage ($p < 0,001$) und Tumor-Grade ($p < 0,001$), der Lymphgefäßinvasion ($p < 0,001$), dem Lymphknotenstatus ($p = 0,018$), Tumornekrosen ($p < 0,001$) und dem Auftreten venöser Tumorthromben ($p = 0,021$). Für die zytoplasmatischen Expressionsmuster von mTOR und p-mTOR bei lokalisierter Erkrankung ergab sich lediglich für mTOR eine Korrelation zwischen einer erhöhten Expression und dem vermehrten Auftreten von venösen Tumorthromben und einem erhöhten Tumor-Stage. Obwohl die Expressionsmuster von p-mTOR keine derartigen Assoziationen aufwiesen, waren nachgeschaltete Komponenten wie p-S6 und HIF-1 α dennoch mit einigen klinischen und pathologischen Merkmalen verknüpft. mTOR war der insgesamt am zweithäufigsten alterierte Parameter.

Marker	Alterierte Fälle	Assoziierte klinisch-pathologische Charakteristika (p-Wert)
Phos-S6	33.9%	Stage (0.006), Grade (<0.001), Lymphgefäßinvasion (<0.001), Nekrose (0.004), venöser Tumorthrombus (0.033)
Phos-mTOR	43.0%	Keine
mTOR	55.1%	Stage (0.002), venöser Tumorthrombus (0.019)
Phos-AKT	41.1%	Grade (<0.001), Lymphgefäßinvasion (0.001)
HIF-1 α	51.6%	Stage (<0.001), Grade (<0.001), Lymphgefäßinvasion (0.049), Nekrose (0.003), venöser Tumorthrombus (<0.001)
RAPTOR	57.5%	Stage (0.005), Grade (0.040), venöser Tumorthrombus (0.049)
PTEN	16.2%	Grade (<0.001), Lymphgefäßinvasion (0.018), sarkomatoide Differenzierung (0.024)
PI3K	15.8%	Stage (0.015)
Phos-4EBP1	28.9%	Grade (0.005), sarkomatoide Differenzierung (0.040)

Tabelle 24: Korrelationen nach Darwish et al. (227)

Abkürzungsverzeichnis: **HIF** = Hypoxie induzierter Faktor, **Phos-4E-BP1** = Phosphoryliertes eukaryotisches initiation factor binding protein-1, **Phos-AKT** = Phosphorylierte Proteinkinase B, **Phos-mTOR** = phosphoryliertes mammalian Target of Rapamycin, **Phos-S6** = Phosphoryliertes S6, **PI3K** = Phosphatidylinositol 3-kinase, **PTEN** = phosphatase and tensin homolog, **Raptor** = regulatory-associated protein of mTOR

Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, dass Darwish et al. eine Alteration der Werte dabei als eine bestimmte Mindestabweichung vom jeweiligen Expressionsscore der korrespondierenden benignen Probe definierten, was von der im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gewählten Unterscheidung durch Mediane abweicht. Für mTOR und p-mTOR waren dies entsprechend der Veröffentlichung verringerte Expressionen im Vergleich zum benignen Kontrollgewebe. Unklar bleibt, weshalb nachfolgend Haddad et al. (238) in ihrer externen Validierung der Ergebnisse von Darwish et al. hinsichtlich der p-mTOR-Expression eine ebensolche als alteriert definierten, wenn diese im Vergleich zum benignen Gewebe erhöht war.

In ebendieser Studie von **Haddad et al.** (238) wurden die Expressionsmuster von PTEN, PI3K, p-mTOR sowie p-S6 und p-4EBP1 an 528 Patienten mit nichtmetastasierten ccRCCs untersucht. Alterationen der Expressionsmuster im Vergleich zu benignem Gewebe wurden in 52% (PI3K), 78% (PTEN), 25% (p-mTOR), 86% (p-4EBP1) und 30% (p-S6) beobachtet. Es ergaben sich die Risikogruppen hoch (4-5 alterierte Marker), mittel (2-3 alterierte Marker) und niedrig (0-1 alterierte Marker). Dabei schien, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Darwish et al. (227), die zytoplasmatische p-mTOR-Expression negativ mit fortgeschrittenem pathologischem Stadium zu korrelieren ($p=0,01$), welches in dieser Studie am Auftreten eines höheren Tumor-Grades sowie Tumornekrose festgemacht wurde. So wiesen 28.4% der Gruppe „pTany, low grade, no necrosis“ eine p-mTOR-Alteration auf, wohingegen nur 10.8% der Gruppe „pTany, high grade, necrosis present“ eine veränderte Expression zeigten. Für letztere Gruppe lag zudem mit signifikant erhöhter Wahrscheinlichkeit eine pS6-Expressionserhöhung ($p=0,008$) sowie hoher 2-Marker-Score ($p=0,002$) vor.

Hager et al. (233) zeigten, dass die membranöse sowie die Gesamtexpression von p-mTOR in metastasierten Primärtumoren negativ korreliert mit dem Tumorgrade ($R=-0.324$, $p=0,036$ bzw. $R=-0.321$, $p=0,038$) und negativ korrelierte auch die Gesamtexpression in metastasierten primären RCCs mit dem MSKCC-Score ($R=-0.305$, $p=0,044$), was sich im Trend mit den oben genannten Untersuchungen durch Darwish et al. (227) und Haddad et al. (238) deckt. Die Tatsache, dass die nukleäre pAkt-Expression positiv korrelierte mit dem

Tumorgrade, die zytoplasmatische Expression positiv mit Gefäßinvasion und die Gesamt-pAkt positiv mit Tumorstage sowie Gefäßinvasion, ließ für die Autoren den Schluss zu, dass eine starke Expression von pAkt in diesen Kompartimenten mit einer eher fortgeschrittenen Tumorerkrankung zusammenhängt. In Bezug auf metastasierte Gewebeproben war die gesamt-p-mTOR- sowie gesamt-pAKT-Expression in der Gruppe mit schlechter MSKCC Prognose erhöht, was für einen Zusammenhang zwischen einer starken Aktivierung der Signalkaskade und weit fortgeschrittener Erkrankung sprechen könnte. In der Untersuchung von Hager et al. zur pS6-Expression (236) korrelierte der Tumor-Grade der metastasierten primären RCCs positiv mit der p-S6-Expression ($R=0.43$, $p<0,05$) und eine Überexpression wurde häufiger in T2 als in T1 Tumoren beobachtet ($p<0,05$).

4.3 Betrachtung der Überlebensanalysen: Kaplan-Meier und Cox-Regression

Hinsichtlich des Gesamt- beziehungsweise Krebspezifischen Überlebens ergaben sich im Rahmen der vorliegenden Untersuchung in der Kaplan-Meier-Analyse keine signifikanten Unterschiede für eine mTOR- oder p-mTOR-Expression bzw. Ratio oberhalb oder unterhalb des Medians. Für mTOR zeigte sich zwar bei einer Expression größer dem Median ein minimal verbessertes mittleres Überleben [OS 83,802 Monate vs. 83,746 Monate ($p=0,881$) und CSS 86,341 Monate vs. 83,671 Monate ($p=0,997$)], dennoch zeigte die Gruppe \leq Median im Verlauf ein besseres kumulatives Überleben. Für p-mTOR zeigte eine Expression \leq Median sowohl im medianen Überleben [OS 135,524 Monate vs. 66,168 Monaten ($p=0,717$) und CSS 135,524 Monate vs. 66,168 Monate ($p=0,577$)] als auch im Langzeitverlauf ein verbessertes Überleben an. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Aktivierung des mTOR-Pathways sowohl durch eine Überexpression als auch durch Hyperphosphorylierung einen aggressiveren Krankheitsverlauf anzeigt. Die Relevanz der Hyperphosphorylierung wird zudem nochmals unterstrichen im Rahmen der Betrachtung der Ratio. Hier zeigte sich für das mittlere Überleben eine

verbesserte Prognose für die Gruppe \leq Median [OS 82,135 Monate vs. 74,365 Monate ($p=0,525$) und CSS 82,135 Monate vs. 77,213 ($p=0,395$)]. Dieser Unterschied hob sich im weiteren Verlauf jedoch auf.

Diese Befunde decken sich dabei mit den Untersuchungen durch **Hager et al.** (236), welche für Patienten mit einer Überexpression von pS6 sowohl in metastasierten primären RCCs als auch den Metastasen ein zwar nicht signifikantes, aber doch tendenziell verkürztes OS auswies ($p=0,15$ bzw. $p=0,16$) und zugleich auf die festgestellte Korrelation von pS6 und p-mTOR in ihrer Untersuchung verwiesen. Ein Trend hin zu einem verkürzten Gesamtüberleben wurde von **Hager et al.** (232) auch für eine Überexpression von p-Akt in primären Metastasen festgestellt ($p=0,065$). Hingegen war in ebendieser Untersuchung eine membranöse ($p<0,05$) und gesamt-Überexpression ($p=0,055$) von p-Akt im Primärtumor mit einem verbesserten Gesamtüberleben verknüpft.

Deutlichere, wenn auch ebenfalls nicht signifikante, Unterschiede ließen sich im Rahmen der vorliegenden Untersuchung in Bezug auf das Subkollektiv der mTOR-Inhibitor-Therapierten feststellen, wobei es zu einer Umkehr der Verhältnisse aus der Analyse des Gesamtkollektivs kam. Patienten mit einer mTOR Expression $>$ Median zeigten ein verbessertes mittleres Überleben [OS bzw. CSS 70,459 Monate vs. 58,366 Monate ($p=0,277$)]. Ein ähnlicher Überlebensvorteil zeigte sich für eine p-mTOR-Expression $>$ Median [OS bzw. CSS 78,423 Monate vs. 54,834 Monate ($p = 0,234$)] und eine Ratio $>$ Median [OS bzw. CSS 74,237 Monate vs. 55,349 Monaten ($p=0,402$)]. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung zu einer Studie von **Li et al.** (231), welche an einem Kollektiv von 18 Patienten mit VEGFR-TKI-refraktären metastasierten RCCs untersuchten, inwieweit das spätere Ansprechen auf eine Therapie mit Everolimus mit der Expression von bestimmten Komponenten der mTOR-Kaskade zusammenhängt. Untersucht wurden Proben aus den Nephrektomiepräparaten der primären metastasierten RCCs. Zu den untersuchten Parametern zählten p-AKT, p-mTOR, p-4EBP1 und p-S6RP. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer positiven p-mTOR-Expression bzw. einer positiven p-S6RP Expression gegenüber Patienten mit einer

negativen Expression ein verbesserter progressionsfreies Überleben hatten (11.3 vs. 3.7 Monate für beide, $p=0,001$ bzw. $p=0,002$). Unterstützt werden diese Befunde durch **Cho et al.** (239), welche an einem Kollektiv von 20 Patienten einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Expression von p-S6RP und einem verbesserten Ansprechen auf den mTOR-Inhibitor Temsirolimus zeigen konnten. Einen Hinweis auf eine mögliche Erklärung kann die o.g. Erhebung von **Hager et al.** (236) bieten, wonach hinsichtlich des zytoplasmatischen Expressionsscores von p-mTOR dieser sowohl im Normalgewebe als auch im metastasierten primären RCC und Metastasen positiv korreliert mit dem pS6-Score.

In Bezug auf die multivariaten Cox-Regressionsanalyse konnte im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung für den Zeitraum zwischen Erstdiagnose des RCC und letztem Follow-Up keiner der ausgewählten Faktoren als unabhängiger Prädiktor eines verkürzten OS oder CSS bestätigt werden, auch wenn sich univariat Signifikanzen für ein Erkrankungsalter > 70 Jahre, ein synchrones Metastasierungsgeschehen, ein Fuhrman-Grading des Primärtumors > 2, sarkomatoide Komponenten innerhalb des Primärtumors, eine Anämie, einen erhöhten CRP-Spiegel, eine GOT-Erhöhung sowie einen Karnofsky-PS < 80 und einem ASA-Wert > 2 ergeben hatten.

Bezogen auf den Zeitraum zwischen Erstmetastasierung und letztem Follow up konnten univariat, in Übereinstimmung mit existierenden Studien (47-49), das Auftreten von Knochenmetastasen sowie die Zugehörigkeit zu einer Prognosegruppe, bestehend aus Patienten mit Leber und/oder Knochenmetastasen als negative prognostische Faktoren identifiziert werden. Im Rahmen der multivariaten Analyse konnte keiner der Faktoren bestätigt werden. Für einen pro Patienten gemittelten mTOR-Score > des Medians bzw. p-mTOR-Score > des Medians bzw. einer Ratio > des Medians konnte kein Zusammenhang zur krebsspezifischen oder insgesamten Überlebensrate gezeigt werden.

Weitere Studien untersuchten die Zusammenhänge zwischen den Expressionsstatus verschiedener Bestandteile der mTOR-Signalkaskade in Bezug auf Primärtumoren.

Nishikawa et al. (228) untersuchten die immunhistochemische Expression von PTEN, p-Akt, p-mTOR, p-S6 sowie p-4EBP1 bei 137 Patienten mit nichtmetastasiertem RCC, bei welchen zuvor eine radikale Nephrektomie durchgeführt worden war. Dabei erwiesen sich ein erhöhter Expressionslevel von p-mTOR ($p=0,028$, HR=1.8) sowie p-4EBP1 ($p=0,0027$, HR=3.36) neben einem CRP-Spiegel $>0.4\text{mg/dl}$ ($p<0,001$, HR=3.13), einem pathologischen Tumorstage ≥ 3 ($p=0,0021$, HR=1.70) und einer vorliegenden mikrovaskulären Invasion ($p<0,001$, HR=1.20) univariat als signifikante Prädiktoren der Krankheitsrekurrenz innerhalb eines medianen Beobachtungszeitraumes von 63.5 Monaten. Multivariat konnte dieser Zusammenhang für p-4EBP1 ($p<0,001$, HR=4.08), den CRP-Spiegel ($p=0,010$, HR=3.64) sowie das pT-Stadium ($p=0,035$, HR=2.64) bestätigt werden. Eine steigende Anzahl alterierter Parameter war assoziiert mit einem ansteigenden Risiko für Krankheitsrekurrenz. Während lediglich bei 11.9% (5 von 42) der Patienten ohne einen alterierten Parameter ein neuerliches Auftreten der Erkrankung zu verzeichnen war, stieg dieser Anteil auf 46.0% (23 von 50) bei Patienten mit einem alterierten Parameter bzw. 68.8% (31 von 45) bei Patienten mit mindestens zwei alterierten Parametern. Für die Autoren ließ diese Feststellung die Schlussfolgerung zu, dass eine Kombination von immunhistochemischen Markern aus der mTOR-Signalkaskade mit klinisch-pathologischen Merkmalen eine bessere Vorhersage des Krankheitsverlaufes bzw. der Krankheitsrekurrenz ermöglichen könnte. Die Tatsache, dass p-4EBP1 eine höhere Aussagekraft in Bezug auf die Krankheitsrekurrenz besaß als p-mTOR, könnte hierbei laut Autoren auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die Phosphorylierung von 4EBP1 neben p-mTOR auch durch weitere Kinasen wie CDK-1 und ERK1/2 initiiert werden kann (vgl. Armengol et al. (240)).

