

Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Untersuchungen zur Bedeutung zellulärer Regulationsprozesse  
des Aktivierungsstatus von mTOR und 4E-BP1 und ihre  
Auswirkungen auf Tumorgenese und Progression des  
Prostatakarzinoms -  
Immunhistochemische Untersuchungen mittels der tissue  
microarray Technik**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

**von Sivers, Hannes Wolfgang Andreas**

2018

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Professor Dr. B. Autenrieth

Professor Dr. Dr. h.c. A. Stenzl

Professor Dr. H-G. Kopp

11.07.2018



# **INHALTSVERZEICHNIS**

1	Einleitung .....	1
1.1	Die Prostata.....	1
1.1.1	Anatomische Grundlagen .....	1
1.1.2	Funktion.....	2
1.2	Das Prostatakarzinom .....	2
1.2.1	Epidemiologie .....	2
1.2.2	Ätiologie.....	3
1.2.3	Klinik und Diagnose.....	5
1.2.4	Klassifikation.....	7
1.2.5	Therapie.....	9
1.2.5.1	Watchful Waiting und Active Surveillance .....	9
1.2.5.2	Strahlentherapie und Brachytherapie .....	10
1.2.5.3	Prostatektomie.....	11
1.2.5.4	Chemotherapie .....	11
1.2.5.5	Hormonentzugstherapie und hormonrefraktäres PCA.....	12
1.2.5.6	Neuartige Therapieansätze.....	12
1.2.6	Prognose und prognostische Marker .....	14
1.3	Der PI3K/Akt/mTOR Pathway.....	15
1.3.1	Bedeutung der mTOR Signalkaskade .....	15
1.3.2	Der mTOR-Komplex.....	16
1.3.3	Die Regulation der mTOR-Signalkaskade .....	19
1.3.3.1	Aktivierung von mTOR zu p-mTOR.....	23
1.3.4	Downstream von mTOR .....	24
1.3.5	Das 4E-binding protein (4E-BP1) .....	25
1.3.6	mTOR im Zusammenhang mit onkologischen Erkrankungen.....	26
1.3.7	mTOR im Zusammenhang mit der Biologie des Prostatakarzinoms .....	28
1.4	Fragestellung .....	30
2	Material und Methoden .....	31
2.1	Beschreibung des Patientenkollektivs .....	31
2.1.1	Einschlusskriterien .....	33
2.1.2	Ausschlusskriterien .....	33
2.2	Ablauf der Rekrutierung des Patientenmaterials .....	34
2.3	Die Tissue Microarray Technik (TMA) .....	35
2.3.1	Allgemeine Aspekte .....	35
2.3.2	Technische Durchführung .....	36
2.3.3	Erstellung der Schnittpräparate und der HE Färbung .....	39

2.4	Immunhistochemie .....	40
2.4.1	Allgemeine Aspekte .....	40
2.4.1	Durchführung der immunhistochemischen Färbungen .....	41
2.4.2	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen .....	45
2.4.3	Objektivierung und Operationalisierung der immunhistochemischen Färbungen .....	46
2.5	Datendokumentation und -auswertung .....	50
2.6	Statistische Datenanalyse .....	50
2.7	Datenschutz .....	51
2.8	Ethische Aspekte .....	51
3	Ergebnisse .....	52
3.1	Patienten- und Gesamt-Probenkollektive .....	52
3.2	Immunhistochemisches Färbeergebnis .....	56
3.2.1	Auswertbarkeit der Färbungen .....	56
3.2.2	Darstellung des Färbeverhaltens von mTOR .....	58
3.2.3	Darstellung des Färbeverhaltens von p-mTOR .....	59
3.2.4	Darstellung des Färbeverhaltens von 4E-BP1 .....	61
3.2.5	Darstellung des Färbeverhaltens von p-4E-BP1 .....	63
3.3	Re-Evaluation der mRNA Expressionen .....	65
3.3.1	Korrelation der mRNA Expressionen mit klinischen Daten .....	65
3.3.2	Korrelation der mRNA Expressionen mit histopathologischen Eigenschaften ....	65
3.3.3	Lokoregionäre Verteilung der mRNA Expressionen im Prostataraum .....	65
3.3.3.1	Einfluss der Entdifferenzierung auf die mRNA Expressionen .....	65
3.3.3.2	Einfluss des Tumorstadiums auf die mRNA Expression des am Tumor angrenzenden Normalgewebes .....	66
3.3.4	Korrelation zwischen den mRNA Expressionen der Marker .....	66
3.4	Korrelation der Parameter-Expressionen mit histopathologischen Eigenschaften....	67
3.4.1	Prostata-Normalgewebe im Vergleich zu PCA-Gewebe bezüglich der Proteinexpression .....	67
3.4.1.1	Prostata-Normalgewebe im Vergleich zu PCA-Gewebe hinsichtlich der Protein-Expressionen von mTOR sowie von p-mTOR .....	67
3.4.1.2	Prostata-Normalgewebe im Vergleich zu PCA-Gewebe hinsichtlich der Protein-Expressionen des Quotienten p-mTOR/mTOR .....	67
3.4.1.3	Prostata-Normalgewebe im Vergleich zu PCA-Gewebe hinsichtlich der Protein-Expressionen von 4E-BP1 und p-4E-BP1 .....	68
3.4.1.4	Prostata-Normalgewebe im Vergleich zu PCA-Gewebe hinsichtlich der Protein-Expressionen des Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1 .....	68
3.4.2	Entdifferenzierung und Staging des PCAs .....	70
3.4.2.1	Proteinexpression in Abhängigkeit des Gleason-Scores .....	70
3.4.2.2	Proteinexpression in Abhängigkeit des T-Stadiums .....	71

3.4.2.3	Proteinexpression in Abhängigkeit des N-Stadiums.....	71
3.4.3	Korrelation mit klinischen Daten der Patienten .....	72
3.4.3.1	Proteinexpression in Abhängigkeit des Patientenalters bei Operation .....	72
3.4.3.2	Expression der Parameter in Abhängigkeit des PSA-Wertes .....	72
3.5	Lokoregionäre Verteilungen im Prostataraum .....	73
3.5.1	Einfluss der Entdifferenzierung auf die Proteinexpression.....	73
3.5.2	Einfluss des Tumorstadiums auf die Proteinexpression des am Tumor angrenzenden Normalgewebes.....	75
3.6	Interaktionen der Proteinparameter vor dem Hintergrund einer Signaltransduktion	77
3.6.1	Interaktion von mTOR mit 4EB1, p-4E-BP1 und Quotienten im gesamten Prostata-Raum .....	77
3.6.1.1	Interaktion von mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und Quotienten im Normal- und Tumorgewebe.....	78
3.6.1.2	Interaktion von mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und Quotienten im benignen-, im an Tumor angrenzenden Gewebe, sowie im low- und high- Gleason-Gewebe .....	79
3.6.2	Interaktion von p-mTOR mit 4EB1, p-4E-BP1 und Quotienten im gesamten Prostataraum.....	80
3.6.2.1	Interaktion von p-mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und Quotienten im Normal- und Tumorgewebe .....	81
3.6.2.2	Interaktion von p-mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und dem Quotienten p-4E-BP1/4EBP im benignen-, im an Tumor angrenzenden-, sowie im low- Gleason- & high-Gleason-Gewebe .....	82
3.6.3	Interaktion vom Quotienten p-mTOR/mTOR mit 4EB1, p-4E-BP1 und Quotienten .....	82
3.6.3.1	Interaktion vom Quotienten p-mTOR/mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und Quotienten im Normal- und Tumorgewebe .....	82
3.6.3.2	Interaktion vom Quotienten p-mTOR/mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und Quotienten im benignen-, an Tumor angrenzenden, sowie im low- und high Gleason-Gewebe .....	82
3.6.4	Übersicht über die Interaktionen auf Protein-Niveau in Abhängigkeit des Gewebes .....	84
3.7	Interaktionen auf unterschiedlicher Regulationsebene vor dem Hintergrund einer Signaltransduktion .....	85
3.7.1	Auswirkung der mTOR-mRNA Expression auf die Proteinexpression von mTOR, p-mTOR und Quotient, 4E-BP1 und p-4E-BP1 und Quotient.....	85
3.7.1.1	Auswirkungen der mTOR-mRNA Expression auf nachgeschaltete Proteinparameter – Vergleich im Normal- und Tumorgewebe .....	86
3.7.1.2	Auswirkungen der mTOR-mRNA auf nachgeschaltete Proteinparameter – Vergleich im Normal-, angrenzenden, low- und high-Gleason-PCA- Gewebe.....	87
3.7.2	Auswirkung der 4E-BP1 mRNA Expression auf die Proteinexpression von 4E-BP1 und p-4E-BP1 und Quotient .....	88

3.7.2.1	Auswirkungen der 4E-BP1-mRNA auf nachgeschaltete Proteinparameter - Vergleich im Normal- und Tumorgewebe .....	88
3.7.2.2	Auswirkungen der 4E-BP1 mRNA auf nachgeschaltete Proteinparameter – Vergleich im Normal-, angrenzenden, low- und high-Gleason-PCA-Gewebe.....	89
3.7.3	Übersicht über die Interaktionen der mTOR- bzw.4E-BP1-mRNA mit den ihnen nachgeschalteten Proteinparametern in Abhängigkeit der Gewebe-Entität .....	90
4	Diskussion .....	92
4.1	Zielsetzung der Arbeit .....	92
4.2	Proteinexpressionscharakteristika des mTOR Komplexes.....	95
4.2.1	Expressionscharakteristika des mTOR Proteins.....	95
4.2.2	Expressionscharakteristika des p-mTOR Proteins .....	96
4.2.2.1	Expressionscharakteristika des p-mTOR Proteins zwischen Tumor- und Normalgewebe .....	96
4.2.2.2	Expressionscharakteristika des p-mTOR Proteins innerhalb des Tumorgewebes .....	97
4.2.2.3	Expressionscharakteristika des p-mTOR Proteins in der Tumorinvasionsfront.....	98
4.2.2.4	Expressionscharakteristika des p-mTOR Proteins hinsichtlich klinisch, pathologischer Eigenschaften .....	98
4.2.3	Aktivierungsstatus von mTOR auf Proteinebene .....	99
4.2.4	Zusammenschau der lokoregionären Expressionscharakteristika des mTOR Proteins.....	101
4.3	Proteinexpressionscharakteristika des 4E-BP1 Komplexes .....	103
4.3.1	Expressionscharakteristika des 4E-BP1 Proteins .....	103
4.3.2	Expressionscharakteristika des p-4E-BP1 Proteins.....	104
4.3.2.1	Expressionscharakteristika des p-4E-BP1 Proteins zwischen Tumor- und Normalgewebe .....	105
4.3.2.2	Expressionscharakteristika des p-4E-BP1 Proteins in der Tumorinvasionsfront.....	106
4.3.3	Aktivierungsstatus von 4E-BP1 auf Proteinebene .....	107
4.3.4	Zusammenschau der lokoregionären Expressionscharakteristika des 4E-BP1 Proteins.....	108
4.4	Expressionscharakteristika von mTOR und 4E-BP1 auf mRNA Niveau .....	110
4.4.1	Expressionscharakteristika von mTOR auf mRNA Niveau.....	110
4.4.1.1	Expressionscharakteristika von mTOR mRNA im Prostataraum.....	110
4.4.1.2	Expressionscharakteristika von mTOR-mRNA hinsichtlich klinisch, pathologischer Eigenschaften .....	111
4.4.2	Expressionscharakteristika von 4E-BP1 auf mRNA Niveau .....	112
4.4.2.1	Expressionscharakteristika von 4E-BP1 mRNA im Prostataraum .....	112