Oben zitierten Untersuchung von **Schulz et al.** (224) zeigte für die Gruppe der Primärtumoren univariat eine signifikante Assoziation der p-S6-Expression mit

dem Krankheitsspezifischen Überleben (DSS) und der Tumorprogression (jeweils $p=0,0001$). Auch 4EBP1 war signifikant assoziiert mit dem DSS ($p=0,0152$) und der Tumorprogression ($p=0,0025$). In der multivariaten Analyse erwiesen sich für das DSS sowie die Tumorprogression die pS6-Expression ($p=0,006$ bzw. $p=0,004$) neben der Tumorgröße ($p=0,005$ bzw. $p=0,043$) als unabhängiger prognostischer Marker. Dabei schien eine Überexpression von pS6 ein tendenziell besseres Outcome anzuzeigen, eine Tatsache, welche allerdings den Erhebungen von Pantuck et al. (226) sowie Hager et al. (236) widerspricht, welche für eine Überexpression von p-S6 eine tendenziell schlechtere Prognose zeigen konnten. Für die Gruppe der metastasierten ccRCCs konnte weder innerhalb einer univariaten, noch multivariaten Analyse, das Expressionsverhalten eines der untersuchten Marker als Prädiktor für das DSS bestätigt werden.

In oben zitierter Untersuchung von **Pantuck et al.** (226) erwiesen sich im Rahmen der multivariaten Cox-Regressionsanalyse des Gesamtkollektivs ein ECOG-PS ≥ 1 (HR=2.14, $p=0,002$), ein T3 bzw. T4- Stadium (HR=2.18, $p=0,004$ bzw. HR=3.86, $p=0,001$), N ≥ 1 (HR=2.14, $p=0,002$), M1 (HR=2.60, $p<0,001$), G2 bzw. G3 (HR=3.65, $p=0,032$ bzw. HR=4.08, $p=0,022$) als unabhängige prognostische Faktoren des DSS. Hinzu kamen eine zytoplasmatische p-Akt-Expression $\geq 40\%$ (HR=1.69, $p=0,012$), eine nukleäre p-Akt-Expression $\geq 10\%$ (HR=0.60, $p=0,011$), eine PTEN-Expression $\geq 75\%$ (HR=0.67, $p=0,024$) sowie eine pS6-Expression $\geq 70\%$ (HR=1.61, $p=0,011$). Nach Aufteilung der Patienten in eine N0/M0- sowie N+/M+-Gruppe, jeweils bezogen auf den Zeitpunkt der Erstmanifestation, zeigten für die N0/M0-Gruppe eine pS6-Expression $<65\%$ ($p=0,0001$), eine p27-Expression $>35\%$ ($p=0,039$) sowie eine erhöhte nukleäre pAkt-Expression $>5\%$ ($p=0,027$) in der Kaplan-Meier-Kurve ein verlängertes Überleben an, während in der multivariaten Analyse davon einzig pS6 bestätigt werden konnte (für pS6 $\geq 65\%$: HR=3.14, $p=0,002$). Darüber hinaus ließen sich ein ECOG-PS ≥ 1 (HR=2.87, $p=0,005$) und ein T3/4- Stadium (HR=3.52, $p=0,001$) multivariat bestätigen. Für die N+/M+-Gruppe wies eine pS6-Expression $<70\%$ mit einem medianen Überleben von 20.2 Monaten (+/- 3.3 SE) gegenüber 13.6 Monaten (+/-1.8 SE) bei pS6 $\geq 70\%$ in der Kaplan-Meier-Analyse eine signifikant

bessere Prognose aus ($p=0,002$). Eine verstärkte Expression von PTEN $\geq 35\%$ war ebenfalls verknüpft mit einem verlängerten Überleben (16.0 Monate \pm 3.3 SE gegenüber 8.0 Monate \pm 1 SE, $p=0,041$). Eine zytoplasmatische pAkt-Expression $< 35\%$ zeigte ebenfalls eine bessere Prognose an (25.5 Monate \pm 4.6 SE vs. 15.1 Monate \pm 1.5 SE, $p=0,045$). In der multivariaten Analyse blieben ein T3/4-Stadium (HR=1.82, $p=0,011$), $N \geq 1$ (HR=1.75, $p=0,010$), sowie eine pS6-Expression $\geq 70\%$ (HR=1.55, $p=0,042$) unabhängige prognostische Faktoren des DSS.

Darwish et al. (227) zeigten in oben genannter Untersuchung einen Zusammenhang zwischen einer Gesamtanzahl alterierter Parameter des mTOR-Pathways und CSS bzw. Rezidivrisiko bei primären ccRCCs. Für das rezidivfreie Überleben zeigten alle drei Gruppen gegeneinander statistisch signifikante Unterschiede (niedrig vs. moderat $p=0,05$, moderat vs. hoch $p<0,001$, hoch vs. niedrig $p<0,001$) und das 5-Jahres-rezidivfreie Überleben lag bei 95% für die niedrige Gruppe gegenüber 87% und 56% für die moderate bzw. hohe Marker Gruppe. Für das CSS erreichte lediglich der Vergleich hoch vs. niedrig Signifikanz (5-Jahres ÜLR 85% vs. 97%, $p=0,01$). Auch in der multivariaten Analyse bestätigte sich das erhöhte Risiko des Rezidivs für die Gruppe > 5 alterierte Marker gegenüber der niedrig-Risiko-Gruppe (HR 3.3, $p=0,01$). Zudem zeigte sich, dass Patienten, die der moderaten bzw. hoch-Risiko-Gruppe zuzuordnen waren, ein signifikant erniedrigtes CSS besaßen (HR 4.8 $p=0,008$).

Haddad et al. (238) zeigten für primäre ccRCCs, dass es weder in Bezug auf das rezidivfreie Überleben (RFS), noch auf das CSS ein signifikanter Zusammenhang mit der p-mTOR Expression besteht ($p=0,81$ bzw. $0,78$). Dagegen war die Expressionen von p-4EBP1 und p-S6 univariat mit dem RFS assoziiert ($p=0,02$ bzw. $p<0,001$). Die Gesamtanzahl aller fünf alterierten Marker war ebenso in der Lage, eine kürzeres RFS anzuzeigen ($p=0,02$, Patienten mit 4-5 alterierten Marken gegenüber 0-1 alterierten Markern), wie auch ein alternatives Panel, bestehend aus den zwei Parametern p-S6 und p-4EBP1 ($p=0,003$, Patienten mit 2 alterierten Marken gegenüber 0 alterierten Markern). Das 5-Jahres-RFS lag für die Gruppe mit 0-1 alterierten Markern bei 92,8% gegenüber 75,9% bei 4-5 alterierten Markern ($p=0,008$) bzw. bei 93,6%

gegenüber 71,0% ($p < 0,001$) für 0 vs. 2 alterierte Marker im reduzierten 2-Marker-Modell. Für die CSS ergab sich keinerlei signifikanter Zusammenhang zu einem der Marker bzw. Modelle.

Im Rahmen einer auf Teilen des Kollektivs dieser Arbeit aufbauenden Publikation von **Rausch et al.** (241) wurde das Vergleichskollektiv derjenigen Patienten mit primären Nierenzellkarzinomen nochmals vergrößert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von mTOR in primären RCCs assoziiert ist mit dem Auftreten von Tumornekrosen, wohingegen eine erhöhte p-mTOR Expression signifikant korreliert war mit einem fortgeschrittenen T-Stadium, einem erhöhten Fuhrman-Grade sowie Tumornekrosen und dem Auftreten sarkomatoider Anteile. Ein erhöhtes Verhältnis von p-mTOR zu mTOR war assoziiert mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und dem Auftreten sarkomatoider Anteile. In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich ein lokal fortgeschrittener Primärtumor als unabhängiger prognostischer Marker und es konnte ein Trend hin zu einem verkürzten OS für Patienten mit einer verstärkten p-mTOR-Expression beobachtet werden.

4.4 Kritische Reflexion und Conclusio

Es ergeben sich hinsichtlich des Studiendesigns verschiedene Limitationen. Das immunhistochemische Verfahren bietet als semiquantitatives Verfahren mit seiner Untersucherabhängigkeit nur eine eingeschränkte Sicherheit der Ergebnisse, wenngleich eine möglichst hohe Objektivität durch die Hinzunahme eines zweiten, unabhängigen Auswerters angestrebt wurde. Durch Verwendung eines weiteren Verfahrens, wie beispielsweise eines Western-Blots, könnte zukünftig jedoch eine noch höhere Verlässlichkeit der Ergebnisse erzielt werden.

In Bezug auf die diskutierten Studien erschwerte eine teilweise heterogene und nicht immer detailliert beschriebene Auswertungsstrategie und der Einsatz unterschiedlicher Farbe-Kits den Vergleich mit eigenen Ergebnissen.

Um Aspekten der intratumoralen Heterogenität Rechnung zu tragen, wurden jeweils zwei Gewebestanzes aus den Metastasenproben entnommen, wenngleich eine höhere Anzahl u.U. noch validere Ergebnisse liefern könnte.

Hinsichtlich der Kollektive waren die Proben der Metastasen, der Primärtumoren und des benignen Nierengewebes nicht gematcht. Interessant für zukünftige Untersuchungen könnte, ähnlich des Studiendesigns von Hager et al. (232, 233, 236), auch eine verstärkte Untersuchung der jeweiligen individuellen Tumorentwicklung sein.

Innerhalb des Metastasenkollektivs existierten nicht zu sämtlichen Metastasen, die bei den unterschiedlichen Patienten auftraten, auch feingewebliche Proben, sodass die jeweiligen Erhebungen unter Umständen nur einen Ausschnitt der jeweiligen Erkrankung darstellen. Dies führte, trotz der bisher umfangreichsten Untersuchung des Expressionsstatus innerhalb von Metastasen, dazu, dass einzelne Tumorlokalisationen nur in geringer Anzahl vertreten waren und statistische Signifikanz schwer zu erreichen war.

Bei der Betrachtung des Subkollektivs der mTOR-Inhibitor-Therapierten wurde vernachlässigt, welchen Zeitpunkt innerhalb des Therapieverlaufes die untersuchte Metastase widerspiegelte. Entsprechend bleibt unklar, ob eine

eventuelle Vortherapie mit anderen Therapeutika und eine bereits stattgehabte mTOR-Inhibitor-Therapie einen Einfluss auf die molekularen Pathways hatte.

In Bezug auf die Überlebensanalysen war es nicht möglich, zu jedem Patienten vollständige Follow-up-Informationen zu erhalten und teilweise waren die Beobachtungszeiträume kurz, sodass die Aussagekraft dieser Untersuchungen begrenzt bleibt.

Über den Umfang der hier vorliegenden Untersuchung hinaus, könnte eine kombinierte Untersuchung von mTOR bzw. p-mTOR mit weiteren Bestandteilen der mTOR-Signalkaskade innerhalb von Metastasen zudem ein noch detailliertes Bild der Aktivierung dieses Pathways liefern.

Dennoch lassen sich aufgrund der Ergebnisse dieser Studie in Bezug auf die eingangs formulierte Fragestellung folgende Feststellungen treffen:

1. Metastasen von Nierenzellkarzinomen zeigen im Vergleich zu Primärtumoren signifikant erhöhte Expressionen für mTOR und p-mTOR und auch die Ratio übertrifft die der Primärtumoren absolut gesehen. In Bezug auf benignes Nierengewebe zeigt sich ein absolut gesehen erhöhter mTOR-Spiegel bei signifikanten Erhöhungen der p-mTOR-Expression und der Ratio. Primärtumoren dagegen zeigen bei absolut gesehen erhöhter Ratio geringere Expressionen von mTOR und p-mTOR im Vergleich zu benignem Gewebe.
2. Die Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass der Übergang von benignem Nierengewebe zum Primärtumor begleitet ist von einer Zunahme des Verhältnisses von p-mTOR zu mTOR, während der weitere Metastasierungsvorgang gekennzeichnet ist sowohl durch eine Erhöhung von mTOR als auch dessen zunehmende Phosphorylierung.
3. Der Nachweis signifikanter Expressionsunterschiede von mTOR bzw. p-mTOR zwischen einzelnen Tumorlokalisationen konnte dagegen nicht erbracht werden.
4. Hinsichtlich der Zusammenhänge von Expressionen innerhalb des Metastasenkollektivs mit klinisch-pathologischen Charakteristika, zeigte

sich das Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ II assoziiert mit einer erhöhten Ratio.

5. Zwar waren die Expressionen von mTOR und p-mTOR nicht signifikant mit dem Überleben verknüpft, doch ließ sich eine interessante Trendumkehr beobachten. Während eine erhöhte mTOR und p-mTOR Expression innerhalb des Gesamtkollektivs ein tendenziell schlechteres Überleben auswies, zeigte innerhalb eines Subkollektivs von mTOR-Inhibitor-Therapierten eine ebensolche Expression ein tendenziell verlängertes Überleben an.

5 Zusammenfassung

Inhibitoren der mTOR-Signalkaskade stellen im Rahmen der Therapie fortgeschrittener Nierenzellkarzinome eine bedeutsame Option dar. Um bestehende Lücken hinsichtlich Expressionsuntersuchungen dieses Signalstoffwechselweges bei Nierenzellkarzinometastasen zu schließen, wurde im Rahmen der vorliegenden Studie die immunhistochemische Expression von mTOR und p-mTOR anhand von 168 Metastasenproben von 91 Patienten im Vergleich zu Gewebe aus nicht gematchten Primärtumoren und benignem Nierengewebe untersucht. Mittels Tissue Micorarray und nachfolgender immunhistochemischer Färbung wurden semiquantitative Scores für mTOR und p-mTOR gebildet sowie deren Verhältnis zueinander berechnet. Die erhobenen Expressionswerte wurden zudem auf mögliche Zusammenhänge mit klinisch-pathologischen Charakteristika sowie Auswirkungen auf das Überleben hin untersucht.

Metastasen von Nierenzellkarzinomen zeigten im Vergleich zu Primärtumoren signifikant erhöhte Expressionen für mTOR und p-mTOR (jeweils $p < 0,001$), die Ratio übertraf die der Primärtumoren absolut gesehen. Gegenüber benignem Nierengewebe zeigten Metastasen absolut gesehen erhöhte mTOR-Expressionen bei signifikanter Erhöhungen der p-mTOR-Expression und der Ratio ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,001$). Primärtumoren zeigten bei absolut gesehen erhöhter Ratio geringere Expressionen von mTOR und p-mTOR im Vergleich zu benignem Gewebe (für mTOR $p < 0,001$). Die Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass der Übergang von benignem Nierengewebe zum Primärtumor begleitet ist von einer Zunahme des Verhältnisses von p-mTOR zu mTOR, während der weitere Metastasierungsvorgang gekennzeichnet ist sowohl durch eine Erhöhung von mTOR als auch dessen zunehmende Phosphorylierung. Eine Kruskal-Wallis Analyse konnte keinen Anhalt für signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Metastasierungslokalisationen liefern.

Hinsichtlich möglicher Zusammenhänge der Expressionen innerhalb des Metastasenkollektivs mit klinisch-pathologischen Charakteristika, zeigte sich im Rahmen eines Chi-Square-Tests ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem

Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ II und einem erhöhten Verhältnis von p-mTOR zu mTOR ($p=0,003$, $\Phi=0,364$).