4.4.2.2	Expressionscharakteristika von 4E-BP1 mRNA hinsichtlich klinisch, pathologischer Eigenschaften .....	113
4.5	Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf mRNA und Proteinebene .....	114
4.5.1	Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf mRNA-Ebene .....	114
4.5.2	Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf Proteinebene .....	115
4.5.2.1	Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf Proteinebene im gesamten Prostataraum .....	115
4.5.2.2	Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf Proteinebene zwischen Tumor- und Normalgewebe .....	116
4.5.2.3	Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf Proteinebene bei Subgruppenanalyse.....	117
4.5.2.4	Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf Proteinebene - Zusammenfassung .....	118
4.5.3	Regulation der mTOR Signalkaskade – Interaktion zwischen mRNA- und Proteinebene .....	119
4.5.3.1	Interaktion zwischen mRNA- und Proteinebene im gesamten Prostataraum .....	120
4.5.3.2	Interaktion zwischen mRNA- und Proteinebene zwischen Tumor- und Normalgewebe .....	120
4.5.3.3	Interaktion zwischen mRNA- und Proteinebene im Normalgewebe.....	120
4.5.3.4	Interaktion zwischen mRNA- und Proteinebene im Tumorgewebe .....	121
4.5.3.5	Interaktion zwischen mRNA- und Proteinebene - Zusammenfassung .....	122
4.5.4	Regulation der mTOR Signalkaskade – Bestimmung des lokoregionären Regulationsniveaus.....	123
4.5.4.1	Bestimmung des Regulationsniveaus der mTOR Signalkaskade .....	123
4.5.4.2	Bestimmung des Regulationsniveaus – Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe .....	124
4.5.4.3	Bestimmung des Regulationsniveaus – Unterschiede im Normalgewebe	125
4.5.4.4	Bestimmung des Regulationsniveaus – Unterschiede im Tumorgewebe.	126
4.6	Klinische Bedeutung der Proteinexpressionen .....	128
4.6.1	Prädiktion eines angrenzenden PCAs .....	128
4.6.2	Therapeutische Konsequenzen der Studienergebnisse.....	130
4.6.2.1	Klinischer Einsatz und Probleme von mTOR-Inhibitoren beim PCA.....	130
4.6.2.2	Problemlösungsansätze beim Einsatz von mTOR-Inhibitoren beim PCA	130
4.6.3	Prognostische Konsequenzen der Studienergebnisse.....	132
4.7	Limitationen der vorliegenden Arbeit .....	133
4.7.1	TMA-Technik und immunhistochemische Färbungen.....	133
4.7.2	Patientenkollektiv .....	134



5	Zusammenfassung .....	135
6	Literaturverzeichnis.....	137
7	Darstellung des Eigenanteils .....	157
8	Anhang .....	159
8.1	Danksagungen .....	159
8.2	Lebenslauf .....	161

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1.1 Prostata Zoneneinteilung.....	1
Abbildung 1.2 Epidemiologie des Prostatakarzinoms .....	3
Abbildung 1.3 Darstellung des Gleason-Scores.....	8
Abbildung 1.4 Zusammensetzung des mTORC1 und mTORC2 Komplexes.....	18
Abbildung 1.5 Beeinflussung der mTORC1 Aktivität durch Wachstumssignale.....	20
Abbildung 1.6 Regulation und Interaktion der mTOR Signalkaskade mit anderen Signalwegen .....	23
Abbildung 2.1 Übersicht über die Herstellung eines Tissue-Microarrays (TMAs).....	35
Abbildung 2.2 Aussehen des Tissue Microarrayer (MTA-1) .....	37
Abbildung 2.3 Immunhistochemisch gefärbtes Schnittpräparat eines TMA Blocks .....	38
Abbildung 2.4 Darstellung des Prinzips der Immunhistochemie.....	41
Abbildung 2.5 Screenshot des Bildschirms während der Operationalisierung der IHC.....	47
Abbildung 2.6 Schematische Berechnung des Maygarden Scores .....	48
Abbildung 2.7 Beispielhafte Berechnung des Maygarden Scores .....	49
Abbildung 3.1 Beispielhafte Übersicht über das Färbeverhalten der verschiedenen Gewebe.	56
Abbildung 3.2 Darstellung der mTOR Färbeskala.....	58
Abbildung 3.3 Beispielhafte Darstellung des inhomogenen Färbeverhaltens von p-mTOR...	59
Abbildung 3.4 p-mTOR Färbeskala .....	60
Abbildung 3.5 Beispielhafte Darstellung des inhomogenen Färbeverhaltens von 4E-BP1 .....	61
Abbildung 3.6 4E-BP1 Färbeskala.....	62
Abbildung 3.7 p-4E-BP1 Färbeskala .....	63
Abbildung 3.8 A-F: Vergleich der medianen Proteinexpressionen bzw. der Quotienten zwischen Normal- und Tumorgewebe .....	69
Abbildung 3.9 A-F: Vergleich der medianen Proteinexpressionen bzw. der Quotienten zwischen Normalgewebe, Tumorinvasionsfront, low- und high-Gleason Gewebe.....	70
Abbildung 3.10 A-B: Vergleich der medianen Proteinexpressionen bzw. des Quotienten in Abhängigkeit der lokalen Tumorausbreitung.....	71
Abbildung 3.11 Korrelation des PSA-Wertes mit dem Quotienten p-mTOR/mTOR. ....	72
Abbildung 3.12 A-F: Vergleich der medianen Proteinexpressionen bzw. der Quotienten zwischen Normalgewebe, Tumorinvasionsfront, low- und high-Gleason Gewebe:.....	74
Abbildung 3.13 A-F: Vergleich der medianen Proteinexpressionen bzw. der Quotienten innerhalb der Tumorinvasionsfront.....	76

Abbildung 3.14 A-C: Darstellung der medianen Expression von 4E-BP1, p-4E-BP1 und p-4E-BP1/4E-BP1 in Abhängigkeit der medianen Expression von mTOR im gesamten Prostataraum.....	77
Abbildung 3.15 A-B: Korrelation der mTOR- und p-4E-BP1-Expression in Geweben unterschiedlicher Dignität.....	79
Abbildung 3.16 A-B: Darstellung der medianen Proteinexpression von p-4E-BP1 bzw. des Quotienten in Abhängigkeit der medianen p-mTOR Expression im gesamten Prostataraum.	81

## **TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit .....	32
Tabelle 2: Übersicht über das Gesamt-Patienten- und Gesamt-Probenkollektiv .....	53
Tabelle 3: Eigenschaften der Tumorpatienten .....	54
Tabelle 4: Eigenschaften der Patienten mit Gewebe Proben aus der Tumordinvasionsfront ....	55
Tabelle 5: Darstellung der medianen mTOR und 4E-BP1 mRNA Expressionen in Abhängigkeit der Gewebedignität.....	66
Tabelle 6: Darstellung der medianen mTOR- und 4E-BP1- mRNA Expressionen der Tumordinvasionsfront von low- und high-Gleason PCAs.....	66
Tabelle 7: Darstellung der medianen Proteinexpressionen der Tumordinvasionsfront von low- und high-Gleason PCAs.....	75
Tabelle 8: Übersicht über signifikante Korrelationen auf Proteinebene .....	84
Tabelle 9: Übersicht über die Interaktionen zwischen mRNA- und Protein-Niveau .....	91

## VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
§	Paragraph
°C	Grad Celsius
4E-BP1	Eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1
A3	Din-A3
Abs.	Absatz
AG	Antigen
AK	Antikörper
Akt	Protein Kinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP	Alkalische Phosphatase
AR	Androgenrezeptor
ATG13	autophagy-related gene 13
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
BDSG	Bundesdatenschutzgesetz
BP	Binding protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CRPC	Katratonsresistentes Prostatakarzinom
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAG	Diacylglycerol
DEPTOR	DEP-domain-containing mTOR-interacting protein
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Deoxyribonucleic acid
DRU	Digitale rektale Untersuchung
EGFR	Epidermal growth factor receptor
eIF4E	Eukaryotic initiation factor 4E
ERK1/2	Extracellular-signal-regulated kinase 1/2

et al.	<i>et alii, et aliae, et alia.</i> „und andere“
e. V.	eingetragener Verein
FAT	FRAP–ATM–TTRAP
Fc	Fragment crystallisable
FIP200	Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa
FKB12	FK506-binding protein of 12 kDa
g	Gramm
G0 Phase	Gap 0 Phase
G1 Phase	Gap 1 Phase
GDP	Guanosindiphosphat
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GS	Gleason-Score
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
Gq	G-Protein q
HBCa	Harnblasenkarzionom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HR	Hormonrezeptor
HRP	Horse Radish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IGF-1	insulinlike growth factor-1
IGFR	Insulin-like growth factor 1 receptor
IHC	Immunhistochemie
IKK $\beta$	inhibitorische $\kappa$ B Kinase- $\beta$
Inc.	Incorporated
IP3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IRS	Insulin receptor substrate
LHRH	Luteinisierungs-Hormon-Releasing-Hormon
LKB1	Liver kinase B1
M-Status	Fernmetastasen-Status
ml	Milliliter
mLST8	Mammalian lethal with sec-13 protein 8
mm	Millimeter

mol	6,022x10 <sup>23</sup> Teilchen
mRNA	Messenger RNA
mSin1	Mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
mTORC1/2	Mechanistic target of rapamycin complex 1/2
n	Anzahl
N-Status	Lymphknoten-Status
ng	Nanogramm
No.	Number
OP	Operation
p27	Protein 27
p-mTOR	Phospho-mTOR
p-4E-BP1	Phospho-4E-BP1
p53	Tumorsuppressor-Protein53
Pat.	Patienten
PCA	Prostatakarzinom
PCA-3	Prostata Cancer Antigen 3
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase 1
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Aktivität
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIKK	Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related kinase
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PPW	positiv prädiktive Wert
PPAR $\gamma$	peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$
PRAS40	Proline-rich Akt substrate 40 kDa
PRR5	Proline Rich 5
Protor 1/2	Protein observed with rictor 1 and 2
PSA	Prostata-spezifischen Antigen

PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
QCG	Quercetin-6-C- $\beta$ -d-Glucopyranosid
R-Status	Resektionsstatus
Raf	Rat fibrosarcoma
Rag	Recombination-activating gene
Raptor	Regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin
Ras	Rat sarcoma RCC Renal cell carcinoma
RB	Retinoblastom
REDD1	Regulated in development and DNA damage responses 1
Rheb	Ras homolog enriched in the brain
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	ribosomale RNA
RSK1	p90 ribosomal S6 kinase 1
RPE	Radikale Prostatektomie
s.	siehe
S6K	S6-Kinase
Ser	Serin
SIN	Stress-activated map kinase-interacting protein
SREBP1	sterol regulatory element binding protein 1
StGB	Strafgesetzbuch
T-Status	Primärtumor-Ausdehnungsstaus
TBST	Tris-buffered saline with Tween® 20
Thr	Threonin
TMA	Tissue microarray
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TNM	Tumor, Nodes, Metastasen
TORC	Target of rapamycin complex
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
TRUS	Transrektaler Ultraschall
TSC1/2	Tuberous sclerosis protein 1 (hamartin)/2 (tuberin)
TUR-P	Transurethrale Resektion der Prostata

TVP	Transvesikale Prostataadenomenukleation
UICC	Union internationale contre le cancer
ULK1	unc-51-like kinase1
USA	United States of America
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Name zusammengesetzt aus Wingless and Int-1
WW	Watchful waiting
z.B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer



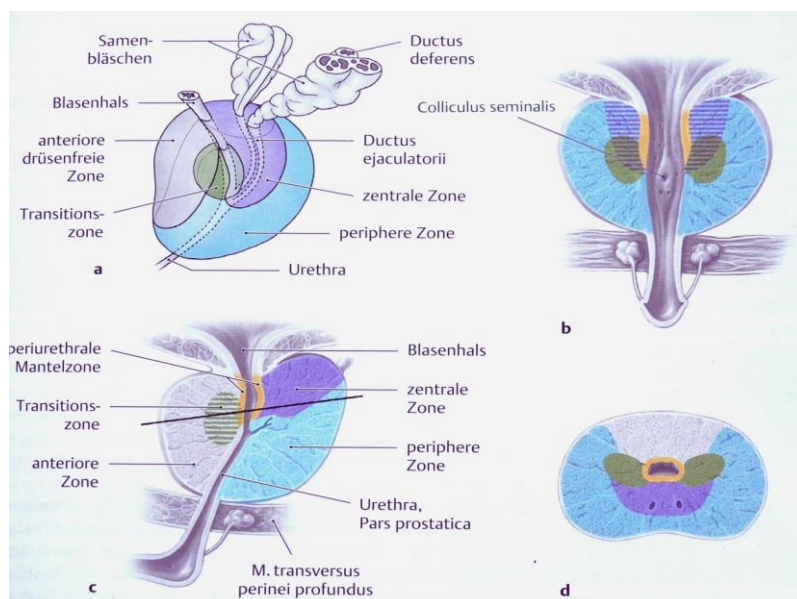
# 1 Einleitung

## 1.1 Die Prostata

### 1.1.1 Anatomische Grundlagen

Die Prostata liegt extraperitoneal im kleinen Becken des Mannes, kaudal der Harnblase und wird von der *Urethra* durchzogen. Dorsokranial liegt die paarige Samenblase (*Glandula vesiculosa*), deren Ausführungsgang (*Ductus excretorius*) sich zusammen mit dem Samenstrang (*Ductus deferens*) vereinigt, den *Ductus ejaculatorius* bilden und letztendlich auf dem *Colliculus seminalis* in die *Urethra pars prostatica* mündet. Dorsal befindet sich die Vorderwand des *Rectums*, kaudal liegt die Prostata mit ihrem Apex dem *Musculus transversus perinei profundus* auf, welcher einen Teil des Beckenbodens darstellt.

Die Prostata ist im Normalfall kastaniengroß (ca. 20ml Organvolumen) und wird in zwei Seitenlappen (*lobus dexter* und *lobus sinister*) unterteilt. Die *Capsula prostatica*, eine feste bindegewebige Kapsel, umgibt die Prostata und grenzt sie von der Umgebung ab. Die heutige klinische Unterteilung der Prostata nach McNeal gliedert sie in vier Zonen (s. Abbildung 1.1)



**Abbildung 1.1**

#### **Prostata Zoneneinteilung**

aus (Schünke et al. 2009)

- Aufsicht auf die Prostata von kranio-lateral, das Samenbläschen ist nach kranial mobilisiert;
- Koronarschnitt auf Höhe der Urethra mit Blick auf den Colliculus seminalis;
- Sagittalschnitt auf Höhe der Urethra;
- Transversalschnitt der Prostata auf Höhe der schwarzen Linie in Abbildung c)

Die *periurethrale Zone* erstreckt sich um die *Urethra*, enthält periurethrale Drüsen und zählt zum präprostatistischen *Sphincter* (Selman 2011). Dorsolateral der *periurethralen Zone* befindet sich die *zentrale Zone*, welche die beiden *Ducti ejaculatorii* umgibt. Wiederum dorsolateral davon schließt sich die *periphere Zone* an, welche sich bis zum Prostataapex erstreckt und den Großteil der Organmasse ausmacht. Dort, meist nahe der Prostatakapsel, ist ein Großteil der Prostatakarzinome zu finden. Die *anteriore Zone* ist meist eine drüsenfreie Zone, die aus fibromuskulärem Stroma besteht.

### 1.1.2 Funktion

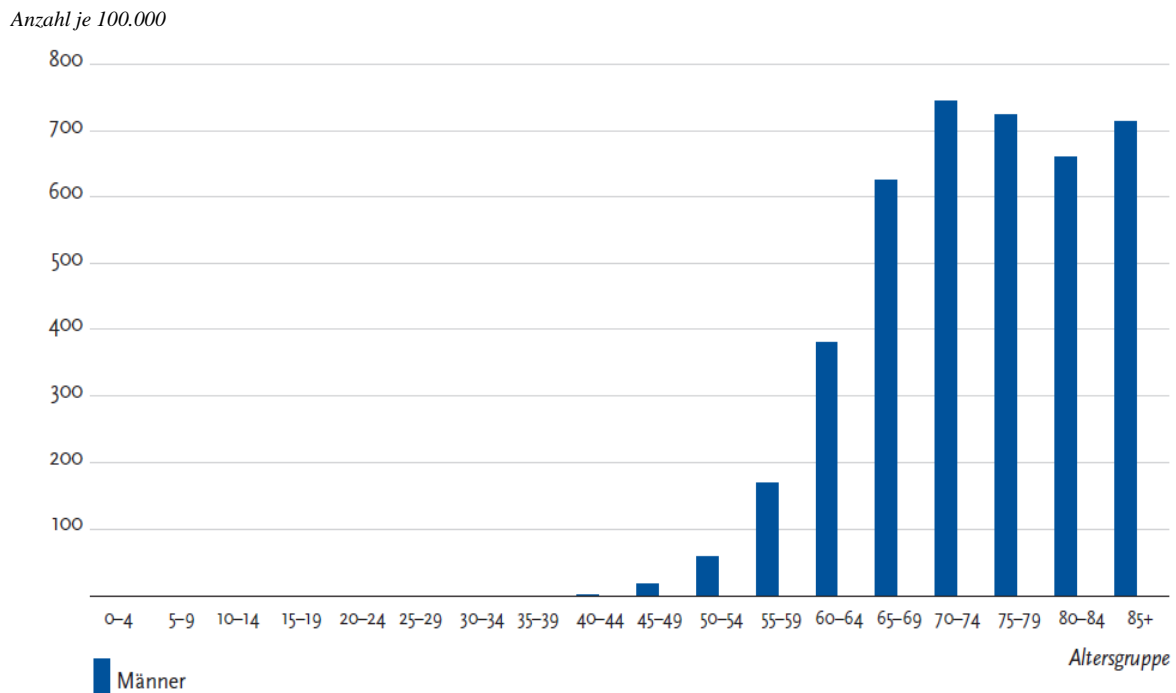
Die Prostata ist eine der akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes und trägt entscheidend zur *in vivo* Fertilität des Mannes bei (Prins). Das leicht saure Prostatasekret (pH=6,4) ist für 10–30% des Ejakulat-Volumens verantwortlich und enthält eine Menge verschiedener Proteasen. Diese verflüssigen das visköse Sekret der Bläschendrüse (Kirsch et al. 2011), wirken motilitätsfördernd auf die Spermien (Spermin), nehmen Einfluss auf die Kontraktion der glatten Muskulatur des weiblichen Genitaltraktes (Prostaglandine) und wandeln Testosteron durch das Enzym 5-alfa-Reduktase in den zehnfach stärker wirksamen Metaboliten Dihydrotestosteron (DHT) um. Das prostataspezifische Antigen (PSA) spaltet Semenogeline und sorgt dafür, dass das Ejakulat nach 15-30 Minuten verflüssigt wird und die Spermien in Richtung *Cervix* transportiert werden können (Balk 2003). Die die *Urethra* umschließende *pars prostatica* ist mitverantwortlich für die Kontinenz des Mannes. Der fibromuskuläre Anteil der Prostata verhindert zusammen mit dem Harnblasen-Sphincter eine retrograde Ejakulation.

## 1.2 Das Prostatakarzinom

### 1.2.1 Epidemiologie

Mit ca. 65.800 registrierten Neuerkrankungen und einer absoluten Inzidenz von 164/100.000 stellte 2010 das Prostatakarzinom (PCA) die häufigste Tumorerkrankung bei Männern in Deutschland dar (Kaatsch et al. 2013). Dabei ist die absolute als auch die altersstandardisierte Inzidenz seit den 1980ern Jahren bis 2004 stetig gestiegen und steigt weiter an.