Zwar waren die Expressionen von mTOR und p-mTOR im Rahmen von Kaplan-Meier-Analysen nicht signifikant mit dem Überleben verknüpft, doch ließ sich eine interessante Trendumkehr beobachten: Während eine erhöhte mTOR und p-mTOR Expression innerhalb des Gesamtkollektivs ein tendenziell schlechteres Überleben auswies, zeigte innerhalb eines Subkollektivs von mTOR-Inhibitor-Therapierten eine ebensolche Expression ein tendenziell verlängertes Überleben an.

Im Rahmen multivariater Cox-Regressionsanalysen, sowohl für den Zeitraum zwischen Erstdiagnose des RCC und letztem Follow up sowie dem Zeitraum zwischen Erstmetastasierung und letztem Follow up, konnten in multivariaten Analysen keiner der ausgewählten Faktoren als unabhängiger Prädiktor eines verkürzten OS oder CSS bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit für die Metastasen von Nierenzellkarzinomen die Bedeutung eines alterierten mTOR-Pathways unterstrichen werden. Diese Erkenntnis der unterschiedlichen Expressions- und Aktivierungsniveaus ist insbesondere für die Behandlung von metastasierten Nierenzellkarzinompatienten von klinischer Bedeutung.

6 Literaturverzeichnis

1. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. *European urology*. 2011;60(4):615-21.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015;136(5):E359-86.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2015*. CA: a cancer journal for clinicians. 2015;65(1):5-29.
4. Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C, et al. *Krebs in Deutschland 2009/2010*. In: Koch-Institut R, e.V. GdeKiD, editors. 9. 9th ed: Robert Koch-Institut Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2013.
5. Port FK, Ragheb NE, Schwartz AG, Hawthorne VM. Neoplasms in dialysis patients: a population-based study. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1989;14(2):119-23.
6. Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *European urology*. 2015;67(5):913-24.
7. Chow WH, Devesa SS. Contemporary epidemiology of renal cell cancer. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2008;14(5):288-301.
8. 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. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005;114(1):101-8.
9. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet (London, England)*. 2008;371(9612):569-78.
10. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjonneland A, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *American journal of epidemiology*. 2008;167(4):438-46.
11. Zucchetto A, Dal Maso L, Tavani A, Montella M, Ramazzotti V, Talamini R, et al. History of treated hypertension and diabetes mellitus and risk of renal cell cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2007;18(3):596-600.
12. Lindblad P, Chow WH, Chan J, Bergstrom A, Wolk A, Gridley G, et al. The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia*. 1999;42(1):107-12.
13. Tseng CH. Type 2 Diabetes Mellitus and Kidney Cancer Risk: A Retrospective Cohort Analysis of the National Health Insurance. *PloS one*. 2015;10(11):e0142480.
14. Bao C, Yang X, Xu W, Luo H, Xu Z, Su C, et al. Diabetes mellitus and incidence and mortality of kidney cancer: a meta-analysis. *Journal of diabetes and its complications*. 2013;27(4):357-64.
15. Boffetta P, Fontana L, Stewart P, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Janout V, et al. Occupational exposure to arsenic, cadmium, chromium, lead and nickel, and renal cell carcinoma: a case-control study from Central and Eastern Europe. *Occupational and environmental medicine*. 2011;68(10):723-8.
16. Karami S, Boffetta P, Stewart PS, Brennan P, Zaridze D, Matveev V, et al. Occupational exposure to dusts and risk of renal cell carcinoma. *British journal of cancer*. 2011;104(11):1797-803.

17. Ljungberg B, Bensalah K, Bex A, Canfield S, Dabestani S, Giles RH, et al. Guidelines on Renal Cell Carcinoma 2015.
18. Coleman JA. Familial and hereditary renal cancer syndromes. *The Urologic clinics of North America*. 2008;35(4):563-72; v.
19. Clague J, Lin J, Cassidy A, Matin S, Tannir NM, Tamboli P, et al. Family history and risk of renal cell carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(3):801-7.
20. Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Farmer GE, Lamiell JM, et al. Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature*. 1988;332(6161):268-9.
21. Sudarshan S, Karam JA, Brugarolas J, Thompson RH, Uzzo R, Rini B, et al. Metabolism of kidney cancer: from the lab to clinical practice. *European urology*. 2013;63(2):244-51.
22. Jonasch E, Gao J, Rathmell WK. Renal cell carcinoma. *BMJ (Clinical research ed)*. 2014;349:g4797.
23. Rübber H. *Uroonkologie*. 5th ed. Heidelberg: Springer; 2009.
24. Maher ER, Iselius L, Yates JR, Littler M, Benjamin C, Harris R, et al. Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *Journal of medical genetics*. 1991;28(7):443-7.
25. Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature genetics*. 1997;16(1):68-73.
26. Dharmawardana PG, Giubellino A, Bottaro DP. Hereditary papillary renal carcinoma type I. *Current molecular medicine*. 2004;4(8):855-68.
27. Alam NA, Bevan S, Churchman M, Barclay E, Barker K, Jaeger EE, et al. Localization of a gene (MCUL1) for multiple cutaneous leiomyomata and uterine fibroids to chromosome 1q42.3-q43. *American journal of human genetics*. 2001;68(5):1264-9.
28. Pfaffenroth EC, Linehan WM. Genetic basis for kidney cancer: opportunity for disease-specific approaches to therapy. *Expert opinion on biological therapy*. 2008;8(6):779-90.
29. Hansel DE, Rini BI. Molecular genetics of hereditary renal cancer: new genes and diagnostic and therapeutic opportunities. *Expert review of anticancer therapy*. 2008;8(6):895-905.
30. 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. *The American journal of surgical pathology*. 2013;37(10):1469-89.
31. Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 2009;16(5):432-43.
32. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Leibovich BC, Frank I, et al. Sarcomatoid renal cell carcinoma: an examination of underlying histologic subtype and an analysis of associations with patient outcome. *The American journal of surgical pathology*. 2004;28(4):435-41.
33. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiologia brasileira*. 2015;48(3):166-74.
34. Algaba F, Akaza H, Lopez-Beltran A, Martignoni G, Moch H, Montironi R, et al. Current pathology keys of renal cell carcinoma. *European urology*. 2011;60(4):634-43.
35. Ljungberg B, Bensalah K, Bex A, Canfield S, Dabestani S, Giles RH, et al. Guidelines on Renal Cell Carcinoma 2013.

36. Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nature genetics*. 2014;46(3):225-33.
37. Steffens S, Janssen M, Roos FC, Becker F, Schumacher S, Seidel C, et al. Incidence and long-term prognosis of papillary compared to clear cell renal cell carcinoma--a multicentre study. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2012;48(15):2347-52.
38. Pignot G, Elie C, Conquy S, Vieillefond A, Flam T, Zerbib M, et al. Survival analysis of 130 patients with papillary renal cell carcinoma: prognostic utility of type 1 and type 2 subclassification. *Urology*. 2007;69(2):230-5.
39. Hes O, Brunelli M, Michal M, Cossu Rocca P, Hora M, Chilosi M, et al. Oncocytic papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic, immunohistochemical, ultrastructural, and interphase cytogenetic study of 12 cases. *Annals of diagnostic pathology*. 2006;10(3):133-9.
40. Lam JS, Leppert JT, Beldegrun AS, Figlin RA. Novel approaches in the therapy of metastatic renal cell carcinoma. *World journal of urology*. 2005;23(3):202-12.
41. Janzen NK, Kim HL, Figlin RA, Beldegrun AS. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. *The Urologic clinics of North America*. 2003;30(4):843-52.
42. Gupta K, Miller JD, Li JZ, Russell MW, Charbonneau C. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer treatment reviews*. 2008;34(3):193-205.
43. Ljungberg B, Landberg G, Alamdari FI. Factors of importance for prediction of survival in patients with metastatic renal cell carcinoma, treated with or without nephrectomy. *Scandinavian journal of urology and nephrology*. 2000;34(4):246-51.
44. Shinohara N, Abe T. Prognostic factors and risk classifications for patients with metastatic renal cell carcinoma. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 2015.
45. Renshaw AA, Richie JP. Subtypes of renal cell carcinoma. Different onset and sites of metastatic disease. *American journal of clinical pathology*. 1999;111(4):539-43.
46. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, et al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(12):2763-71.
47. Negrier S, Escudier B, Gomez F, Douillard JY, Ravaud A, Chevreau C, et al. Prognostic factors of survival and rapid progression in 782 patients with metastatic renal carcinomas treated by cytokines: a report from the Groupe Francais d'Immunotherapie. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2002;13(9):1460-8.
48. Motzer RJ, Bukowski RM, Figlin RA, Hutson TE, Michaelson MD, Kim ST, et al. Prognostic nomogram for sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*. 2008;113(7):1552-8.
49. Shinohara N, Nonomura K, Abe T, Maruyama S, Kamai T, Takahashi M, et al. A new prognostic classification for overall survival in Asian patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *Cancer science*. 2012;103(9):1695-700.
50. Wahlgren T, Harmenberg U, Sandstrom P, Lundstam S, Kowalski J, Jakobsson M, et al. Treatment and overall survival in renal cell carcinoma: a Swedish population-based study (2000-2008). *British journal of cancer*. 2013;108(7):1541-9.
51. Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2005(1):CD001425.

52. Macleod LC, Tykodi SS, Holt SK, Wright JL, Lin DW, Tretiakova MS, et al. Trends in Metastatic Kidney Cancer Survival From the Cytokine to the Targeted Therapy Era. *Urology*. 2015;86(2):262-8.
53. Albiges L, Choueiri T, Escudier B, Galsky M, George D, Hofmann F, et al. A systematic review of sequencing and combinations of systemic therapy in metastatic renal cancer. *European urology*. 2015;67(1):100-10.
54. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *The TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th ed 2016. 272 p.
55. Lang H, Lindner V, de Fromont M, Molinie V, Letourneux H, Meyer N, et al. Multicenter determination of optimal interobserver agreement using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma: Assessment of 241 patients with > 15-year follow-up. *Cancer*. 2005;103(3):625-9.
56. Ficarra V, Righetti R, Piloni S, D'Amico A, Maffei N, Novella G, et al. Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma: retrospective analysis of 675 cases. *European urology*. 2002;41(2):190-8.
57. Kucuk U, Pala EE, Sezer O, Cakir E, Bayol U, Divrik RT. Significance of TNM staging, Demographic and Histologic Features in Predicting the Prognosis of Renal Cell Carcinoma. *Acta chirurgica Belgica*. 2015;115(3):202-7.
58. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2003;27(5):612-24.
59. Roupret M, Peyromaure M, Hupertan V, Larousserie F, Vieillefond A, Thiounn N, et al. [Bellini renal cell carcinoma. Diagnosis and treatment]. *Progres en urologie : journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie*. 2004;14(4):564-7.
60. Kroeger N, Xie W, Lee JL, Bjarnason GA, Knox JJ, Mackenzie MJ, et al. Metastatic non-clear cell renal cell carcinoma treated with targeted therapy agents: characterization of survival outcome and application of the International mRCC Database Consortium criteria. *Cancer*. 2013;119(16):2999-3006.
61. de Peralta-Venturina M, Moch H, Amin M, Tamboli P, Hailemariam S, Mihatsch M, et al. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. *The American journal of surgical pathology*. 2001;25(3):275-84.
62. Park JY, Lee JL, Baek S, Eo SH, Go H, Ro JY, et al. Sarcomatoid features, necrosis, and grade are prognostic factors in metastatic clear cell renal cell carcinoma with vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Human pathology*. 2014;45(7):1437-44.
63. Sengupta S, Lohse CM, Leibovich BC, Frank I, Thompson RH, Webster WS, et al. Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer*. 2005;104(3):511-20.
64. Choueiri TK, Garcia JA, Elson P, Khasawneh M, Usman S, Golshayan AR, et al. Clinical factors associated with outcome in patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Cancer*. 2007;110(3):543-50.
65. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(1):289-96.
66. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(8):2530-40.
67. Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Boumerhi G, Malhi S, Wood L, Elson P, et al. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in

patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(4):832-41.

68. Escudier B, Choueiri TK, Oudard S, Szczylik C, Negrier S, Ravaud A, et al. Prognostic factors of metastatic renal cell carcinoma after failure of immunotherapy: new paradigm from a large phase III trial with shark cartilage extract AE 941. *The Journal of urology*. 2007;178(5):1901-5.

69. Elson PJ, Witte RS, Trump DL. Prognostic factors for survival in patients with recurrent or metastatic renal cell carcinoma. *Cancer research*. 1988;48(24 Pt 1):7310-3.

70. Donskov F, von der Maase H. Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(13):1997-2005.

71. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(34):5794-9.

72. Heng DY, Xie W, Regan MM, Harshman LC, Bjarnason GA, Vaishampayan UN, et al. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *The Lancet Oncology*. 2013;14(2):141-8.

73. Jayson M, Sanders H. Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology*. 1998;51(2):203-5.

74. Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urologic oncology*. 2002;7(4):135-40.

75. Patard JJ, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guille F, Lobel B. Prognostic significance of the mode of detection in renal tumours. *BJU international*. 2002;90(4):358-63.

76. Bedke J, Buse S, Kurosch M, Haferkamp A, Jager D, Hohenfellner M. [Paraneoplastic syndrome in renal cell carcinoma]. *Der Urologe Ausg A*. 2007;46(1):45-8.

77. Tosaka A, Ohya K, Yamada K, Ohashi H, Kitahara S, Sekine H, et al. Incidence and properties of renal masses and asymptomatic renal cell carcinoma detected by abdominal ultrasonography. *The Journal of urology*. 1990;144(5):1097-9.

78. Warren KS, McFarlane J. The Bosniak classification of renal cystic masses. *BJU international*. 2005;95(7):939-42.

79. Bosniak MA. The current radiological approach to renal cysts. *Radiology*. 1986;158(1):1-10.

80. Israel GM, Bosniak MA. How I do it: evaluating renal masses. *Radiology*. 2005;236(2):441-50.

81. Sheth S, Scatarige JC, Horton KM, Corl FM, Fishman EK. Current concepts in the diagnosis and management of renal cell carcinoma: role of multidetector ct and three-dimensional CT. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*. 2001;21 Spec No:S237-54.

82. Ferda J, Hora M, Hes O, Ferdova E, Kreuzberg B. Assessment of the kidney tumor vascular supply by two-phase MDCT-angiography. *European journal of radiology*. 2007;62(2):295-301.

83. Semelka RC, Shoenut JP, Magro CM, Kroeker MA, MacMahon R, Greenberg HM. Renal cancer staging: comparison of contrast-enhanced CT and gadolinium-enhanced fat-suppressed spin-echo and gradient-echo MR imaging. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 1993;3(4):597-602.