Das PCA ist eine Erkrankung des älteren Mannes, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei ca. 70 Jahren liegt. Das Lebenszeitrisko, an einem PCA zu erkranken, beträgt ca. 15% (Heidenreich et al. 2011), die Wahrscheinlichkeit, als Betroffener daran zu versterben, nur 20% (Bertz et al. 2010). Daher nimmt das PCA lediglich Platz 3 (10,1%) im Ranking der tödlich verlaufenden Tumorerkrankungen ein (Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V 2009). So beziffert das RKI (Robert Koch Institut) die relative 5-Jahres Überlebensrate auf 93%, die absolute dahingegen nur auf 78% (Kaatsch et al. 2013). In Europa sind die skandinavischen Länder stärker vom PCA als südeuropäische Länder betroffen (Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V 2009), global besteht eine Differenz zwischen Entwicklungs- und Industrieländern. In letzteren ist die Inzidenz erheblich höher.



### Abbildung 1.2 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Anzahl der an einem Prostatakarzinom neu erkrankten Männer pro 100.000 im Jahr 2009-2010 (aus Kaatsch et al. 2013).

#### 1.2.2 Ätiologie

Wie bei den meisten Tumorerkrankungen ist für die PCA-Entstehung ein multifaktorielles Geschehen verantwortlich, wobei folgende vier Risikofaktoren zu erwähnen sind:

Risikofaktor Nummer eins stellt das **Alter** dar. Wie in Abbildung 1.2 zu sehen, kommt es zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr zu einer exponentiellen Zunahme der Inzidenz. Das Risiko eines 75-jährigen Mannes, in den nächsten 10 Jahren an einem PCA zu erkranken, ist 60-fach höher als das eines 35-jährigen (Kaatsch et al. 2013).

Ein Einfluss der **Genetik** in der Genese des PCAs wird als ein sehr wichtiger Risikofaktor angesehen (Stenzl et al. 2009). Hat ein Verwandter ersten Grades ein PCA, liegt das Risiko, selbst im Alter von 85 Jahren an einem PCA zu erkranken, bei 88%. Dagegen sind nur 5% aus familiär unbelasteten Familien betroffen. Sind mehrere Verwandte betroffen, so steigt das Risiko auf ein 5- bis 11-faches (Meikle et al. 1985). Hereditär bedingte PCAs stellen 9% aller PCAs dar (Grönberg et al. 1996). Sie treten durchschnittlich 7 Jahre früher als sporadische PCAs auf, sind für 40% aller frühen Prostatakarzinome (PCAs vor dem 55. Lebensjahr) verantwortlich (Bratt 2002) und unterscheiden sich in ihrer klinischen Präsentation nicht von sporadisch auftretenden PCAs (Steinberg et al. 1990). Ob molekularebiologische Unterschiede vorliegen oder ob die mTOR (Mechanistic target of Rapamycin) Signalkaskade eine Rolle

spielt, ist bisher nicht geklärt. Einen weiteren Hinweis auf eine genetische Komponente liefern Zwillingsstudien. Es zeigte sich, dass die Konkordanz für PCAs bei eineiigen Zwillingen 4,5-fach höher war als bei zweieiigen (Grönberg et al. 1996).

Das **Hormon** Testosteron ist eng mit der Entstehung des PCA vergesellschaftet. Es bindet an den intrazellulären Androgenrezeptor (AR) und bedingt eine Steigerung der Gentranskription. So wurde beobachtet, dass Eunuchen kein PCA entwickeln (Haas & Sakr 1997), Personen, welche die anabole Wirkung des Testosterons zum Muskelaufbau verwendeten, dahingegen eine erhöhte Inzidenz von PCAs aufweisen (Taplin, Ho 2001; Roberts, Essenhig 1986). Basualto-Alarcón und Mitarbeiter zeigten, dass Testosteron durch Einbeziehung des mTOR-Signalweges Muskelhypertrophie erzielt (Basualto-Alarcón et al. 2013) und dabei zur Hochregulation von mTOR und den Downstream gelegenen Proteinen p70S6 und S6 führt (Ma et al. 2015). Auch in Prostatazellen konnte ein Androgen-Rezeptor-mTOR-Crosstalk gezeigt werden. Dabei führte das Ausschalten des AR zu einer geringeren mTOR Aktivität. Der Einfluss auf phospho-4E-BP1 (p-4E-BP1) war jedoch nicht so groß. Dennoch werden diesem Crosstalk eine wichtige Rolle im Stressmanagement der Hormonentzugstherapie zugeschrieben, der zur Entstehung eines hormonrefraktären PCAs beitragen könnte (Wu et al. 2010). Viele Fragen bleiben aber noch unbeantwortet.

Migrationsstudien zeigen, dass auch die **Ernährung** eine Rolle in der PCA Entstehung spielen muss. Es besteht eine Assoziation zwischen dem insulinlike growth factor-1 (IGF-1) Plasma Spiegel und dem PCA. IGF-1 wird vor allem in der Leber synthetisiert, wobei fettreiche, hochkalorische Ernährung sowie Insulin die Bildung anregt. Als Wachstumsfaktor verhindert IGF-1 die Apoptose und reguliert die Zellproliferation. So wurde in mehreren Kohorten-Studien eine eindeutige Assoziation zwischen einem erhöhten IGF-1 Spiegel und einem um bis zu 4-fach erhöhten PCA Risiko festgestellt (Stattin 2000). Bei Diabetes Mellitus, also Insulinmangel und einem folglich niedrigeren IGF-1 Spiegel, besteht ein um bis zu 40% niedrigeres PCA Risiko (Crawford 2003). Eine zerealien-, obst- und gemüsereiche Kost soll eine protektive Wirkung auf die Entstehung des PCAs haben. Die in Sojabohnen und Tomaten vorkommenden Isoflavonoide bzw. Lycopin wurden als Protektivfaktoren identifiziert (Haas, Sakr 1997). Laut experimenteller Studien soll die Tyrosinkinase, ein mit Zellproliferation und Angiogenese assoziiertes Enzym, gehemmt werden (Crawford 2003). Das aus dem Flavonoid Quercetin isolierte Quercetin-6-C- $\beta$ -d-Glucopyranosid (QCG) zeigte in einer Studie zytotoxische Effekte auf PCA Zellen. Es verhinderte die Zellproliferation durch Zellzyklusarrest in der G0/G1 Phase, induzierte Apoptose und wirkte inhibierend auf den Akt (Protein Kinase B) / mTOR Pathway (Hamidullah et al. 2015).

### 1.2.3 Klinik und Diagnose

Das PCA verursacht erst im fortgeschritten Stadium Symptome, welche denen der benignen Prostata Hyperplasie ähneln können. Zur Früherkennung sind geeignete Screening-Methoden notwendig.

Bei Routineuntersuchungen ab 45 Jahren (Gemeinsamer Bundesausschuss) oder bei Verdacht auf ein PCA erfolgt eine klinische Untersuchung mit digital rektaler Untersuchung DRU, welche Karzinome in der peripheren Zone ab einer Größe von 0,2ml detektieren kann. Da die alleinige Karzinom-Detektionsrate der DRU nur bei 18% liegt (Richie et al. 1993), wird die Kombination mit der PSA-Bestimmung empfohlen (Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V 2009). Das Prostata spezifische Antigen (PSA) ist eine Serinprotease, ein Organ- und kein Tumormarker, dessen Hauptproduktionsort die Epithelzellen der Prostata sind (Stenzl et al. 2009). Bei der Ejakulation wird es in die Urethra abgegeben, jedoch gelangen stetig auch kleinere Mengen in die Blutbahn, wobei freies und gesamt-PSA unterschieden wird. Beim PCA ist vor allem ein Anstieg des gesamt PSA zu beobachten (Schmid et al. 1999). So werden  $\frac{3}{4}$  der asymptomatischen PCA Diagnosen anhand des PSA-Wertes gestellt, wobei Werte von  $\geq 4$  ng/ml im Serum als karzinomverdächtig betrachtet werden (Stenzl et al. 2009). Je höher der PSA-Wert, desto höher ist auch der positiv prädiktive Wert (PPW) für die PCA Diagnose. PSA-Screening kann die Mortalität senken (Schröder 2014), jedoch auf Kosten der Überdiagnostik und Übertherapie.

Das Prostata-Cancer-Antigen 3 (*PCA-3*) - ist ein weiterer, hochspezifischer Marker für die Prostata und ist bei einem PCA bis zu hundertfach erhöht. Mittels des PCA-3 Urin-Testes kann eine genauere Aussage über das potenzielle Vorliegen eines PCAs (Stenzl et al. 2009), über das Tumorstadium sowie den Gleason-Score (GS) (Haese et al. 2008) getroffen werden. Der Transrektaler Ultraschall TRUS kann als ergänzende bildgebende Diagnostik sowie für die Bestimmung des Organvolumens eingesetzt werden, um eine Relativierung des PSA-Wertes vorzunehmen (Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V 2009, Schmid et al. 1999). Haupteinsatzgebiet ist jedoch die TRUS-gesteuerte Stanzbiopsie. Diese ist Goldstandard, um histologisch die Diagnose eines PCAs stellen zu können. Abhängig von der Biopsie-Indikation, finden sich in bis zu 50% der Stanzbiopsien ein PCA (Loeb & Partin 2011). Die durchschnittliche Detektionsrate bei einer 12-Core-Biopsie liegt sogar nur bei 28,3% (Bjurlin et al. 2014). Die Rate an falsch negativen Prostatabiopsien bei Sextanten Biopsie beträgt bis zu 39% (Bjurlin et al. 2014). Somit ist ein negatives Biopsie-Ergebnis nicht gleichbedeutend mit einem Karzinomausschluss. Die Frage bleibt im Raum, ob das Tumorareal bei der Biopsie verfehlt wurde oder ob wirklich kein Karzinom vorliegt. So sind oftmals Re-Biopsien

erforderlich. Eine 100%ige Sicherheit gibt es dennoch nicht. Reichen zwei negative Biopsie-Ergebnisse aus oder sollte sicherheitshalber noch eine dritte oder sogar vierte Biopsie durchgeführt werden (Djavan et al. 2001)? Es wäre sehr wünschenswert, eine Methode zu finden, die den prädiktiven Wert einer Stanzbiopsie erhöhen könnte und molekulare Marker zu entdecken, welche im – an den Tumor angrenzenden – benignen Gewebe mit großer Sicherheit eine Aussage über das Vorliegen eines PCAs und über dessen Therapiebedürftigkeit treffen könnten.

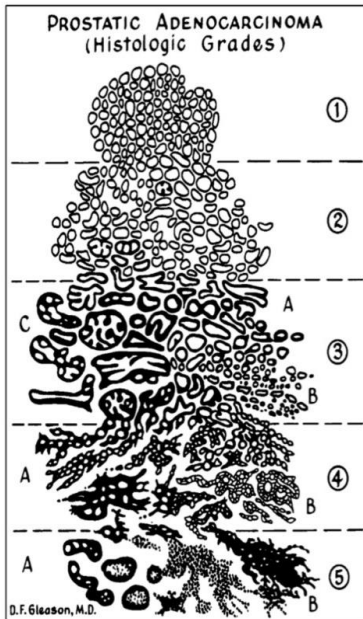
Da die konventionelle Histologie diese Fragestellungen nicht suffizient beantworten kann muss nach weiteren Lösungsansätzen gesucht werden. Dabei stellt die Immunhistochemie (IHC) einen vielversprechenden Ansatz dar, da sie bereits kleinste Veränderungen auf Proteinebene sichtbar machen kann. Unterschiedliche Aktivierungsstatus der mTOR-Signalkaskade im Prostata-Gewebe könnten mithilfe der IHC sichtbar gemacht werden. Aussagen über den Zellaktivierungsstatus könnten somit gewonnen werden, genauere Hinweise über die Dignität geben und damit eine sicherere Bewertung des Gewebes ermöglichen.

#### 1.2.4 **Klassifikation**

Um bei Vorliegen eines PCAs die adäquaten Therapieoptionen auswählen zu können, ist zuvor eine genaue Tumorklassifikation notwendig. Der TNM-Status und die histologische Beschreibung des Tumors, der Gleason-Score, bilden die Grundpfeiler und stellen mit dem PSA-Wert die Basis für die Auswahl des richtigen Therapiekonzeptes dar.

Das „Staging“ des PCAs erfolgt anhand der TNM Klassifikation. Dabei werden neben der Beurteilung der lokalen Primär-Tumorausdehnung (T-Status) Aussagen zum Befall regionärer Lymphknoten (N-Status) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Status) getätigt. Das durch unkontrolliert proliferierende Drüsenzellen entstandene Adenokarzinom der Prostata wird unter Zuhilfenahme des Gleason-Scores (GS) genauer charakterisiert, was als „Grading“ bezeichnet wird.

Donald F. Gleason beschrieb 1966 ein einzigartiges Klassifizierungssystem des PCAs, welches auf den architektonischen Wachstumsmustern der Karzinome basierte. Er beschrieb 5 verschiedene Wachstumsmuster und entwickelte daraus ein Score System. Gleason 1 stellt ein gut differenziertes, wenig aggressives, Gleason 5 ein hoch aggressives, stark entdifferenziertes Wachstum dar (s. Abbildung 1.3). Er addierte den Score des am häufigsten vorkommenden Musters mit dem des am zweithäufigsten vorkommenden Musters und bezeichnete den Gesamtwert als Gleason-Score (Epstein et al. 2009). Durch Zuteilung eines Gleason-Scores wird versucht, eine Objektivierung und so eine interindividuelle Vergleichbarkeit der PCAs herzustellen. 2005 erfolgte eine Überarbeitung und Vereinheitlichung des Gleason-Scores, die auch noch heutzutage gilt (Epstein et al. 2009). Dabei wurde u.a. aufgrund prognostischer Unterschiede der Gleason-Score 7 in den Score 7a (3+4) und den Score 7b (4+3) aufgeteilt (Stenzl et al. 2009).



### Abbildung 1.3 Darstellung des Gleason-Scores

#### Oben:

Schematische Darstellung der fünf Gleason-Wachstumsmuster:

Gleason ①: noduläre, scharf begrenzte Drüsenarchitektur;

Gleason ②: locker verteilte, weniger uniform erscheinende Drüsen;

Gleason ③: cribriformes Wachstum mit variablen Drüsengrößen und Drüsenabständen;

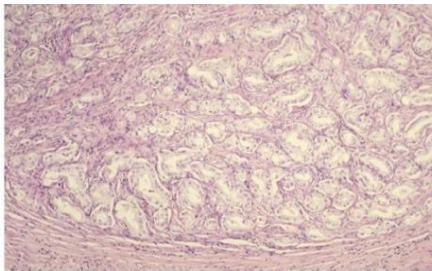
Gleason ④: kleine fusionierende, komplex cribriforme Drüsenarchitektur;

Gleason ⑤: solide Wachstumsstruktur mit teilweiseem Verlust der Drüsenlumina und fast totalem Verlust der Zellpolarität.

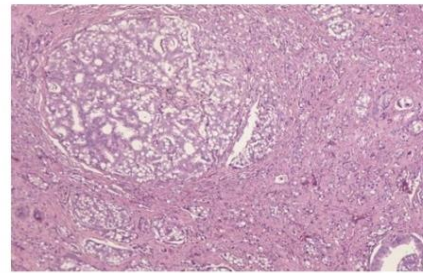
#### unten:

exemplarische Abbildungen von PCAs mit angegebenen Gleason-Wachstumsmustern und dem sich daraus ergebenden Gleason-Score (GS).

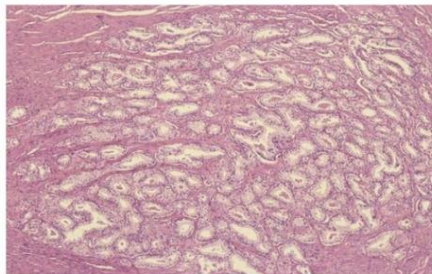
Bilder (aus Humphrey 2004)



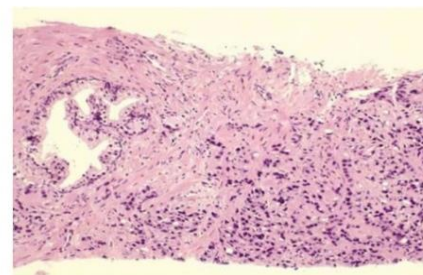
$$\textcircled{2} + \textcircled{1} = 3$$



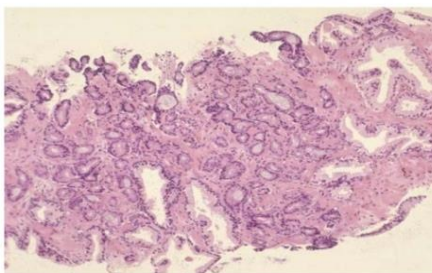
$$\textcircled{4} + \textcircled{4} = 8$$



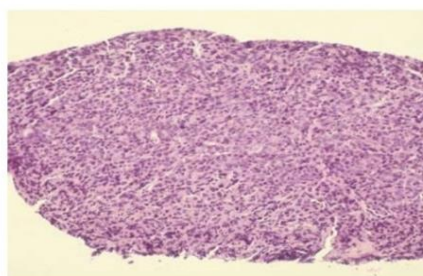
$$\textcircled{2} + \textcircled{2} = 4$$



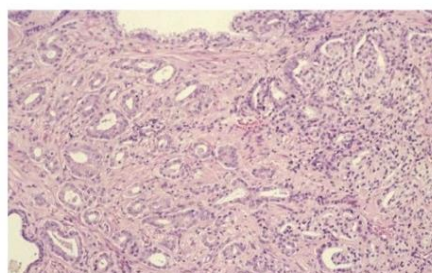
$$\textcircled{5} + \textcircled{4} = 9$$



$$\textcircled{3} + \textcircled{3} = 6$$



$$\textcircled{5} + \textcircled{5} = 10$$



$$\textcircled{3} + \textcircled{4} = 7$$



### 1.2.5 Therapie

Bei der Therapie des PCAs wird zwischen der Therapie mit kurativer Intention und palliativer Therapie unterschieden. Kurative Ansätze verfolgen dabei die radikale Prostatektomie, Strahlentherapie, Brachytherapie sowie die Active Surveillance. Hormontherapie, Chemotherapie und Watchful Waiting zählen dagegen zu den Palliativmaßnahmen. Welche Therapie im Einzelfall die richtige ist entscheidet sich vor allem anhand folgender Kriterien:

- handelt es sich um eine limited (T1/2) oder um eine extended disease (T3/4)?
- wie ist das Risikoprofil des Patienten? (D'Amico-Klassifikation, D'Amico 1998)
  - Low (Gleason  $\leq 6$  und  $\leq T2a$  und PSA  $< 10\text{ng/ml}$ )
  - Intermediate (Gleason 7 oder T2b oder PSA 10-20ng/ml)
  - High ( $\geq$ Gleason 8 oder  $\geq T2c$  oder PSA  $> 20\text{ng/ml}$ )

#### 1.2.5.1 Watchful Waiting und Active Surveillance

**Watchful Waiting** bezeichnet ein wachsames Abwarten, wobei keine Intention einer kurativen Therapie besteht. Das Hauptaugenmerk dieser Therapieoption liegt auf den aufmerksamen engmaschigen Untersuchungen des Patienten, um frühzeitig potenziell tumorbedingte Symptome wie z.B. Knochenschmerzen bei Knochenmetastasen zu erkennen und behandeln zu können (Stenzl et al. 2009). Dieser palliative Ansatz findet oft bei älteren Patienten mit gut differenziertem PCA Verwendung, die ein niedriges Risiko für einen Krankheitsprogress aufweisen. Dabei sollen die mit der Therapie assoziierten Nebenwirkungen so lange wie möglich vermieden werden (Stenzl et al. 2009).

Grundlage dieses Therapieansatzes war eine Studie, die zeigen konnte, dass Patienten (55-74 Jahre alt) mit gut differenziertem PCA (Gleason  $\leq 6$ ) eine karzinom-spezifische 15-Jahres Überlebensrate von 89-96% haben (Albertsen et al. 1998). Da das PCA vor allem im fortgeschrittenen Lebensalter auftritt (Kaatsch et al. 2013), in dem die Lebenserwartung oftmals aufgrund anderer Krankheiten nicht mehr als 15 Jahre beträgt, stellt das Watchful Waiting eine legitime Therapieoption dar und sollte bei Patienten mit einer Lebenserwartung kleiner 10 Jahre erörtert werden (Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V 2009). Ein weiteres Argument für die Legitimität dieser Maßnahme ist, dass in Autopsie-Studien bei 46% der 70-80jährigen Patienten ein PCA nachgewiesen werden konnte (Yin et al. 2008). Da das Lebenszeitrisiko, an einem PCA zu erkranken, nur bei ca. 15% liegt (Heidenreich et al. 2011), waren 65% der PCAs in

dieser Altersgruppe klinisch inapparent und hätten auch bei früherer Detektion zu keinem Zeitpunkt einer Therapie bedurft. Jedoch wird davon ausgegangen, dass die häufigen engmaschigen Nachkontrollen, die beim Watchful Waiting erforderlich sind, einen nicht zu vernachlässigenden negativen Einfluss auf die Lebensqualität nehmen (Stenzl et al. 2009), da sie immer mit der Angst einer Krankheits-Exazerbation verbunden sind.