84. Lim DJ, Carter MF. Computerized tomography in the preoperative staging for pulmonary metastases in patients with renal cell carcinoma. *The Journal of urology*. 1993;150(4):1112-4.
85. Choudhary S, Rajesh A, Mayer NJ, Mulcahy KA, Haroon A. Renal oncocytoma: CT features cannot reliably distinguish oncocytoma from other renal neoplasms. *Clinical radiology*. 2009;64(5):517-22.
86. Marconi L, Dabestani S, Lam TB, Hofmann F, Stewart F, Norrie J, et al. Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Accuracy of Percutaneous Renal Tumour Biopsy. *European urology*. 2015.
87. Li G, Cuilleron M, Zhao A, Obadia F, Mouracade P, Tostain J, et al. Combination of core biopsy and fine-needle aspiration increases diagnostic rate for small solid renal tumors. *Anticancer research*. 2012;32(8):3463-6.
88. Maturen KE, Nghiem HV, Caoili EM, Higgins EG, Wolf JS, Jr., Wood DP, Jr. Renal mass core biopsy: accuracy and impact on clinical management. *AJR American journal of roentgenology*. 2007;188(2):563-70.
89. Clark JI, Atkins MB, Urba WJ, Creech S, Figlin RA, Dutcher JP, et al. Adjuvant high-dose bolus interleukin-2 for patients with high-risk renal cell carcinoma: a cytokine working group randomized trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(16):3133-40.
90. Maxwell NJ, Saleem Amer N, Rogers E, Kiely D, Sweeney P, Brady AP. Renal artery embolisation in the palliative treatment of renal carcinoma. *The British journal of radiology*. 2007;80(950):96-102.
91. Hallscheidt P, Besharati S, Noeldge G, Haferkamp A, Lopez R, Kauffmann GW. [Preoperative and palliative embolization of renal cell carcinomas: follow-up of 49 patients]. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin*. 2006;178(4):391-9.
92. Lane BR, Abouassaly R, Gao T, Weight CJ, Hernandez AV, Larson BT, et al. Active treatment of localized renal tumors may not impact overall survival in patients aged 75 years or older. *Cancer*. 2010;116(13):3119-26.
93. Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Five-year survival after surgical treatment for kidney cancer: a population-based competing risk analysis. *Cancer*. 2007;109(9):1763-8.
94. Pierorazio PM, McKiernan JM, McCann TR, Mohile S, Petrylak D, Benson MC. Outcome after cytoreductive nephrectomy for metastatic renal cell carcinoma is predicted by fractional percentage of tumour volume removed. *BJU international*. 2007;100(4):755-9.
95. Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R, Tangen C, Van Poppel H, Crawford ED. Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. *The Journal of urology*. 2004;171(3):1071-6.
96. Kwak C, Park YH, Jeong CW, Lee SE, Ku JH. Metastasectomy without systemic therapy in metastatic renal cell carcinoma: comparison with conservative treatment. *Urologia internationalis*. 2007;79(2):145-51.
97. Eggener SE, Yossepowitch O, Kundu S, Motzer RJ, Russo P. Risk score and metastasectomy independently impact prognosis of patients with recurrent renal cell carcinoma. *The Journal of urology*. 2008;180(3):873-8; discussion 8.
98. Lee SE, Kwak C, Byun SS, Gill MC, Chang IH, Kim YJ, et al. Metastatectomy prior to immunochemotherapy for metastatic renal cell carcinoma. *Urologia internationalis*. 2006;76(3):256-63.
99. Alt AL, Boorjian SA, Lohse CM, Costello BA, Leibovich BC, Blute ML. Survival after complete surgical resection of multiple metastases from renal cell carcinoma. *Cancer*. 2011;117(13):2873-82.

100. Kierney PC, van Heerden JA, Segura JW, Weaver AL. Surgeon's role in the management of solitary renal cell carcinoma metastases occurring subsequent to initial curative nephrectomy: an institutional review. *Annals of surgical oncology*. 1994;1(4):345-52.
101. Fourquier P, Regnard JF, Rea S, Levi JF, Levasseur P. Lung metastases of renal cell carcinoma: results of surgical resection. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 1997;11(1):17-21.
102. Andrews DW, Scott CB, Sperduto PW, Flanders AE, Gaspar LE, Schell MC, et al. Whole brain radiation therapy with or without stereotactic radiosurgery boost for patients with one to three brain metastases: phase III results of the RTOG 9508 randomised trial. *Lancet (London, England)*. 2004;363(9422):1665-72.
103. Brinkmann OA, Bruns F, Gosheger G, Micke O, Hertle L. Treatment of bone metastases and local recurrence from renal cell carcinoma with immunochemotherapy and radiation. *World journal of urology*. 2005;23(3):185-90.
104. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer research*. 2004;64(19):7099-109.
105. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2007;356(2):125-34.
106. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2007;356(2):115-24.
107. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(6):1061-8.
108. Rini BI, Escudier B, Tomczak P, Kaprin A, Szczylik C, Hutson TE, et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet (London, England)*. 2011;378(9807):1931-9.
109. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet (London, England)*. 2007;370(9605):2103-11.
110. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2007;356(22):2271-81.
111. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet (London, England)*. 2008;372(9637):449-56.
112. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(1):38-47.
113. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(36):22642-7.
114. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer research*. 2000;60(6):1541-5.

115. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer research*. 1999;59(16):3915-8.
116. 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.
117. 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. *Nature cell biology*. 2000;2(7):423-7.
118. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(5):343-54.
119. Pantuck AJ, Zeng G, Belldegrun AS, Figlin RA. Pathobiology, prognosis, and targeted therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia-induced pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(13):4641-52.
120. Esteban MA, Tran MG, Harten SK, Hill P, Castellanos MC, Chandra A, et al. Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer research*. 2006;66(7):3567-75.
121. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer cell*. 2003;3(4):347-61.
122. Bernardi R, Guernah I, Jin D, Grisendi S, Alimonti A, Teruya-Feldstein J, et al. PML inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature*. 2006;442(7104):779-85.
123. Toschi A, Lee E, Gadir N, Ohh M, Foster DA. Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α on mTORC1 and mTORC2. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(50):34495-9.
124. Sridhar SS, Hedley D, Siu LL. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Molecular cancer therapeutics*. 2005;4(4):677-85.
125. Lieberthal W, Levine JS. Mammalian target of rapamycin and the kidney. I. The signaling pathway. *American journal of physiology Renal physiology*. 2012;303(1):F1-10.
126. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124(3):471-84.
127. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics*. 1975;28(10):721-6.
128. Martel RR, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1977;55(1):48-51.
129. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. 1994;369(6483):756-8.
130. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 1994;78(1):35-43.
131. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*. 2004;18(16):1926-45.
132. Keith CT, Schreiber SL. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science (New York, NY)*. 1995;270(5233):50-1.
133. Andrade MA, Bork P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature genetics*. 1995;11(2):115-6.

134. Takahashi T, Hara K, Inoue H, Kawa Y, Tokunaga C, Hidayat S, et al. Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2000;5(9):765-75.
135. Dames SA, Mulet JM, Rathgeb-Szabo K, Hall MN, Grzesiek S. The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(21):20558-64.
136. Sekulic A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, et al. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer research*. 2000;60(13):3504-13.
137. 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.
138. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, et al. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell*. 2003;11(4):895-904.
139. Huang B, Porter G. Expression of proline-rich Akt-substrate PRAS40 in cell survival pathway and carcinogenesis. *Acta pharmacologica Sinica*. 2005;26(10):1253-8.
140. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 2009;137(5):873-86.
141. Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K, et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(18):15461-4.
142. Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature cell biology*. 2007;9(3):316-23.
143. 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. *Molecular cell*. 2007;25(6):903-15.
144. 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. *Developmental cell*. 2006;11(6):859-71.
145. 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. *Current biology : CB*. 2004;14(14):1296-302.
146. Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochemical Society transactions*. 2009;37(Pt 1):217-22.
147. Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawlowski R, Wullschleger S, Deak M, et al. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *The Biochemical journal*. 2007;405(3):513-22.
148. Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL. Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes & development*. 2006;20(20):2820-32.
149. Stocker H, Radimerski T, Schindelholz B, Wittwer F, Belawat P, Daram P, et al. Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nature cell biology*. 2003;5(6):559-65.

150. Sato T, Nakashima A, Guo L, Tamanoi F. Specific activation of mTORC1 by Rheb G-protein in vitro involves enhanced recruitment of its substrate protein. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(19):12783-91.
151. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development*. 2003;17(15):1829-34.
152. Orlova KA, Crino PB. The tuberous sclerosis complex. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1184:87-105.
153. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Current biology : CB*. 2003;13(15):1259-68.
154. Azim H, Azim HA, Jr., Escudier B. Targeting mTOR in cancer: renal cell is just a beginning. *Targeted oncology*. 2010;5(4):269-80.
155. Auger KR, Serunian LA, Soltoff SP, Libby P, Cantley LC. PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell*. 1989;57(1):167-75.
156. Ruderman NB, Kapeller R, White MF, Cantley LC. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(4):1411-5.
157. Mariappan MM, Feliars D, Mummidi S, Choudhury GG, Kasinath BS. High glucose, high insulin, and their combination rapidly induce laminin-beta1 synthesis by regulation of mRNA translation in renal epithelial cells. *Diabetes*. 2007;56(2):476-85.
158. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology*. 2002;4(9):648-57.
159. Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(14):2954-63.
160. Dan HC, Sun M, Yang L, Feldman RI, Sui XM, Ou CC, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(38):35364-70.
161. Cai SL, Tee AR, Short JD, Bergeron JM, Kim J, Shen J, et al. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *The Journal of cell biology*. 2006;173(2):279-89.
162. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual review of pathology*. 2009;4:127-50.
163. Smith EM, Finn SG, Tee AR, Browne GJ, Proud CG. The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(19):18717-27.
164. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology*. 2008;10(8):935-45.
165. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*. 2010;141(2):290-303.
166. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science (New York, NY)*. 2008;320(5882):1496-501.
167. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science (New York, NY)*. 2011;334(6056):678-83.
168. Bar-Peled L, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends in cell biology*. 2014;24(7):400-6.

169. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, et al. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current biology : CB*. 2003;13(22):2004-8.
170. Oakhill JS, Steel R, Chen ZP, Scott JW, Ling N, Tam S, et al. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science (New York, NY)*. 2011;332(6036):1433-5.
171. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003;115(5):577-90.
172. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*. 2008;30(2):214-26.
173. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science (New York, NY)*. 2011;331(6016):456-61.
174. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & development*. 2004;18(23):2893-904.
175. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(23):8204-9.
176. Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, et al. Regulation of PTEN transcription by p53. *Molecular cell*. 2001;8(2):317-25.
177. Copp J, Manning G, Hunter T. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer research*. 2009;69(5):1821-7.
178. Hara K, Yonezawa K, Kozlowski MT, Sugimoto T, Andrabi K, Weng QP, et al. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(42):26457-63.
179. Haghighat A, Mader S, Pause A, Sonenberg N. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *The EMBO journal*. 1995;14(22):5701-9.
180. 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. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(36):21176-80.
181. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(20):7004-14.
182. Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(1):200-16.
183. Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, et al. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science (New York, NY)*. 2010;328(5982):1172-6.
184. Dufner A, Thomas G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Experimental cell research*. 1999;253(1):100-9.
185. Taha C, Liu Z, Jin J, Al-Hasani H, Sonenberg N, Klip A. Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(46):33085-91.
186. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer research*. 2006;66(3):1500-8.

187. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*. 2009;43:67-93.
188. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell*. 2009;20(7):1992-2003.
189. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, NY)*. 2005;307(5712):1098-101.
190. Garcia-Martinez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *The Biochemical journal*. 2008;416(3):375-85.
191. Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene*. 2008;27(16):2276-88.
192. Birkenkamp KU, Coffey PJ. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochemical Society transactions*. 2003;31(Pt 1):292-7.
193. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews Genetics*. 2006;7(8):606-19.
194. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology*. 2004;6(11):1122-8.
195. Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science (New York, NY)*. 1996;273(5272):239-42.
196. Oshiro N, Yoshino K, Hidayat S, Tokunaga C, Hara K, Eguchi S, et al. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2004;9(4):359-66.
197. Schalm SS, Fingar DC, Sabatini DM, Blenis J. TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Current biology : CB*. 2003;13(10):797-806.
198. Loewith R, Jacinto E, Wullschlegel S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell*. 2002;10(3):457-68.
199. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell*. 2006;22(2):159-68.
200. Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Current opinion in oncology*. 2006;18(1):77-82.
201. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science (New York, NY)*. 2004;304(5670):554.
202. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(2):140-56.
203. 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.
204. Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Chaudhuri S, Stern HM, Wang W, et al. Somatic mutations in p85alpha promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. *Cancer cell*. 2009;16(6):463-74.
205. Guo H, German P, Bai S, Barnes S, Guo W, Qi X, et al. The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*. 2015;42(7):343-53.
206. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(5):283-96.

207. Hers I, Vincent EE, Tavare JM. Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling*. 2011;23(10):1515-27.
208. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 2007;448(7152):439-44.
209. Lu ZH, Shvartsman MB, Lee AY, Shao JM, Murray MM, Kladney RD, et al. Mammalian target of rapamycin activator RHEB is frequently overexpressed in human carcinomas and is critical and sufficient for skin epithelial carcinogenesis. *Cancer research*. 2010;70(8):3287-98.
210. Ghosh AP, Marshall CB, Coric T, Shim EH, Kirkman R, Ballestas ME, et al. Point mutations of the mTOR-RHEB pathway in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(20):17895-910.
211. Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(5):335-48.
212. Sato T, Nakashima A, Guo L, Coffman K, Tamanoi F. Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. *Oncogene*. 2010;29(18):2746-52.
213. Grabiner BC, Nardi V, Birsoy K, Possemato R, Shen K, Sinha S, et al. A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer discovery*. 2014;4(5):554-63.
214. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. 2013;499(7456):43-9.
215. Li J, Lu Y, Akbani R, Ju Z, Roebuck PL, Liu W, et al. TCPA: a resource for cancer functional proteomics data. *Nature methods*. 2013;10(11):1046-7.
216. Akbani R, Ng PK, Werner HM, Shahmoradgoli M, Zhang F, Ju Z, et al. A pan-cancer proteomic perspective on The Cancer Genome Atlas. *Nature communications*. 2014;5:3887.
217. Twardowski PW, Mack PC, Lara PN, Jr. Papillary renal cell carcinoma: current progress and future directions. *Clinical genitourinary cancer*. 2014;12(2):74-9.
218. Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL, et al. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer cell*. 2005;8(2):143-53.
219. Davis CF, Ricketts CJ, Wang M, Yang L, Cherniack AD, Shen H, et al. The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer cell*. 2014;26(3):319-30.
220. Choe G, Horvath S, Cloughesy TF, Crosby K, Seligson D, Palotie A, et al. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer research*. 2003;63(11):2742-6.
221. Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(27):25485-90.
222. Altomare DA, Wang HQ, Skele KL, De Rienzo A, Klein-Szanto AJ, Godwin AK, et al. AKT and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer and can be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth. *Oncogene*. 2004;23(34):5853-7.
223. Kruck S, Bedke J, Hennenlotter J, Ohneseit PA, Kuehs U, Senger E, et al. Activation of mTOR in renal cell carcinoma is due to increased phosphorylation rather than protein overexpression. *Oncology reports*. 2010;23(1):159-63.
224. Schultz L, Chau A, Albadine R, Hicks J, Kim JJ, De Marzo AM, et al. Immunoexpression status and prognostic value of mTOR and hypoxia-induced pathway members in primary and metastatic clear cell renal cell carcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2011;35(10):1549-56.