Jedoch stehen für die Entscheidungsfindung nur eingeschränkt prädiktive Parameter zur Verfügung. Selbst der aus einer Stanzbiopsie ermittelte Gleason Score, welcher eine tragende Säule zur Therapiefindung darstellt, ist nur ein sehr unsicherer Anhaltspunkt, da immer das Risiko besteht, das tatsächliche Tumorzentrum verfehlt zu haben und somit ein therapiebedürftiges PCA fälschlicher Weise als harmlos zu deklarieren – mit fatalen Folgen. Daher ist die Suche nach verlässlichen Biomarkern von hohem wissenschaftlichem und klinischem Interesse. Dabei sollte in alle Richtungen gedacht werden und auch die mTOR Signalkaskade mit all den zugehörigen Proteinen näher untersucht werden. Ein potenzieller mTOR Biomarker sollte auch Güte im Hinblick auf die Therapiebedürftigkeit ausweisen.

**Active Surveillance** bezeichnet dagegen eine verzögerte Behandlung, die jedoch im Gegensatz zum Watchful Waiting (WW) eine kurative Intention verfolgt (Stenzl et al. 2009). Hierbei sollen aversive Therapie-Nebenwirkungen auf die Zukunft verlagert und eine gute Lebensqualität möglichst lange aufrechterhalten werden. Staging Untersuchungen sollen idealerweise den richtigen Zeitpunkt für den Beginn einer kurativen Therapie detektieren. Weiterer, sicherer Indikatoren bedarf es auch hier, um die Gefahr eines zu späten Therapiebeginns zu minimieren.

#### 1.2.5.2 Strahlentherapie und Brachytherapie

Die perkutane Strahlentherapie erfolgt standardmäßig nach Computertomographie (CT) geplanter, dreidimensionaler Bestrahlungstechnik, wobei je nach Risikogruppe die Bestrahlungsintensität als auch das Zielvolumen eskaliert werden. Ab einem intermediate-Risk PCA wird die Kombination mit einer hormonablativen Therapie empfohlen (Stenzl et al. 2009). Bei einem vorliegenden low-Risk PCA stellt sowohl die perkutane Bestrahlung eine Alternative zur radikalen Prostatektomie dar und verfolgt eine kurative Intention. Auch in Form einer adjuvanten Therapie hat die perkutane Bestrahlung ihren Stellenwert und kann als Standard-Empfehlung bezeichnet werden (Stenzl et al. 2009). So zeigen sich positive Effekte - sowohl bei lokal fortgeschrittenen Tumoren (Thompson et al. 2009) als auch bei R1 Situationen (Van

der Kwast et al. 2007), wenngleich die Gesamt-Überlebensdauer nicht signifikant verbessert werden konnte.

Immer noch gibt es bisher keine prädiktiven Biomarker, die den Erfolg einer Radiotherapie vorhersagen können. Somit ist es oft mehr oder weniger individuelle subjektive Entscheidung, welche Therapie dem Patienten angedeiht wird. Würden prädiktive molekulare Biomarker gefunden, könnte erstmals auf einer fundierten Basis entschieden werden. Zwar hat Kupelian und Mitarbeiter (Kupelian et al. 2002) in einer Studie bei einer 8 Jahre langen Nachuntersuchung von Prostatektomierten und Radiotherapierten keine wesentlichen Unterschiede im Hinblick auf das Risiko eines biochemischen Rezidives (erneuter PSA Anstieg) finden können. Jedoch könnte es bestimmte Patientengruppen geben, welche mehr als andere von einer Radiotherapie profitieren würden. Solch ein prädiktiver Biomarker könnte sich potenziell in der mTOR Signalkaskade finden, die in der vorliegenden Arbeit weitergehend untersucht wird. **Brachytherapie** stellt ein Verfahren dar, bei dem die Bestrahlung nicht perkutan, sondern, aus in die Prostata implantierten radioaktiv strahlenden Seeds erfolgt. Dabei wird zwischen der low-dose-rate Brachytherapie und der high-dose-rate Brachytherapie unterschieden, wobei bei letzterer die radioaktiven Strahler nach einer gewissen Zeit wieder entfernt werden.

#### 1.2.5.3 Prostatektomie

Die radikale Prostatektomie bezeichnet ein chirurgisches Verfahren, bei dem die vollständige Prostata, die Samenblase und Teile der *Ductus deferentes* entfernt werden. Die radikale Prostatektomie ist bei einer „limited disease“ indiziert, wenn der Patient eine Lebenserwartung von mehr als 10 Jahre hat (Stenzl et al. 2009). Unter gewissen Umständen können auch Tumorpatienten im Stadium T3 profitieren (Thompson et al. 2009).

#### 1.2.5.4 Chemotherapie

Das Prostatakarzinom galt lange Zeit als zytostatika-refraktär, da trotz PSA-Senkung keine Überlebens-Verlängerung erreicht werden konnte. Heutzutage gilt bei hormonrefraktären Prostatakarzinomen die Chemotherapie als Therapie der Wahl. Dabei hat sich die Kombination aus Prednisolon und Docetaxel - einem Taxan -, welches alle 3 Wochen verabreicht wird, durchgesetzt (Stenzl et al. 2009). Dadurch konnte bei gleichzeitiger Steigerung der Lebensqualität das Gesamtüberleben um 3 Monaten verlängert werden. Als Second-line Therapie kann eine Therapie mit Cabazitaxel - einem neuen Taxan - plus Prednisolon in Betracht gezogen werden (Heidenreich et al. 2014; Bono et al. 2010).

#### 1.2.5.5 Hormonentzugstherapie und hormonrefraktäres PCA

Das Wachstum und die Proliferation der Prostatadrüsen sind testosteronabhängig. Die Hormonentzugstherapie verfolgt das Ziel, den Serum-Testosteronspiegel auf Kastrationsniveau ( $<0,5\text{ng/ml}$  Serum-Testosteron) abzusenken, um auf diesem Weg das testosteronabhängige Wachstum der Prostata zu stoppen (Stenzl et al. 2009). Nicht nur die benignen, sondern gerade die entarteten Prostata-Drüsenzellen sind allermeist testosteronsensitiv (Park et al. 2015). Die Hormonentzugstherapie der Prostata umfasst die chirurgische Kastration, Luteinisierung-Hormon-Releasing-Hormon-Analoga (LHRH-Analoga), Antiandrogene und die Östrogengabe und ist Mittel der Wahl beim metastasierten PCAs. Sie hat als adjuvante Therapiemodalität Bedeutung bei der Strahlentherapie und stellt eine palliative Therapie dar, da lediglich die Größe des Primärtumors und die seiner Metastasen verringert werden können.

Das Ansprechen der Tumorzellen auf die Hormonentzugstherapie ist nur von begrenzter Dauer. Nach Therapiebeginn und initialem Abfall des PSA-Wertes kommt es nach ca. 2 Jahren zu einem erneuten PSA-Anstieg. Im Verlauf der Tumor-Evolution (Gerlinger, Swanton 2010) haben Mutationen allmählich zu einem kastrationsresistenten PCA (CRPC) geführt, welches dann hormonunabhängig weiterwachsen kann (Visakorpi et al. 1995). Ein CRPC lässt sich durch kontinuierliche PSA-Wert-Anstiege in drei aufeinanderfolgenden Messungen bestimmen, welche einen Minimalabstand von 14 Tagen zueinander aufweisen müssen und in demselben Labor bestimmt sein sollten (Stenzl et al. 2009). Dieses Verfahren ist aufwändig. Wünschenswert wären molekulare Parameter, die diese Veränderung zuverlässiger und unkomplizierter anzeigen würde.

Wurde ein CRPC diagnostiziert, gab es lange Zeit – bis zur Zulassung von Docetaxel 2004 – keine weitere suffiziente Therapie. Abhängig von der Konstitution des Patienten und dem Vorhandensein von Metastasen beträgt auch heute noch das mittlere Überleben lediglich 9-30 Monate (Kirby et al. 2011).

#### 1.2.5.6 Neuartige Therapieansätze

In der jüngeren Vergangenheit sind verschiedene Ansätze für therapeutische Wege gegenüber dem CRPC verfolgt worden:

*Abirateron-Acetat* ist ein neuer Androgen-Biosynthese-Inhibitor der in Kombination mit Prednisolon 2012 zur Therapie zugelassen wurde. Das mediane Gesamtüberleben lag in einer Phase-3-Studie bei 35,3 Monaten, und das radiologische progressionsfreie Überleben war 8,2 Monate länger als in der Placebo-Gruppe (Heidenreich et al. 2014; Ryan et al. 2013)

Einen weiteren neuartigen Ansatz stellt die Therapie mit Sipuleucel-T dar, das in den USA für zur Behandlung für metastasierte CRPCs zugelassen ist. Dabei handelt es sich um ein Vakzin, welches aus eigenen antigen-präsentierenden Zellen besteht. Diese werden ex-vivo mit Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor und dem Protein „saurer prostaticher Phosphatase“ konfrontiert, um danach reinfundiert zu werden (Mulders et al. 2015). Das Gesamtüberleben konnte im Vergleich zur Placebo-Gruppe um 4,1 Monate gesteigert werden. Dabei sprachen Patienten mit einem niedrigen PSA-Serumspiegel zum Zeitpunkt der Infusion besser auf die Therapie an (Heidenreich et al. 2014).

Bei der Entstehung von PCAs spielen angiogenetische Faktoren eine wichtige Rolle, sodass der Gedanke naheliegend war, mittels des Anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Antikörpers *Bevacizumab* die Angiogenese und somit die Progression des PCAs aufhalten zu wollen. Eine randomisierte Doppelblindstudie konnte jedoch kein Effekt von Bevacizumab nachweisen (Kelly et al. 2012).