225. 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. *Annals of clinical and laboratory science*. 2006;36(3):283-93.
226. Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte 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.
227. Darwish OM, Kapur P, Youssef RF, Bagrodia A, Belsante M, Alhalabi F, et al. Cumulative number of altered biomarkers in mammalian target of rapamycin pathway is an independent predictor of outcome in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Urology*. 2013;81(3):581-6.
228. Nishikawa M, Miyake H, Harada K, Fujisawa M. Expression of molecular markers associated with the mammalian target of rapamycin pathway in nonmetastatic renal cell carcinoma: Effect on prognostic outcomes following radical nephrectomy. *Urologic oncology*. 2014;32(1):49 e15-21.
229. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature medicine*. 1998;4(7):844-7.
230. Merseburger AS, Hennenlotter J, Schilling D, Sievert KD, Kufer R, Kuczyk MA. [Application of tissue microarrays for the diagnosis, prognosis and therapeutic decision making in renal cell carcinoma]. *Der Urologe Ausg A*. 2006;45(3):323-4, 6-7.
231. 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.
232. Hager M, Haufe H, Lusuardi L, Schmeller N, Kolbitsch C. p-AKT overexpression in primary renal cell carcinomas and their metastases. *Clinical & experimental metastasis*. 2010;27(8):611-7.
233. 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 investigation*. 2011;29(7):427-38.
234. Morgensztern D, McLeod HL. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anti-cancer drugs*. 2005;16(8):797-803.
235. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular signalling*. 2002;14(5):381-95.
236. Hager M, Haufe H, Alinger B, Kolbitsch C. pS6 Expression in normal renal parenchyma, primary renal cell carcinomas and their metastases. *Pathology oncology research : POR*. 2012;18(2):277-83.
237. Habib SL, Liang S. Hyperactivation of Akt/mTOR and deficiency in tuberin increased the oxidative DNA damage in kidney cancer patients with diabetes. *Oncotarget*. 2014;5(9):2542-50.
238. Haddad AQ, Kapur P, Singla N, Raman JD, Then MT, Nuhn P, et al. Validation of mammalian target of rapamycin biomarker panel in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2015;121(1):43-50.
239. Cho D, Signoretti S, Dabora S, Regan M, Seeley A, Mariotti M, et al. Potential histologic and molecular predictors of response to temsirolimus in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clinical genitourinary cancer*. 2007;5(6):379-85.
240. Armengol G, Rojo F, Castellvi J, Iglesias C, Cuatrecasas M, Pons B, et al. 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer research*. 2007;67(16):7551-5.
241. 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. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2019;145(1):153-63.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	eukaryotic initiation factor binding protein-1
5-FU	5-Fluorouracil
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat Kinase
AP	Alkalische Phosphatase
ARCD	Acquired renal cystic disease, erworbene zystische Nierenerkrankungen
ASA	American Society of Anesthesiologists
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	BCL2 associated agonist of cell death
BHD-Syndrom	Birt-Hogg-Dubé-Syndrom
BMI	Body-Mass-Index
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
ccRCC	Clear cell renal carcinoma, Klarzelliges Nierenzellkarzinom
chRCC	Chromophobe renal cell carcinoma
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
CSS	Cancer-specific survival, Krebsspezifisches Überleben
CT	Computertomograph

DEP	Dishevelled, EGL-10, pleckstrin
DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
d.h.	das heißt
DNA	deoxyribonucleic acid
EAU	European Association of Urology
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ED	Erstdiagnose
EGF	Epidermal-growth-factor
eIF-4E	eukaryotic initiation factor 4E
FAT	FRAP, ATM, TRRAP
FGF	Fibroblast Growth Factor
FH	Fumarat Hydratase
FKB-12	FK binding Protein 12
FLT-3	FMS-like Tyrosin-Kinase-3
FOXO	forkhead box O
FRB	FKB12-rapamycin-binding
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GLUT1	Glukosetransporter 1
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosintriphosphat
Hb	Hämoglin
HEAT	Huntingtin, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR
HIF	Hypoxie induzierter Faktor

HLRCC-Syndrom	Hereditäres Leiomyomatose und Nierenzellkarzinom-Syndrom
IMDC	International-Database-Consortium
IGF	Insulin-like-growth-factor
HST	Harnstoff
IHC	Immunhistochemie
IL-2	Interleukin-2
INF	Interferon
IRS1	Insulin Rezeptor Substrat 1
ISUP	International Society of Urological Pathology
LAT1	Human L-type amino acid transporter 1
LDH	Laktatdehydrogenase
LKB1	liver kinase B1
LVI	Lymphgefäßinvasion
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
mmol/L	Millimol pro Liter
mRCC	Metastasised renal cell carcinoma
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
mSin1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
mTOR	mammalian/mechanistic Target of Rapamycin
mTORC	mTOR-Complex

MW	Mittelwert
OS	Overall-survival
P53	tumor protein p53
p-mTOR	Phosphoryliertes m-TOR
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha, auch p110 α
PIP ₂	Phosphatidylinositol Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol Triphosphat
PKC α	protein kinase C alpha
PRAS40	proline-rich Akt substrate of 40 kDA
pRCC	Papillary renal cell carcinoma, Papilläres Nierenzellkarzinom
Protor	protein observed with Rictor
PS	Performance Status
PTEN	phosphatase and tensin homolog
Raptor	regulatory-associated protein of mTOR
RCC	Renal cell carcinoma, Nierenzellkarzinom
REDD1	regulated in development and DNA damage responses 1
RFS	Rezidivfreies Überleben
Rheb	Ras homologue enriched in brain
Rictor	rapamycin-independent companion of mTOR

S6K1	S6 kinase 1
SD	Standardabweichung
SGK1	serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1
SSIGN	Stage Size Grade Necrosis
TBST	Tris-buffered saline with Tween20, TBS-T-Puffer
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMA	Tissue Microarray
TSC 1	tuberous sclerosis complex 1 bzw. Tuberin
TSC 2	tuberous sclerosis complex 2 bzw. Hamartin
UICC	Union internationale contre le cancer
UISS	University of California Los Angeles integrated staging system
ULK1/2	unc-51 like autophagy activating kinase 1/2
US	Ultraschall
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
vHL-Syndrom	Von Hippel-Lindau-Syndrom
WHO	World health organisation
zw.	zwischen

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM Klassifikation: Primärtumor, modifiziert nach Brierley et al. (54).....	11
Tabelle 2: TNM Klassifikation: regionäre Lymphknoten, modifiziert nach Brierley et al. (54)....	12
Tabelle 3: TNM Klassifikation: Fernmetastasen, modifiziert nach Brierley et al. (54)	12
Tabelle 4: TNM Klassifikation: Stadiengruppen, modifiziert nach Brierley et al. (54).....	12
Tabelle 5: TNM Klassifikation: Grading, modifiziert nach Brierley et al. (54).....	12
Tabelle 6: Prognosemodelle RCC, Übersicht nach EAU-Guideline RCC 2015(17)	16
Tabelle 7: Expressionsanalyse benignes Nierengewebe	47
Tabelle 8: Expressionsanalyse Primärtumoren	47
Tabelle 9: Expressionsanalyse Metastasen	48
Tabelle 10: Mann-Whitney Test, (*) adjustiertes Signifikanzniveau ($p < 0,0167$)	50
Tabelle 11: Kruskal-Wallis Analyse „Metastasenlokalisationen“	54
Tabelle 12: Kaplan-Meier, Fallzahlen OS/CSS ab Erstmetastasierung für mTOR.....	57
Tabelle 13: Kaplan-Meier, OS/CSS ab Erstmetastasierung für mTOR.....	57
Tabelle 14: Kaplan-Meier, Fallzahlen OS/CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR.....	59
Tabelle 15: Kaplan-Meier, OS/CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR.....	59
Tabelle 16: Kaplan-Meier, Fallzahlen OS/CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio	61
Tabelle 17: Kaplan-Meier, OS/CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio	61
Tabelle 18: Kaplan-Meier, Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“, OS/CSS ab Erstmetastasierung für mTOR.....	63
Tabelle 19: Kaplan-Meier, Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“, OS/CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR	64
Tabelle 20: Kaplan-Meier, Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“, OS/CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio	65
Tabelle 21: Auswertung nach Kruck et al. (223).....	72
Tabelle 22: Auswertungsergebnisse für p-mTOR nach Lin et al. (225)	75
Tabelle 23: Auswertung p-mTOR nach Hager et al. (233).....	76
Tabelle 24: Korrelationen nach Darwish et al. (227).....	81
Tabelle 25: Charakterisierung des Patientenkollektivs	121
Tabelle 26: Expressionsanalyse Metastasenkollektiv	125
Tabelle 27: Übersicht Expressionen Subkollektiv mTOR-Inhibitor-Therapie	126
Tabelle 28: Aufschlüsselung Expressionen Subkollektiv mTOR-Inhibitor-Therapie.....	128
Tabelle 29: Chi-Square Test für die mTOR-Expression.....	130
Tabelle 30: Chi-Square Test für die p-mTOR-Expression	132
Tabelle 31: Chi-Square Test für die Ratio.....	134
Tabelle 32: Cox-Regression Gesamtüberleben (OS) ab Erstdiagnose (ED) eines RCC	137
Tabelle 33: Cox-Regression Krebspezifisches Überleben (CSS) ab Erstdiagnose (ED) eines RCC	140
Tabelle 34: Cox-Regression Gesamtüberleben (OS) ab Erstmetastasierung	142
Tabelle 35: Cox-Regression Krebspezifisches Überleben (CSS) ab Erstmetastasierung	144

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schemazeichnung mTORC1, mTORC2	27
Abbildung 2: Flussdiagramm mTOR-Pathway	32
Abbildung 3: Schemazeichnung IHC Färbemethode	39
Abbildung 4: Färbebeispiele benignes Nierengewebe und primäres RCC.....	42
Abbildung 5: Färbebeispiel Fall 004 – Übersicht mTOR	43
Abbildung 6: Färbebeispiel Fall 004 – Übersicht p-mTOR.....	44
Abbildung 7: Boxplot mTOR und p-mTOR IHC-Score nach Ursprungsgewebe	48
Abbildung 8: Boxplot Ratio nach Ursprungsgewebe.....	49
Abbildung 9: Boxplot mTOR nach Metastasenlokalisierung	53
Abbildung 10: Boxplot p-mTOR nach Metastasenlokalisierung.....	53
Abbildung 11: Boxplot Ratio nach Metastasenlokalisierung	54
Abbildung 12: Kaplan-Meier, OS ab Erstmetastasierung für mTOR	58
Abbildung 13: Kaplan-Meier, CSS ab Erstmetastasierung für mTOR	58
Abbildung 14: Kaplan-Meier, OS ab Erstmetastasierung für p-mTOR	60
Abbildung 15: Kaplan-Meier, CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR.....	60
Abbildung 16: OS ab Erstmetastasierung für die Ratio	62
Abbildung 17: CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio.....	62
Abbildung 18: Kaplan-Meier, Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“, OS/CSS ab Erstmetastasierung für mTOR	64
Abbildung 19: Kaplan-Meier, Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“, OS/CSS ab Erstmetastasierung für p-mTOR.....	65
Abbildung 20: Kaplan-Meier, Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“, OS/CSS ab Erstmetastasierung für die Ratio.....	66

7.4 Patientenkollektiv

Parameter	Kategorien	Anzahl [max. 91] (gesamt %) / (gültige %)
Allgemeines		
Geschlecht	Männlich (%)	69 (75,8) / (75,8)
	Weiblich (%)	22 (24,2) / (24,2)
	Fehlend (%)	0 (0)
Erkrankungsalter RCC [in Jahren]	Median (IQR)	61,00 (15,12)
	Mittelwert (± SD)	60,60 (± 9,61)
	Fehlend (%)	4 (4,4)
Alter bei Erstdiagnose > 70 Jahre	Ja (%)	17 (18,7) / (19,5)
	Nein (%)	70 (76,9) / (80,5)
	Fehlend (%)	4 (4,4)
Alter bei Metastasierung [in Jahren]	Median (IQR)	65,11 (13,30)
	Mittelwert (± SD)	64,23 (± 9,37)
	Fehlend (%)	5 (5,5)
Metastasierungszeitpunkt	Synchron (%)	27 (29,7) / (31,4)
	Metachron (%)	59 (64,8) / (68,6)
	Fehlend (%)	5 (5,5)
Zeit bis Rezidiv bei metachroner Metastasierung in Monaten	Median (IQR)	44,71 (70,51)
	Mittelwert (± SD)	65,82 (±66,88)
Disease free intervall < 12 Monate	Ja (%)	40 (44) / (45,5)
	Nein (%)	48 (52,7) / (54,5)
	Fehlend (%)	3 (3,3)
Todesfälle	Lebend (%)	56 (61,5) / (65,1)
	Verstorben (%)	30 (33) / (34,9)
	Fehlend (%)	5 (5,5)
RCC-abhängiger Todesfall	Ja (%)	28 (93,33) / (96,55)
	Nein (%)	1 (3,33) / (3,45)
	Unklar (%)	1 (3,33)
Follow-up Zeitraum in Monaten	Median (IQR)	68,58 (79,24)
	Mittelwert (± SD)	84,46 (± 71,49)
	Fehlend (%)	5 (5,5)
Auftreten von Zweittumoren	Ja (%)	11 (12,1) / (12,8)
	Nein (%)	75 (82,4) / (87,2)
	Fehlend (%)	5 (5,5)

Primärtumor		
Histologie des Primärtumors	ccRCC (%)	83 (91,2) / (94,3)
	ppRCC (%)	3 (3,3) / (3,4)
	chrRCC (%)	2 (2,2) / (2,3)
	Fehlend (%)	3 (3,3)
Größe des Primärtumors in cm	Median (IQR)	6,50 (4,30)
	Mittelwert (± SD)	7,39 (3,55)
	Fehlend (%)	29 (31,9)
Sitz des Primärtumors	Rechts (%)	45 (49,5) / (54,2)
	Links (%)	38 (41,8) / (45,8)
	Fehlend (%)	8 (8,8)
T-Stadium des Primärtumors > 2	Ja (%)	44 (48,4) / (55,7)
	Nein (%)	35 (38,5) / (44,3)
	Fehlend (%)	12 (13,2)
Fuhrman-Grading des Primärtumors > 2	Ja (%)	25 (27,5) / (32,5)
	Nein (%)	52 (57,1) / (67,5)
	Fehlend (%)	14 (15,4)
Nekrosen innerhalb des Primärtumors	Ja (%)	22 (24,2) / (44,9)
	Nein (%)	27 (29,7) / (55,1)
	Fehlend (%)	42 (46,2)
Sarkomatoide Komponenten innerhalb des Primärtumors	Ja (%)	7 (7,7) / (14,0)
	Nein (%)	43 (47,3) / (86,0)
	Fehlend (%)	41 (45,1)
Kapselinfiltration des Primärtumors	Ja (%)	23 (25,3) / (44,2)
	Nein (%)	29 (31,9) / (55,8)
	Fehlend (%)	39 (42,9)
Hilusveneninfiltration durch Primärtumor	Ja (%)	16 (17,6) / 33,3)
	Nein (%)	32 (35,2) / (66,7)
	Fehlend (%)	43 (47,3)
Metastasen		
Initial multipel metastasiert	Ja (%)	36 (39,6) / (42,9)
	Nein (%)	48 (52,7) / (57,1)
	Fehlend (%)	7 (7,7)
Anzahl durch Metastasierung betroffener Organsysteme > 1	Ja (%)	71 (78,0) / (78,0)
	Nein (%)	20 (22,0) / (22,0)
	Fehlend (%)	0 (0,0)

Insgesamt nur Lungenmetastase(n)	Ja (%)	6 (6,6) / (7,1)
	Nein (%)	78 (85,7) / (92,9)
	Fehlend (%)	7 (7,7)
Insgesamt nur Lymphknotenmetastase(n)	Ja (%)	2 (2,2) / (2,4)
	Nein (%)	82 (90,1) / (97,6)
	Fehlend (%)	7 (7,7)
Insgesamt Lebermetastase(n)	Ja (%)	13 (14,3) / (15,5)
	Nein (%)	71 (78,0) / (84,5)
	Fehlend (%)	7 (7,7)
Insgesamt Knochenmetastase(n)	Ja (%)	37 (40,7) / (42,0)
	Nein (%)	51 (56,0) / (58,0)
	Fehlend (%)	3 (3,3)
Prognosegruppe insgesamt „gut“ (=nur Lungen- /Lymphknotenmetastasen)	Ja (%)	13 (14,3) / (14,3)
	Nein (%)	78 (85,7) / (85,7)
	Fehlend (%)	0 (0,0)
Prognosegruppe insgesamt „schlecht“ (=u.a. Leber-/Knochen- metastasen)	Ja (%)	44 (48,4) / (48,4)
	Nein (%)	47 (51,6) / (51,6)
	Fehlend (%)	0 (0,0)
Patienteneigenschaften zum Zeitpunkt der Erstdiagnose		
Diabetes mellitus Typ II	Ja (%)	16 (17,6) / (18,8)
	Nein (%)	69 (75,8) / (81,2)
	Fehlend (%)	6 (6,6)
Hyperlipidämie [>150mg/dl]	Ja (%)	13 (14,3) / (16,0)
	Nein (%)	68 (74,7) / (84,0)
	Fehlend (%)	10 (11)
Gesamt-Serum-Calcium erhöht [>2,6 mmol/l]	Ja (%)	4 (4,4) / (4,8)
	Nein (%)	79 (86,8) / (95,2)
	Fehlend (%)	8 (8,8)
Anämie [männlich: <13g/dl; weiblich <12/dl]	Ja (%)	34 (37,4) / (40,5)
	Nein (%)	50 (54,9) / (59,5)
	Fehlend (%)	7 (7,7)
Leukozytose [>10.500 /µl]	Ja (%)	8 (8,8) / (9,5)
	Nein (%)	76 (83,5) / (90,5)
	Fehlend (%)	7 (7,7)
Thrombozytose [> 345.000 /µl]	Ja (%)	20 (22,0) / (24,1)
	Nein (%)	63 (69,2) / (75,9)
	Fehlend (%)	8 (8,8)

Kreatinin erhöht [männlich: > 1,1, weiblich > 0,9 mg/dl]	Ja (%) Nein (%) Fehlend (%)	41 (45,1) / (49,4) 42 (46,2) / (50,6) 8 (8,8)
Harnstoff erhöht [> 50mg/dl]	Ja (%) Nein (%) Fehlend (%)	15 (16,5) / (19,0) 64 (70,3) / (81,0) 12 (13,2)
CRP erhöht [> 0,5 mg/dl]	Ja (%) Nein (%) Fehlend (%)	52 (57,1) / (65,8) 27 (29,7) / 34,2) 12 (13,2)
GPT erhöht [männlich > 50 bzw. weiblich > 35 U/l]	Ja (%) Nein (%) Fehlend (%)	4 (4,4) / (5,8) 65 (71,4) / (94,2) 20 (22)
GOT erhöht [männlich > 50 bzw. weiblich > 35 U/l]	Ja (%) Nein (%) Fehlend (%)	6 (6,6) / 8,5) 65 (71,4) / (91,5) 20 (22)
gGT erhöht [männlich > 60 bzw. weiblich > 40 U/l]	Ja (%) Nein (%) Fehlend (%)	19 (20,9) / (27,1) 51 (56) / (72,9) 21 (23,1)
AP erhöht [männlich > 130 bzw. weiblich > 105 U/l]	Ja (%) Nein (%) Fehlend (%)	10 (11) / (15,2) 56 (61,5) / (84,8) 25 (27,5)
LDH erhöht [>250U/l]	Ja (%) Nein (%) Fehlend (%)	10 (11) / (11) 81 (89) / (89) 0 (0)
BMI > 25	Ja (%) Nein (%) Fehlend (%)	55 (60,4) / (66,3) 28 (30,8) / (33,7) 8 (8,8)
BMI > 30	Ja (%) Nein (%) Fehlend (%)	15 (16,5) / (18,1) 68 (74,7) / (81,9) 8 (8,8)
Genereller Nikotinkonsum	Ja (%) Nein (%) Fehlend (%)	19 (20,9) / (23,8) 61 (67,0) / (76,3) 11 (12,1)
Genereller Alkoholkonsum	Ja (%) Nein (%) Fehlend (%)	24 (26,4) / (30,4) 55 (60,4) / (69,6) 12 (13,2)

Karnofsky-PS < 80	Ja (%)	14 (15,4) / (19,2)
	Nein (%)	59 (64,8) / (80,8)
	Fehlend (%)	18 (19,8)
ASA > 2	Ja (%)	21 (23,1) / (27,6)
	Nein (%)	55 (60,4) / (72,4)
	Fehlend (%)	15 (16,5)
MSKCC ≥ intermediate group	Ja (%)	53 (58,2) / (61,6)
	Nein (%)	33 (36,3) / (38,4)
	Fehlend (%)	5 (5,5)
MSKCC = poor group	Ja (%)	10 (11,0) / (11,6)
	Nein (%)	76 (83,5) / (88,4)
	Fehlend (%)	5 (5,5)
Therapie		
Einsatz von mTOR-Inhibitoren	Ja (%)	24 (26,4) / (30,4)
	Nein (%)	55 (60,4) / (69,6)
	Fehlend (%)	12 (13,2)
IHC Auswertung		
Anzahl beprobter, von Metastasen betroffener, Organsysteme pro Patient	Median (IQR)	1,00 (1,00)
	Mittelwert (± SD)	1,48 (± 0,66)
	Fehlend (%)	0 (0)
Anzahl der ausgewerteten Metastasenproben pro Patient	Median (IQR)	1,00 (1,00)
	Mittelwert (± SD)	1,85 (± 1,07)
	Fehlend (%)	0 (0)
mTOR Expression pro Patient	Median (IQR)	139,00 (107,25)
	Mittelwert (± SD)	146,48 (± 71,86)
	Fehlend (%)	5 (5,5)
p-mTOR Expression pro Patient	Median (IQR)	111,50 (105,00)
	Mittelwert (± SD)	117,30 (± 69,94)
	Fehlend (%)	3 (3,3)
Verhältnis von p-mTOR zu mTOR Expression pro Patient	Median (IQR)	0,8297 (0,4676)
	Mittelwert (± SD)	0,9560 (± 1,1160)
	Fehlend (%)	5 (5,5)

Tabelle 25: Charakterisierung des Patientenkollektivs

7.5 Expressionsanalyse Metastasenkollektiv

Lokalisation	Parameter	Probenanzahl			Ergebnisse		Shapiro-Wilk Test für Normalverteilung
		Gesamt (% von 168)	Gültig	Fehlend	Median (IQR)	MW (±SD)	Signifikanzwert
Lunge (1)	mTOR	42 (25,00)	41	1	130,00 (111,50)	128,98 (68,58)	0,154
	p-mTOR	42 (25,00)	41	1	80,00 (80,00)	101,78 (62,47)	<0,001
	Ratio	42 (25,00)	41	1	0,8500 (0,4562)	0,9744 (0,8964)	<0,001
Weichgewebe (2)	mTOR	29 (17,26)	27	2	130,00 (100,00)	133,70 (63,54)	0,315
	p-mTOR	29 (17,26)	27	2	130,00 (110,00)	128,07 (64,82)	0,887
	Ratio	29 (17,26)	27	2	1,0000 (0,5084)	1,0096 (0,4836)	0,368
Knochen (3)	mTOR	21 (12,5)	17	4	120,00 (130,00)	131,18 (76,84)	0,271
	p-mTOR	21 (12,5)	19	2	110,00 (160,00)	106,84 (83,79)	0,213
	Ratio	21 (12,5)	17	4	0,8571 (0,8479)	0,8361 (0,6616)	0,103
Lymphknoten (4)	mTOR	20 (11,90)	19	1	150,00 (95,00)	153,42 (76,65)	0,461
	p-mTOR	20 (11,90)	19	1	113,00 (85,00)	116,37 (65,88)	0,547
	Ratio	20 (11,90)	19	1	0,8000 (0,6423)	1,2404 (1,9334)	<0,001
Nebenniere (5)	mTOR	11 (6,55)	11	0	180,00 (135,00)	180,00 (74,36)	0,482
	p-mTOR	11 (6,55)	11	0	140,00 (105,00)	136,36 (83,58)	0,345
	Ratio	11 (6,55)	11	0	0,7143 (0,5500)	0,7844 (0,4764)	0,044
Leber (6)	mTOR	8 (4,76)	7	1	130,00 (215,00)	162,14 (99,41)	0,099
	p-mTOR	8 (4,76)	7	1	45,00 (155,00)	92,86 (85,92)	0,093
	Ratio	8 (4,76)	7	1	0,6000 (0,5059)	0,5538 (0,3194)	0,691
Pankreas (7)	mTOR	6 (3,57)	5	1	50,00 (160,00)	112,00 (88,08)	0,036

	p-mTOR	6 (3,57)	5	1	30,00 (182,5)	89,00 (102,49)	0,215
	Ratio	6 (3,57)	5	1	0,6000 (0,7149)	0,6060 (0,4511)	0,743
Lokalrezidiv (8)	mTOR	6 (3,57)	6	0	172,50 (114,80)	184,67 (59,23)	0,190
	p-mTOR	6 (3,57)	6	0	135,00 (182,50)	153,33 (92,50)	0,623
	Ratio	6 (3,57)	6	0	0,9124 (0,7871)	0,8193 (0,3787)	0,274
Muskel (9)	mTOR	4 (2,38)	3	1	150,00	151,00 (68,51)	0,976
	p-mTOR	4 (2,38)	4	0	54,00 (162,00)	74,50 (87,13)	0,456
	Ratio	4 (2,38)	4	0	0,4818 (1,0313)	0,5210 (0,5554)	0,296
Dünndarm (10)	mTOR	3 (1,79)	3	0	120,00	143,33 (131,56)	0,705
	p-mTOR	3 (1,79)	3	0	25,00	101,67 (145,97)	0,098
	Ratio	3 (1,79)	3	0	0,4000	0,5186 (0,3835)	0,482
Pleura (11)	mTOR	2 (1,19)	2	0	115,00	115,00 (7,07)	-
	p-mTOR	2 (1,19)	2	0	97,50	97,50 (74,25)	-
	Ratio	2 (1,19)	2	0	0,8295	0,8295 (0,5946)	-
Haut (12)	mTOR	2 (1,19)	2	0	187,50	187,50 (159,10)	-
	p-mTOR	2 (1,19)	2	0	157,50	157,50 (180,31)	-
	Ratio	2 (1,19)	2	0	0,6750	0,6750 (0,3889)	-
Schilddrüse (13)	mTOR	2 (1,19)	2	0	170,00	170,00 (14,14)	-
	p-mTOR	2 (1,19)	1	1	120,00	120,00	-
	Ratio	2 (1,19)	1	1	0,7500	0,7500	-
Larynx (14)	mTOR	2 (1,19)	1	1	195,00	195,00	-
	p-mTOR	2 (1,19)	1	1	50,00	50,00	-
	Ratio	2 (1,19)	1	1	0,2564	0,2564	-

Grenzstrang (15)	mTOR	1 (0,60)	1	0	255,00	255,00	-
	p-mTOR	1 (0,60)	1	0	270,00	270,00	-
	Ratio	1 (0,60)	1	0	1,0588	1,0588	-
Peritoneum (16)	mTOR	1 (0,60)	1	0	140,00	140,00	-
	p-mTOR	1 (0,60)	1	0	20,00	20,00	-
	Ratio	1 (0,60)	1	0	0,1429	0,1429	-
Mesocolon (17)	mTOR	1 (0,60)	1	0	140,00	140,00	-
	p-mTOR	1 (0,60)	1	0	180,00	180,00	-
	Ratio	1 (0,60)	1	0	1,2857	1,2857	-
Omentum (18)	mTOR	1 (0,60)	1	0	110,00	110,00	-
	p-mTOR	1 (0,60)	1	0	15,00	15,00	-
	Ratio	1 (0,60)	1	0	0,1364	0,1364	-
Mediastinum (19)	mTOR	1 (0,60)	1	0	270,00	270,00	-
	p-mTOR	1 (0,60)	1	0	180,00	180,00	-
	Ratio	1 (0,60)	1	0	0,6667	0,6667	-
Milz (20)	mTOR	1 (0,60)	1	0	240,00	240,00	-
	p-mTOR	1 (0,60)	1	0	160,00	160,00	-
	Ratio	1 (0,60)	1	0	0,6667	0,6667	-
Uterus (21)	mTOR	1 (0,60)	1	0	50,00	50,00	-
	p-mTOR	1 (0,60)	1	0	95,00	95,00	-
	Ratio	1 (0,60)	1	0	1,9000	1,9000	-
Hoden (22)	mTOR	1 (0,60)	1	0	80,00	80,00	-
	p-mTOR	1 (0,60)	1	0	5,00	5,00	-

	Ratio	1 (0,60)	1	0	0,0625	0,0625	-
Unbekannt (23)	mTOR	2 (1,19)	2	0	167,50	167,50 (102,53)	-
	p-mTOR	2 (1,19)	2	0	120,00	120,00 (84,85)	-
	Ratio	2 (1,19)	2	0	0,6908	0,6908 (0,0837)	-

Tabelle 26: Expressionsanalyse Metastasenkollektiv

7.6 Subkollektiv mTOR-Inhibitor-Therapie

Expressionen Subkollektiv „mTOR-Inhibitoren“		
Parameter	Kategorien	Anzahl (gesamt %) / (gültige %)
Einsatz von mTOR-Inhibitoren	Ja (%)	24 (26,4) / (30,4)
	Nein (%)	55 (60,4) / (69,6)
	Fehlend (%)	12 (13,2)
mTOR Expression pro Patient	Median (IQR)	121,00 (113,00)
	Mittelwert (\pm SD)	131,52 (\pm 68,80)
	Fehlend (%)	1 (4,2)
p-mTOR Expression pro Patient	Median (IQR)	74,00 (70,00)
	Mittelwert (\pm SD)	90,65 (\pm 55,25)
	Fehlend (%)	1 (4,2)
Verhältnis von p-mTOR zu mTOR Expression pro Patient	Median (IQR)	0,8235 (0,6930)
	Mittelwert (\pm SD)	0,8418 (\pm 0,5774)
	Fehlend (%)	1 (4,2)
mTOR Expression > Median Gesamtkollektiv [=139,00]	Ja (%)	10 (41,7) / (43,5)
	Nein (%)	13 (54,2) / (56,5)
	Fehlend (%)	1 (4,2)
p-mTOR Expression > Median Gesamtkollektiv [=111,50]	Ja (%)	7 (29,2) / (30,4)
	Nein (%)	16 (66,7) / (69,6)
	Fehlend (%)	1 (4,2)
Ratio > Median Gesamtkollektiv [=0,8297]	Ja (%)	10 (41,7) / (43,5)
	Nein (%)	13 (54,2) / (56,5)
	Fehlend (%)	1 (4,2)