Neue Wege werden auch im molekularen Targeting hinsichtlich der mTOR Signalkaskade begangen und haben neue Therapeutika hervorgebracht, die potenziell gegen das CRPC wirken: *Ardisianone*, ein natürliches Benzochinon, hat sich beim PCA als Apoptose induzierend erwiesen, indem es mitochondrialen Schaden anstellt, Caspasen aktiviert und inhibierend in den mTOR Pathway eingreift (Yu et al. 2013).

*Ligustrazine* zeigte beim PRPC proliferationshemmende und Apoptose-induzierende Eigenschaften. Dabei wurde eine signifikante Inhibition des mTOR-Aktivierungsstatus und der nachgeschalteten Kaskade beobachtet, sodass die Verfügbarkeit von eIF4E (Eukaryotic initiation factor 4E) abnahm und die CAP-abhängige Translation unterbunden wurde (Han et al. 2015).

*Palomid 529*, ein neuer TORC1/TORC2 (target of rapamycin complex) Inhibitor, wurde zusammen mit Docetaxel und Cisplatin in PCA Zelllinien eingesetzt und zeigte durch Blockade des mTOR-Pathways proliferationshemmende Eigenschaften. Auch im Mausversuch konnte eine Tumorprogression verhindert werden (Gravina et al. 2011).

Die in klinischen Studien verwendeten mTOR Inhibitoren, Everolimus und Temsirolimus konnten bisher keinen bzw. nur einen geringen Effekt zeigen (Kruczek et al. 2013; Armstrong et al. 2013; Templeton et al. 2013). Jedoch handelte es sich dabei nur um sehr klein angelegte Studien, welche lediglich 11 bis maximal 37 Patienten einschlossen. Daher bleibt abzuwarten, zu welchem Ergebnis größer angelegte Studien gelangen. Auch bleibt die Frage unbeantwortet, ob spezielle Subgruppen einen größeren Benefit als andere haben.

### 1.2.6 Prognose und prognostische Marker

Die absolute 5-Jahres-Überlebensrate bei Diagnosestellung PCA lag 2010 bei 78%, die relative bei 93% (Heidenreich et al. 2011). Lokalisierte PCAs haben meistens eine sehr gute Prognose und eine exzellente Aussicht auf Heilung. So lag in einer Studie die PCA bedingte Mortalität bei low-Risk PCAs lediglich bei 1% (Fosså et al. 2014). Leider verursachen PCAs im frühen Stadium keine Symptome. Daher empfiehlt es sich, die Vorsorgeangebote wahrzunehmen und bei Auffälligkeiten die Diagnostik entsprechend zu eskalieren.

Werden PCAs erst aufgrund der verursachenden Symptomatik detektiert, handelt es sich meist um ein fortgeschrittenes Stadium, bei dem die Heilungsaussicht schlecht ist. So liegt die 5-Jahres Überlebensrate hier nur bei ca. 28% (Siegel et al. 2015). Um dieses Szenario zu vermeiden, bedarf es weiterer, besserer Biomarker, die ein therapiebedürftiges PCA verlässlich detektieren können. Die Suche nach einem solchen Biomarker wird in der vorliegenden Arbeit weiter thematisiert werden, wobei der Stellenwert, den der mTOR-Pathway dabei einnehmen kann, im Mittelpunkt des Interesses steht.

## 1.3 Der PI3K/Akt/mTOR Pathway

Bei der Entstehung eines PCAs handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen. (Al Olama et al. 2014). Bisher konnte selbst bei hereditären PCAs kein alleiniges Gen identifiziert werden, welches für die Entstehung dieses Malignoms verantwortlich ist.

Jedoch zeigte sich bei vielen weiteren Karzinomen, dass bestimmte Signalwegskaskaden in Tumoren immer wieder in ähnlicher Weise verändert sind, was zu einer ungebremsten Zellproliferation führt. Alterationen wurden dabei unter anderem oft in der mTOR Signalkaskade beobachtet (Ocana et al. 2014), die im Folgenden näher betrachtet werden soll.

### 1.3.1 Bedeutung der mTOR Signalkaskade

mTOR (mechanistic target of rapamycin, früher auch mammalian target of rapamycin) ist ein Enzym, genauer eine Serin/Threonin-Kinase, und besteht aus 2549 Aminosäuren. Sie besitzt selbst eine Kinaseaktivität am C-terminalen Ende (Jablonska, Polouliakh 2014) und gehört zur PIKK Familie (phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related kinase).

mTOR wurde zuerst in Hefen entdeckt, bis sich herausstellte, dass es auch in allen Eukaryonten vorkommt (Hall 2008).

mTOR hat eine strategische Stelle am Schnittpunkt vieler Signalwege inne und dient im Sinne eines Torwächters. Es reguliert und koordiniert Zellwachstum, Metabolisierungsprozesse und Proliferation (Thomas 2006; Hall 2008). Es nimmt es eine Schlüsselrolle in der Vermittlung und Verarbeitung von Wachstumssignalen ein und moduliert diese entsprechend den vorherrschenden Umweltbedingungen (Energie-, Sauerstoff-, und Substanzangeboten) (Laplane, Sabatini 2009). So verwundert es nicht, dass mTOR in viele Signalkaskaden involviert ist, die Protoonkogene sowie Tumorsuppressorgene beinhalten, und dass die mTOR inhibierenden Regulatoren wie PTEN, TSC1, TSC2 und LKB1 (s.u.) als Tumorsuppressoren identifiziert wurden (Feng et al. 2005a). Dabei wurde beobachtet, dass eine Aktivierung der mTOR Signalkaskade während vieler zellulärer Prozesse wie Angiogenese, Tumorbildung, Adipogenese, T-Lymphozyten Aktivierung oder Insulinresistenz-Entstehung stattfindet, diese Aktivierung jedoch bei Erkrankungen wie Karzinomen oder Diabetes Mellitus Typ II außer Kontrolle geraten ist (Laplane, Sabatini 2009).

mTOR ist darüber hinaus in die Regulation der Embryogenese involviert. Es konnte bei *Drosophila Melanogaster* sowie in frühen Mäuseembryonen und embryonalen Stammzellen gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von mTOR und der Downstream gelegenen Proteine

zu einer reduzierten Zellgröße und letztendlich zum embryonalen Tod führten (Murakami et al. 2004).

Auch der Prozess des Alterns ist mit dem mTOR-System verbunden. So wurde festgestellt, dass eine verminderte Nahrungsaufnahme, ohne dabei an einer Mangelernährung zu leiden, in verschiedenen Spezies zu einer verlängerten Lebensspanne führte und mit einer verminderten mTOR Aktivität assoziiert war. Die alleinige Anwendung von mTOR Inhibitoren ohne Kalorienrestriktion führte ebenfalls zu einem längeren Leben. Auch wenn heutzutage die Anwendung von mTOR Inhibitoren bei sonst gesunden Menschen aufgrund der Nebenwirkungen nicht praktiziert wird, könnten zukünftig nebenwirkungsärmere mTOR Inhibitoren klinisch Verwendung finden (Johnson et al. 2013). Auch die Inzidenz von altersassoziierten Erkrankungen - wie Tumor-, kardiovaskuläre oder neurodegenerative Erkrankungen - konnte bei Rhesusaffen durch simple Nahrungsrestriktion gesenkt werden (Colman et al. 2009). So könnten beim Menschen nicht nur das Altern, sondern auch die altersassoziierten Erkrankungen durch den Einsatz von mTOR Inhibitoren vermindert bzw. das Auftreten verzögert werden. (Johnson et al. 2013).

### 1.3.2 Der mTOR-Komplex

mTOR stellt das aktive Zentrum zweier Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2 dar. **mTORC1** ist ein Positivregulator des Zellwachstums, indem es anabole Prozesse wie Bioprotein-, Ribosomen- und Liposynthese sowie den mitochondrialen Metabolismus fördert und katabole Prozesse wie Autophagie unterbindet (Jacinto et al. 2004; Schieke et al. 2006; Laplante, Sabatini 2009; Koren et al. 2010). Dies geschieht über Phosphorylierung der Translations-Regulatoren S6K (protein S6 kinase) und 4E-BP (eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein) (Gingras et al. 2004).

**mTORC2** ist hauptsächlich für die Zytoskelett-Organisation und Zellpolarisierung zuständig und weist somit überlebensförderliche Eigenschaften auf. Es wird diskutiert, dass die mTORC2 Aktivität vor allem für die Tumortransformation und das Überleben von Tumorzellen essenziell sein, während ihre Aktivität in vielen normalen Zellen nur eine untergeordnete Rolle spielen soll (Sparks, Guertin 2010).

Wesentlicher Bestandteil der Komplexe mTORC1 und mTORC2 ist das Enzym mTOR, das die katalytische Untereinheit des Komplexes darstellt und Downstream gelegene Effektorproteine durch Phosphorylierung reguliert (Laplante, Sabatini 2009).



Die beiden genannten Komplexe bestehen aus mehreren Komponenten (s. Abbildung 1.4), wobei sie sich in ihrem Aufbau ähneln. Viele Funktionen der Untereinheiten sind jedoch oft noch nicht näher erforscht. Die im Folgenden beschriebenen Einheiten sind Bestandteil beider mTORC Komplexe:

- Deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) ist ein Protein das hemmend auf die mTORC Komplexe und so auch auf mTOR wirkt (Peterson et al. 2009; Efeyan, Sabatini 2010).
- mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8, ein anderer Name für GβL), spielt bei mTORC1 eine positive Rolle in der nährstoffvermittelten Aktivierung von mTOR (Hay, Sonenberg 2004) und ist für die Stabilität des mTORC2 Komplexes von Bedeutung (Guertin et al. 2006).

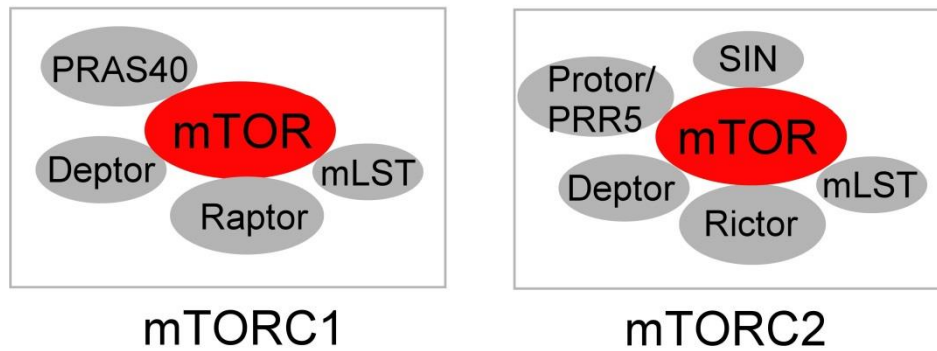
Da sich die beiden mTORC Komplexe in ihren Funktionen unterscheiden, ist es eine logische Konsequenz, dass sie sich auch in ihrem Aufbau Unterschiede finden müssen.