Tabelle 27: Übersicht Expressionen Subkollektiv mTOR-Inhibitor-Therapie

Aufschlüsselung Subkollektiv „mTOR-Inhibitor-Therapie“				
Fall	Therapieregime	mTOR IHC-Score pro Patient	p-mTOR IHC-Score pro Patient	Ratio pro Patient
016	Met – Su – Sor - Ev	58,00	48,00	,8276
022	Met – Tem - Sut	160,00	60,00	,3750
041	Met – UroRCC – Sor - Ev	120,00	120,00	1,0000
045	Met – Met – Su – Paz - Ev	45,00	55,00	1,2222
046	Met – Su – Bev – Paz - Ev	178,00	165,00	,9270
048	Met – Rt – Met - Tem	65,00	70,00	1,0769
049	Rt – Met – Paz – Sor – Bev – Sut - Tem	115,00	115,00	1,0000
055	Met – Sut - Ev	103,00	110,00	1,0680
059	Met - Met - Tem - Sut	-	-	-
062	Met - Sut – Ev - Paz	210,00	60,00	,2857
066	Met – Met – Met – Sut – Ev – Sut – Paz – Sut	121,00	74,00	,6116
072	Met – Sut – Sor - Ev	170,00	140,00	,8235
073	Sut – Met – Met - Tem	250,00	255,00	1,0200
076	Met – Sut – Ev – Sor – Bev – Sut - Paz	210,00	45,00	,2143
077	Met – Sut – Met – Ev – Sor - Bev	280,00	157,00	,5607
079	Met - Tem	123,00	20,00	,1626
087	Sut – Sor – Ev – Paz – Sut - Tem	180,00	98,00	,5444
089	Tem – Sut	40,00	10,00	,2500
009	Met – Paz - Ev	107,00	135,00	1,2617
019	Rt – UroRCC – Met – Sut - Ev	150,00	70,00	,4667
021	Sut – Met – Paz – Sut – Ev – Sor - Ax	155,00	50,00	,3226
024	Met - Tem	120,00	93,00	,7750

029	Met – Rt - Tem	15,00	40,00	2,6667
068 (87)	Tem	50,00	95,00	1,9000

Tabelle 28: Aufschlüsselung Expressionen Subkollektiv mTOR-Inhibitor-Therapie

Abkürzungsverzeichnis: **Ax** = Axitinib, **Bev** = Bevacizumab, **Ev** = Everolimus, **Met** = Metastasenresektion, **Paz** = Pazopanib, **RT** = Radiotherapie, **Sor** = Sorafenib, **Sut** = Sunitinib, **Tem** = Temsirolimus, **UroRCC** = Vaccine/Immun-priming

7.7 Kontingenzanalysen

Chi-Square Test für die mTOR-Expression					
Parameter	Verarbeitete Fälle (%) [max. 91]	Kategorien	mTOR-Expression [Median = 139,00]		p-Wert (nach Yates)
			≤ Median	> Median	
Geschlecht	Gültig: 86 (94,5) Fehlend: 5 (5,5)	Männlich (%) Weiblich (%)	33 (50,8) 10 (47,6)	32 (49,2) 11 (52,4)	1,000
Alter bei Metastasierung > Median [65,11 Jahre]	Gültig: 81 (89,0) Fehlend: 10 (11,0)	Nein (%) Ja (%)	23 (56,1) 19 (47,5)	18 (43,9) 21 (52,5)	0,581
Metastasierungszeitpunkt	Gültig: 81 (89,0) Fehlend: 10 (11)	Metachron (%) Synchron (%)	27 (49,1) 15 (57,7)	28 (50,9) 11 (42,3)	0,628
Disease free intervall < 12 Monate	Gültig: 83 (91,2) Fehlend: 8 (8,8)	Nein (%) Ja (%)	23 (52,3) 19 (48,7)	21 (47,7) 20 (51,3)	0,981
Anzahl durch Metastasierung betroffener Organsysteme > 1	Gültig: 86 (94,5) Fehlend: 5 (5,5)	Nein (%) Ja (%)	9 (52,9) 34 (49,3)	8 (47,1) 35 (50,7)	1,000
Auftreten von Zweittumoren	Gültig: 81 (89) Fehlend: 10 (11)	Nein (%) Ja (%)	35 (50,0) 7 (63,6)	35 (50,0) 4 (36,4)	0,605
Diabetes mellitus Typ II	Gültig: 80 (87,9) Fehlend: 11 (12,1)	Nein (%) Ja (%)	34 (52,3) 8 (53,3)	31 (47,7) 7 (46,7)	1,000
BMI > 25	Gültig: 78 (85,7) Fehlend: 13 (14,3)	Nein (%) Ja (%)	11 (42,3) 30 (57,7)	15 (57,7) 22 (42,3)	0,297
BMI > 30	Gültig: 78 (85,7) Fehlend: 13 (14,3)	Nein (%) Ja (%)	34 (54,0) 7 (46,7)	29 (46,0) 8 (53,3)	0,825

Genereller Nikotinkonsum	Gültig: 75 (82,4) Fehlend: 16 (17,6)	Nein (%) Ja (%)	28 (50,0) 12 (63,2)	28 (50,0) 7 (36,8)	0,467
Genereller Alkoholkonsum	Gültig: 74 (81,3) Fehlend: 17 (18,7)	Nein (%) Ja (%)	27 (51,9) 12 (54,5)	25 (48,1) 10 (45,5)	1,000
Karnofsky-PS < 80	Gültig: 69 (75,8) Fehlend: 22 (24,2)	Nein (%) Ja (%)	30 (54,5) 8 (57,1)	25 (45,4) 6 (42,9)	1,000
MSKCC	Gültig: 81 (89,0) Fehlend: 10 (11,0)	0 (0 RF) I (1-2 RF) (%) II (3-5 RF) %	16 (55,2) 22 (53,7) 4 (36,4)	13 (44,8) 19 (46,3) 7 (63,6)	0,538 (nach Pearson)

Tabelle 29: Chi-Square Test für die mTOR-Expression

Chi-Square Test für die p-mTOR-Expression					
Parameter	Verarbeitete Fälle (%) [max. 91]	Kategorien	p-mTOR [Median=111,50]		p-Wert (nach Yates)
			≤ Median	> Median	
Geschlecht	Gültig: 88 (96,7) Fehlend: 3 (3,3)	Männlich (%) Weiblich (%)	31 (46,3)	36 (53,7)	0,317
Alter bei Metastasierung > Median [65,11 Jahre]	Gültig: 83 (91,2) Fehlend: 8 (8,8)	Nein (%) Ja (%)	23 (56,1)	18 (43,9)	0,324
Metastasierungszeitpunkt	Gültig: 83 (91,2) Fehlend: 8 (8,8)	Metachron (%) Synchron (%)	27 (47,4)	30 (52,6)	0,756
Disease free intervall < 12 Monate	Gültig: 85 (93,4) Fehlend: 6 (6,6)	Nein (%) Ja (%)	21 (45,7)	25 (54,3)	0,764
Anzahl durch Metastasierung betroffener Organsysteme > 1	Gültig: 88 (96,7) Fehlend: 3 (3,3)	Nein (%) Ja (%)	6 (31,6)	13 (68,4)	0,120
Auftreten von Zweitumoren	Gültig: 83 (91,2) Fehlend: 8 (8,8)	Nein (%) Ja (%)	36 (50,0)	36 (50,0)	1,000
Diabetes mellitus Typ II	Gültig: 82 (90,1) Fehlend: 9 (9,9)	Nein (%) Ja (%)	37 (56,1)	29 (43,9)	0,051
BMI > 25	Gültig: 80 (87,9) Fehlend: 11 (12,1)	Nein (%) Ja (%)	14 (51,9)	13 (48,1)	1,000
BMI > 30	Gültig: 80 (87,9) Fehlend: 11 (12,1)	Nein (%) Ja (%)	33 (50,8)	32 (49,2)	1,000

Genereller Nikotinkonsum	Gültig: 77 (84,6) Fehlend: 14 (15,4)	Nein (%) Ja (%)	27 (46,6) 11 (57,9)	31 (53,4) 8 (42,1)	0,553
Genereller Alkoholkonsum	Gültig: 76 (83,5) Fehlend: 15 (16,5)	Nein (%) Ja (%)	24 (45,3) 13 (56,5)	29 (54,7) 10 (43,5)	0,515
Karnofsky-PS < 80	Gültig: 71 (78,0) Fehlend: 20 (22,0)	Nein (%) Ja (%)	28 (49,1) 7 (50,0)	29 (50,9) 7 (50,0)	0,953
MSKCC	Gültig: 83 (91,2) Fehlend: 8 (8,8)	0 (0 RF) I (1-2 RF) (%) II (3-5 RF) %	15 (48,4) 20 (48,8) 5 (45,5)	16 (51,6) 21 (51,2) 6 (54,5)	0,981 (nach Pearson)

Tabelle 30: Chi-Square Test für die p-mTOR-Expression

Chi-Square Test für die Ratio					
Parameter	Verarbeitete Fälle (%) [max. 91]	Kategorien	Ratio [Median = 0,8297]		p-Wert (nach Yates)
			≤ Median	> Median	
Geschlecht	Gültig: 86 (94,5) Fehlend: 5 (5,5)	Männlich (%)	32 (49,2)	33 (50,8)	0,704
		Weiblich (%)	12 (57,1)	9 (42,9)	
Alter bei Metastasierung > Median [65,11 Jahre]	Gültig: 81 (89,0) Fehlend: 10 (11,0)	Nein (%)	20 (48,8)	21 (51,2)	0,910
		Ja (%)	21 (52,5)	19 (47,5)	
Metastasierungszeitpunkt	Gültig: 81 (89,0) Fehlend: 10 (11,0)	Metachron (%)	29 (52,7)	26 (47,3)	0,753
		Synchron (%)	12 (46,2)	14 (53,8)	
Disease free intervall < 12 Monate	Gültig: 83 (91,2) Fehlend: 8 (8,8)	Nein (%)	20 (45,5)	24 (54,5)	0,587
		Ja (%)	21 (53,8)	18 (46,2)	
Anzahl durch Metastasierung betroffener Organsysteme > 1	Gültig: 86 (94,5) Fehlend: 5 (5,5)	Nein (%)	5 (29,4)	12 (70,6)	0,083
		Ja (%)	39 (56,5)	30 (43,5)	
Auftreten von Zweitumoren	Gültig: 81 (89,0) Fehlend: 10 (11,0)	Nein (%)	34 (48,6)	36 (51,4)	0,545
		Ja (%)	7 (63,6)	4 (36,4)	
Diabetes mellitus Typ II	Gültig: 80 (87,9) Fehlend: 11 (12,1)	Nein (%)	39 (60,0)	26 (40,0)	0,003 Phi= 0,364
		Ja (%)	2 (13,3)	13 (86,7)	
BMI > 25	Gültig: 78 (85,7) Fehlend: 13 (14,3)	Nein (%)	16 (61,5)	10 (38,5)	0,298
		Ja (%)	24 (46,2)	28 (53,8)	
BMI > 30	Gültig: 78 (85,7) Fehlend: 13 (14,3)	Nein (%)	34 (54,0)	29 (46,0)	0,493
		Ja (%)	6 (40,0)	9 (60,0)	

Genereller Nikotinkonsum	Gültig: 75 (82,4) Fehlend: 16 (17,6)	Nein (%) Ja (%)	27 (48,2) 10 (52,6)	29 (51,8) 9 (47,4)	0,946
Genereller Alkoholkonsum	Gültig: 74 (81,3) Fehlend: 17 (18,7)	Nein (%) Ja (%)	25 (48,1) 12 (54,5)	27 (51,9) 10 (45,5)	0,799
Karnofsky-PS < 80	Gültig: 69 (75,8) Fehlend: 22 (24,2)	Nein (%) Ja (%)	29 (52,7) 6 (42,9)	26 (47,3) 8 (57,1)	0,719
MSKCC	Gültig: 81 (89,0) Fehlend: 10 (11,0)	0 (0 RF) I (1-2 RF) (%) II (3-5 RF) %	12 (41,4) 21 (51,2) 6 (54,5)	17 (58,6) 20 (48,8) 5 (45,5)	0,648 (nach Pearson)

Tabelle 31: Chi-Square Test für die Ratio

7.8 Cox-Regression

Cox-Regression: Gesamtüberleben (OS) ab Erstdiagnose (ED) eines RCC					
Parameter	Verarbeitete Fälle (%) [max.85]	Hazard Ratio (inkl. 95% CI)			
		OS ab ED RCC univariat	p-Wert	OS ab ED RCC multivariat [39 verfügbare Fälle]	p-Wert
Geschlecht [Frau vs. Mann]	84 (98,8)	0,810 (0,355-1,850)	0,618		
Erkrankungsalter in Jahren > als Median [61,0]	84 (98,8)	1,296 (0,597-2,813)	0,512		
Erkrankungsalter > 70 Jahre	84 (98,8)	2,713 (1,093-6,733)	0,031	0,698 (0,163-2,917)	0,612
Metastasierungszeitpunkt [synchron vs. metachron]	84 (98,8)	4,249 (1,879-9,610)	0,001	1,777 (0,511-6,179)	0,366
Durchmesser des Primärtumors > Median [6,5cm]	61 (71,8)	1,179 (0,546-2,549)	0,675		
T-Stadium Primärtumor > 2	77 (90,6)	1,802 (0,837-3,881)	0,133		
Fuhrman-Grading Primärtumor > 2	75 (88,2)	3,431 (1,549-7,599)	0,002	1,201 (0,338-4,270)	0,778
Nekrosen innerhalb des Primärtumors	48 (56,5)	1,520 (0,637-3,628)	0,346		
Sarkomatoide Komponenten innerhalb des Primärtumors	49 (57,6)	4,726 (1,454-15,361)	0,010	4,485 (0,590-34,075)	0,147
Kapselinfiltration des Primärtumors	51 (60,0)	0,969 (0,414-2,270)	0,943		
Hilusveneninfiltration des Primärtumors	47 (55,3)	0,870 (0,351-2,157)	0,764		
Anämie [Männlich: <13g/dl; Weiblich <12/dl]	82 (96,5)	2,771 (1,284-5,978)	0,009	0,985 (0,272-3,570)	0,982
Leukozytose [>10.500 / μ l]	81 (95,3)	2,793 (0,940-8,295)	0,064		

Thrombozytose [> 345.000 / μ l]	81 (95,3)	1,488 (0,665-3,328)	0,334		
Kreatinin erhöht [Männlich: > 1,1, Weiblich > 0,9 mg/dl]	81 (95,3)	0,664 (0,307-1,437)	0,299		
Harnstoff erhöht [> 50mg/dl]	77 (90,6)	0,770 (0,265-2,236)	0,630		
CRP erhöht [> 0,5 mg/dl]	77 (90,6)	3,121 (1,141-8,536)	0,027	5,458 (0,665- 44,785)	0,114
GPT erhöht [Männlich > 50 bzw. Weiblich > 35 U/l]	67 (78,8)	4,062 (0,907- 18,195)	0,067		
GOT erhöht [Männlich > 50 bzw. Weiblich > 35 U/l]	69 (81,2)	3,166 (0,705- 14,214)	0,133		
gGT erhöht [Männlich > 60 bzw. Weiblich > 40 U/l]	68 (80,0)	2,222 (0,913-5,408)	0,078		
AP erhöht [Männlich > 130 bzw. Weiblich > 105 U/l]	64 (75,3)	1,456 (0,486-4,364)	0,502		
LDH erhöht	84 (98,8)	1,656 (0,572-4,798)	0,353		
Gesamt-Serum-Calcium erhöht [>2,6 mmol/l]	81 (95,3)	2,069 (0,486-8,808)	0,325		
Diabetes mellitus Typ II	84 (98,8)	0,671 (0,233-1,933)	0,460		
BMI > 25	82 (96,5)	0,682 (0,325-1,432)	0,312		
BMI > 30	82 (96,5)	1,078 (0,406-2,862)	0,880		
Genereller Nikotinkonsum	79 (92,9)	1,470 (0,638-3,392)	0,366		
Genereller Alkoholkonsum	78 (91,8)	1,009 (0,455-2,237)	0,983		

Karnofsky-PS < 80	71 (83,5)	3,932 (1,476- 10,475)	0,006	1,571 (0,412- 5,989)	0,508
ASA > 2	75 (88,2)	2,508 (1,133-5,549)	0,023	3,499 (0,685- 17,875)	0,132

Tabelle 32: Cox-Regression Gesamtüberleben (OS) ab Erstdiagnose (ED) eines RCC

Cox-Regression: Krebspezifisches Überleben (CSS) ab Erstdiagnose (ED) eines RCC					
Parameter	Verarbeitete Fälle (%) [max.85]	Hazard Ratio (inkl. 95% CI)			
		CSS ab ED RCC univariat	p-Wert	CSS ab ED RCC multivariat [34 verfügbare Fälle]	p-Wert
Geschlecht [Frau vs. Mann]	83 (97,6)	0,799 (0,348-1,834)	0,596		
Erkrankungsalter in Jahren > als Median [61,0]	83 (97,6)	1,018 (0,459-2,256)	0,966		
Erkrankungsalter > 70 Jahre	83 (97,6)	1,1896 (0,689-5,217)	0,215		
Metastasierungszeitpunkt [synchron vs. metachron]	83 (97,6)	4,326 (1,877-9,967)	0,001	1,673 (0,417-6,707)	0,468
Durchmesser des Primärtumors > Median [6,5cm]	60 (70,6)	1,129 (0,506-2,518)	0,768		
T-Stadium Primärtumor > 2	76 (89,4)	1,609 (0,732-3,538)	0,237		
Fuhrman-Grading Primärtumor > 2	74 (87,1)	3,236 (1,412-7,417)	0,006	2,575 (0,594-11,156)	0,206
Nekrosen innerhalb des Primärtumors	48 (56,5)	1,395 (0,574-3,387)	0,462		
Sarkomatoide Komponenten innerhalb des Primärtumors	49 (57,6)	4,726 (1,454-15,361)	0,010	3,164 (0,498-20,090)	0,222
Kapselinfiltration des Primärtumors	51 (60,0)	0,856 (0,354-2,067)	0,729		
Hilusveneninfiltration des Primärtumors	47 (55,3)	0,928 (0,370-2,328)	0,874		
Anämie [Männlich: <13g/dl; Weiblich <12/dl]	81 (95,3)	2,227 (1,022-4,854)	0,044	0,567 (0,099-3,257)	0,525
Leukozytose [>10.500 /µl]	80 (94,1)	2,724 (0,915-8,115)	0,072		
Thrombozytose [> 345.000 /µl]	80 (94,1)	1,544 (0,685-3,480)	0,295		

Kreatinin erhöht [männlich: > 1,1, Weiblich > 0,9 mg/dl]	80 (94,1)	0,619 (0,280-1,369)	0,236		
Harnstoff erhöht [> 50mg/dl]	76 (89,4)	0,623 (0,186-2,089)	0,444		
CRP erhöht [> 0,5 mg/dl]	76 (89,4)	3,805 (1,260- 11,483)	0,018	2,554 (0,251- 25,954)	0,428
GPT erhöht [Männlich > 50 bzw. Weiblich > 35 U/l]	67 (78,8)	4,070 (0,909- 18,229)	0,067		
GOT erhöht [Männlich > 50 bzw. Weiblich > 35 U/l]	69 (81,2)	5,006 (1,387- 18,071)	0,014	1,926 (0,271- 13,714)	0,513
gGT erhöht [Männlich > 60 bzw. Weiblich > 40 U/l]	68 (80,0)	1,781 (0,713-4,450)	0,217		
AP erhöht [Männlich > 130 bzw. Weiblich > 105 U/l]	64 (75,3)	1,431 (0,478-4,286)	0,522		
LDH erhöht	83 (97,6)	1,680 (0,578-4,882)	0,340		
Gesamt-Serum-Calcium erhöht [>2,6 mmol/l]	80 (94,1)	2,083 (0,488-8,895)	0,322		
Diabetes mellitus Typ II	83 (97,6)	0,896 (0,340-2,361)	0,824		
BMI > 25	81 (95,3)	0,715 (0,331-1,545)	0,393		
BMI > 30	81 (95,3)	1,168 (0,436-3,132)	0,758		
Genereller Nikotinkonsum	78 (91,8)	1,367 (0,570-3,282)	0,484		
Genereller Alkoholkonsum	77 (90,6)	1,057 (0,473-2,361)	0,893		
Karnofsky-PS < 80	71 (83,5)	2,880 (1,024-8,097)	0,045	2,582 (0,578- 11,534)	0,214

ASA > 2	74 (87,1)	2,179 (0,939-5,058)	0,070		
---------	-----------	------------------------	-------	--	--

Tabelle 33: Cox-Regression Krebspezifisches Überleben (CSS) ab Erstdiagnose (ED) eines RCC

Cox-Regression: Gesamtüberleben (OS) ab Erstmetastasierung					
Parameter	Verarbeitete Fälle (%) [max.85]	Hazard Ratio (inkl. 95% CI)			
		OS ab Erstmetastasierung univariat	p-Wert	OS ab Erstmetastasierung multivariat [76 Fälle verfügbar]	p-Wert
Geschlecht [Frau vs. Mann]	81 (95,3)	0,690 (0,303-1,571)	0,377		
Alter bei Metastasierung > Median [65,11 Jahre]	81 (95,3)	0,856 (0,404-1,813)	0,685		
Metastasierungszeitpunkt [synchron vs. metachron]	81 (95,3)	1,690 (0,798-3,578)	0,170		
Disease free intervall < 12 Monate	81 (5,3)	1,862 (0,878-3,950)	0,105		
Initial multipel metastasiert	80 (94,1)	1,294 (0,616-2,718)	0,495		
Anzahl durch Metastasierung betroffener Organsysteme > 1	81 (95,3)	1,608 (0,485-5,331)	0,437		
Insgesamt nur Lungenmetastase(n)	80 (94,1)	0,693 (0,094-5,105)	0,719		
Insgesamt nur Lymphknoten-Metastase(n)	80 (94,1)	0,045 (0,000-96,354)	0,428		
Insgesamt Lebermetastase(n)	80 (94,1)	1,722 (0,730-4,060)	0,214		
Insgesamt Knochenmetastase(n)	81 (95,3)	2,810 (1,327-5,950)	0,007	2,544 (0,697-9,284)	0,157
Prognosegruppe insgesamt „gut“ (=nur Lungen-/Lymphknotenmetastasen)	81 (95,3)	0,461 (0,109-1,945)	0,292		
Prognosegruppe insgesamt „schlecht“ (=u.a. Leber-/Knochenmetastasen)	81 (95,3)	2,787 (1,260-6,165)	0,011	1,300 (0,347-4,864)	0,697
Diabetes mellitus Typ II	81 (95,3)	0,935 (0,322-2,716)	0,902		

BMI > 25	79 (92,9)	0,589 (0,277-1,252)	0,169		
BMI > 30	79 (92,9)	0,869 (0,330-2,289)	0,776		
Genereller Nikotinkonsum	77 (90,6)	1,055 (0,464-2,397)	0,899		
Genereller Alkoholkonsum	76 (89,4)	0,999 (0,448-2,225)	0,998		
MSKCC >/= intermediate Group	79 (92,9)	2,003 (0,880-4,557)	0,098		
MSKCC = poor Group	79 (92,9)	2,286 (0,864-6,046)	0,096		
gemittelter mTOR- Score pro Patient > Median	77 (90,6)	1,061 (0,488-2,310)	0,881		
gemittelter p-mTOR- Score pro Patient > Median	78 (91,8)	0,866 (0,397-1,887)	0,717		
Gemittelte Ratio pro Patient > Median	77 (90,6)	0,773 (0,349-1,713)	0,526		

Tabelle 34: Cox-Regression Gesamtüberleben (OS) ab Erstmetastasierung

Cox-Regression: Krebspezifisches Überleben (CSS) ab Erstmetastasierung					
Parameter	Verarbeitete Fälle (%) [max.85]	Hazard Ratio (inkl. 95% CI)			
		CSS ab Erstmetastasierung univariat	p-Wert	CSS ab Erstmetastasierung multivariat [75 verfügbare Fälle]	p-Wert
Geschlecht [Frau vs. Mann]	80 (94,1)	0,676 (0,295-1,548)	0,354		
Alter bei Metastasierung > Median [65,11 Jahre]	80 (94,1)	0,684 (0,313-1,497)	0,342		
Metastasierungszeitpunkt [synchron vs. metachron]	80 (94,1)	1,795 (0,839-3,840)	0,132		
Disease free intervall < 12 Monate	80 (94,1)	2,012 (0,931-4,349)	0,076		
Initial multipel metastasiert	79 (92,9)	1,387 (0,651-2,953)	0,397		
Anzahl durch Metastasierung betroffener Organsysteme > 1	80 (94,1)	4,776 (0,647-35,231)	0,125		
Insgesamt nur Lungenmetastase(n)	79 (92,9)	0,046 (0,000-147,458)	0,455		
Insgesamt nur Lymphknoten-Metastase(n)	79 (92,9)	0,045 (0,000-121,463)	0,442		
Insgesamt Lebermetastase(n)	79 (92,9)	2,177 (0,951-4,986)	0,066		
Insgesamt Knochenmetastase(n)	80 (94,1)	2,997 (1,388-6,472)	0,005	2,551 (0,697-9,330)	0,157
Prognosegruppe insgesamt „gut“ (=nur Lungen-/Lymphknoten-metastasen)	80 (94,1)	0,242 (0,033-1,788)	0,165		
Prognosegruppe insgesamt „schlecht“ (=u.a. Leber-/Knochenmetastasen)	80 (94,1)	3,078 (1,346-7,040)	0,008	1,440 (0,377-5,501)	0,594
Diabetes mellitus Typ II	80 (94,1)	1,254 (0,471-3,343)	0,650		

BMI > 25	78 (91,8)	0,606 (0,277-1,329)	0,212		
BMI > 30	78 (91,8)	0,941 (0,354-2,500)	0,903		
Genereller Nikotinkonsum	76 (89,4)	0,942 (0,398-2,232)	0,892		
Genereller Alkoholkonsum	75 (88,2)	1,061 (0,473-2,382)	0,885		
MSKCC >/= intermediate Group	78 (91,8)	1,901 (0,831-4,352)	0,128		
MSKCC = poor Group	78 (91,8)	1,776 (0,611-5,166)	0,292		
gemittelter mTOR- Score pro Patient > Median	76 (89,4)	0,998 (0,453-2,200)	0,997		
gemittelter p-mTOR- Score pro Patient > Median	77 (90,6)	0,797 (0,357-1,775)	0,578		
Gemittelte Ratio pro Patient > Median	76 (89,4)	0,701 (0,308-1,596)	0,397		

Tabelle 35: Cox-Regression Krebspezifisches Überleben (CSS) ab Erstmetastasierung

8 Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Urologie der Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. J. Bedke durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. J. Bedke, Herrn PD Dr. med. S. Rausch (Oberarzt an der Klinik für Urologie der Universitätsklinik Tübingen) sowie Herrn Prof. Dr. med. S. Kruck (ehem. Oberarzt an der Klinik für Urologie, nunmehr Chefarzt der Klinik für Urologie des Helios Klinikum Pforzheim).

Das Zusammenstellen des Metastasenkollektivs sowie die mikroskopische Auswertung der histologischen Proben am Pathologischen Institut der Universitätsklinik Tübingen erfolgten eigenständig nach Einarbeitung durch Herrn Dr. med. M. Scharpf (Oberarzt am Pathologischen Institut der Universitätsklinik Tübingen). Das Erstellen der TMAs des Metastasenkollektivs erfolgte eigenständig nach Unterweisung am IKP Stuttgart unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. M. Schwab. Die Färbungen der TMAs sowie deren Digitalisierung erfolgte durch das Labor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen. Die digitale Auswertung der Färbungen erfolgte eigenständig nach Unterweisung durch Herrn PD Dr. med. S. Rausch. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig.

Hiermit bestätige ich, dass ich das vorliegende Manuskript selbstständig verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet sowie aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Stuttgart, den

Daniel Schollenberger

9 Veröffentlichungen

Rausch S, Schollenberger D, Hennenlotter J, Stühler V, Kruck S, Stenzl A, Bedke J. mTOR and mTOR phosphorylation status in primary and metastatic renal cell carcinoma tissue: differential expression and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019 Jan;145(1):153-163. doi: 10.1007/s00432-018-2775-5. Epub 2018 Oct 27

Rausch, S., Beermann, J., Scharpf, M., Hennenlotter, J., Fend, F., Stenzl, A., Schollenberger, D., Bedke, J., Kruck, S. Differential expression and clinical relevance of MUC1 in renal cell carcinoma metastasis. *World J Urol.* 2016 Dec;34(12):1635-1641

10 Danksagungen

Für die Ermöglichung der vorliegenden Arbeit möchte ich im Besonderen danken:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. J. Bedke für die Überlassung des Themas sowie entsprechender Ressourcen und die konstruktiven Anmerkungen und Hilfestellungen im Rahmen des Promotionsprozesses.

Herrn PD Dr. med. S. Rausch für die geduldige und kompetente Unterstützung und Beratung in sämtlichen Phasen der Erstellung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. med. S. Kruck für das Wecken der Neugier und Hilfe bei der Schwerpunktsetzung des Themas.

Herrn Dr. med. M. Scharpf für die Beratung bei der Auswahl der histologischen Schnitte und die Einweisung am Pathologischen Institut der Universitätsklinik Tübingen.

Dem Labor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen für das Erstellen der immunhistochemischen Färbungen sowie deren Digitalisierung.

Dem Pathologischen Institut der Universitätsklinik Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. F. Fend für das Überlassen der Kollektivproben sowie die Möglichkeit der Nutzung unterschiedlichster Ressourcen.

Dem IKP Stuttgart unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. M. Schwab für die Einweisung in die Technik des TMA und das Überlassen notwendiger Instrumente.

Meinen Eltern für ihre Liebe und Unterstützung in allen Lebensabschnitten.