Für den **mTORC1** Komplex kennzeichnend sind:

- Raptor (regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin). Es ist essenziell für die Vereinigung der verschiedenen Komplex-Komponenten, ist für seine Stabilisierung zuständig und bindet darüber hinaus im Sinne eines Adapterproteins an 4E-BP1. Diese Bindung stellt das benötigte Gerüst für die von mTOR katalysierte Phosphorylierung des 4E-BP1 dar (Hara et al. 2002).
- Protein PRAS40 (proline-rich Akt substrate 40 kDa), welches einen inhibierenden Einfluss auf den Komplex hat. Es soll als direkter Inhibitor der Substratbindung fungieren, welcher wiederum selbst von der Akt (auch als protein kinase B bekannt) inhibiert wird (Wang et al. 2007).

Dahingegen sind für **mTORC2** folgende Proteine charakteristisch:

- Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) ist für die Vereinigung der verschiedenen Komponenten sowie für die Stabilisierung des mTORC2 Komplexes verantwortlich. Rictor interagiert auch mit
- Protor 1/2 (protein observed with rictor 1 and 2), einem weiten mTORC2 Bestandteil. Die genaue Funktion ist noch nicht abschließend geklärt (Laplante, Sabatini 2009).
- mSin1 (mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1) stabilisiert wiederum den Rictor-mTOR Komplex und ist für die AKT-473-Phosphorylierung und Aktivierung mit verantwortlich (Jacinto et al. 2006, Limon, Fruman 2012).



#### Abbildung 1.4 Zusammensetzung des mTORC1 und mTORC2 Komplexes

Übersicht über die Komplex-Komponenten von mTORC1 und mTORC2:

mTOR: mechanistic target of rapamycin, Deptor: DEP-domain-containing mTOR- interacting protein, mLST: mammalian lethal with sec-13 protein 8; PRAS40: proline-rich Akt substrate 40 kDa; Raptor: regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin; Rictor: rapamycin-insensitive companion of mTOR; SIN: stress-activated map kinase-interacting protein; Protor: protein observed with rictor 1 and 2, PRR5: proline rich 5 (renal).

Das von Bakterien isolierte Immunsuppressivum Rapamycin, auch als Sirolimus bekannt, kann spezifisch mTORC1 hemmen (Brown et al. 1994). Dabei bindet Rapamycin an FKBP12 (FK506-binding protein of 12 kDa), interagiert mit der FRB (FKBP12-rapamycin binding domain) von mTOR und unterbindet auf diese Weise die Funktion von mTORC1 (Guertin, Sabatini 2007).

Da Rapamycin nicht direkt an mTORC2 binden kann, galt dies lange als rapamycin-insensitiv (Jacinto et al. 2004). Jedoch konnte gezeigt werden, dass sich eine längere Rapamycin Exposition negativ auf die mTORC2 Komplex-Zusammenlagerung auswirkt (Sarbasov et al. 2006). Der genaue zugrundeliegende Mechanismus ist nicht bekannt.

mTOR Inhibitoren finden bereits im klinischen Alltag Verwendung, besonders in der Transplantationsmedizin, wobei durch seinen Einsatz die Dosis an Nierenfunktionsbelastenden Calcineurin-Inhibitoren verringert werden konnte (Deuse et al. 2015; Tang et al. 2015). Auch in der Kardiologie werden Sirolimus-eluting coronary stents erfolgreich eingesetzt, um Verschlüsse des Stents zu vermeiden (Abizaid 2007) (Young, Nickerson-Nutter 2005).

Es wurde festgestellt, dass der mTOR-Inhibitor Rapamycin den Anteil an fetalem Hämoglobin erhöht. Experimentell fand dies bereits Bedeutung bei an Sichelzellanämie leidenden Mäusen – wo diese Maßnahme zur Linderung von Symptomen führte (Khaibullina et al. 2015).

Dies zeigt, dass mTOR-Inhibitoren bereits auf unterschiedlichen Gebieten eine relevante Rolle spielen und auch zukünftig eine Therapieoption bei an Sichelzellanämie leidenden Menschen darstellen könnten.

Es war jedoch zu beobachten, dass durch Rapamycin alleine keine vollständige Hemmung von mTORC1 und somit auch von mTOR und des Downstream gelegenen 4E-BP1, ein Effektorprotein, das für die mRNA-Translation von größter Bedeutung ist, zu erzielen war (Choo et al. 2008; Jhanwar-Uniyal et al. 2015). Dies führte zur Entwicklung von selektiven mTOR-Inhibitoren, die gleichzeitig auch die downstream gelegenen Proteine unterdrücken (Chresta et al. 2010; Jhanwar-Uniyal et al. 2015).

### 1.3.3 Die Regulation der mTOR-Signalkaskade

Die mTOR-Signalkaskade ist über verschiedene direkte Signale, aber auch über Signalwege reguliert. Sie kann durch die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren und Hormonen oder der Verfügbarkeit von Aminosäuren aktiviert werden oder durch Faktoren wie Energiemangel, Stress, Hypoxie oder osmotische Veränderungen zum Stopp gebracht werden (Inoki, Guan 2006).

Einen Überblick über die erwähnten Regulationsmechanismen sind in Abbildung 1.5 dargestellt und werden im Folgenden genauer anhand des mTORC1 Komplexes betrachtet.

Eine der wichtigsten Sensoren, die in die Regulation der mTORC1-Aktivität involviert sind ist der TSC-Komplex (tuberous sclerosis complex). Dieser - ein Heterodimer - besteht aus TSC1 (Tuberous sclerosis protein 1) auch als Hamartin bekannt und TSC2 (Tuberous sclerosis protein 2) auch als Tuberin bekannt (Laplane, Sabatini 2009).

Der TSC1/2 Komplex fungiert als indirekter Inhibitor von mTORC1, indem er als GTPase (Guanosintriphosphat) aktivierendes Protein GTP-Rheb (Ras homolog enriched in brain) hydrolytisch zu GDP-Rheb spaltet (Inoki et al. 2003a; Long et al. 2005). GDP-Rheb kann konsekutiv nicht mehr seinen aktivierenden Einfluss auf mTORC1 ausüben.

Im Folgenden werden einige Signalwege erwähnt, die über Hemmung des TSC1/2 die Aktivität von mTORC1 und der Downstream gelegenen Proteinen steigern (s. Abbildung 1.5).

- **Wachstumsfaktoren** können über Rezeptor-Tyrosinkinasen (TRK) wie den Insulinrezeptor zu einer Aktivierung und Dimerisierung des TRKs führen, was eine Phosphorylierung von IRS (Insulin receptor substrate) bedingt (Zhande et al. 2002). Dieses wiederum phosphoryliert und aktiviert die PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase), die PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat) zu dem Second Messenger IP3 (Inositol-1,4,5-Trisphosphat) metabolisiert.

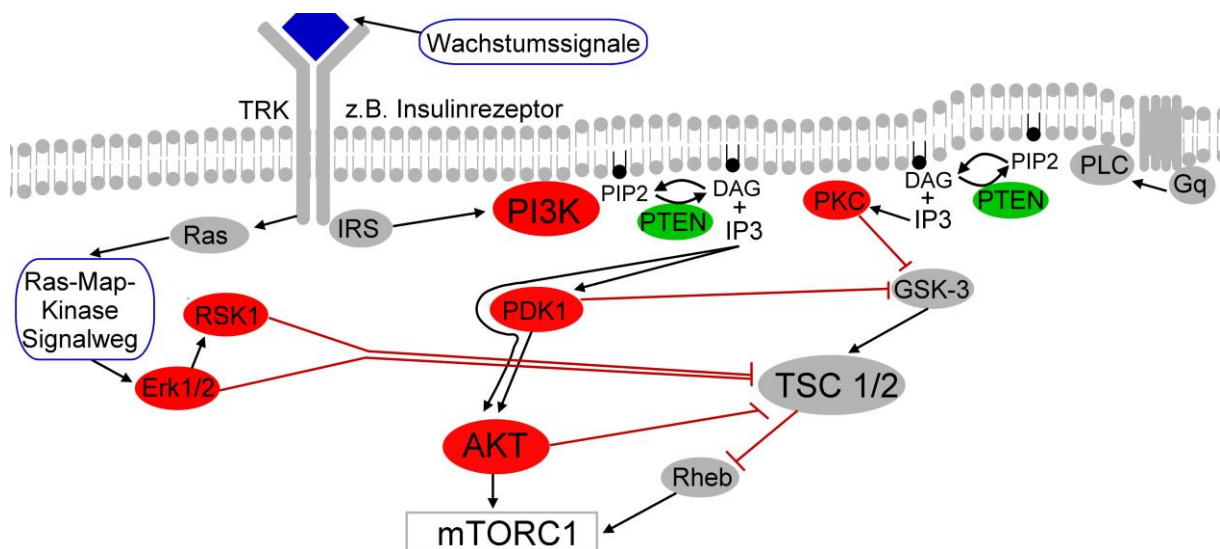
PTEN (phosphatase and tensin homolog) stellt den Gegenpart der PI3K dar und kann wiederum IP3 zu PIP2 spalten (Steelman et al. 2004).

Der Second Messenger IP3 bewirkt sowohl direkt als auch indirekt Phosphorylierung der AKT - auch als Proteinkinase B (PKB) bekannt - (Sarbasov et al. 2005) und bewirkt die Phosphorylierung und Inaktivierung von TSC1/2 (Shaw, Cantley 2006).

Der indirekte Weg verläuft über die Aktivierung von PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1), welches wiederum AKT durch Phosphorylierung aktiviert. Die aktivierte PDK1 phosphoryliert und inaktiviert GSK-3 (glycogen synthase kinase 3), die normalerweise aktivierend auf TSC1/2 wirkt (Goode et al. 1992).

Weitere Tyrosinkinase-Rezeptoren, die nach dem gleichen Prinzip TSC1/2 regulieren sind der EGFR (epidermal growth factor receptor) sowie der IGFR (insulin-like growth factor 1 receptor).

Wachstumssignale können auch über den Ras-Map-Kinase Signalweg und die ERK1/2 (extracellular-signal-regulated kinase 1/2) bzw. RSK1 (p90 ribosomal S6 kinase 1) zur Inhibition von TSC1/2 führen (Ma et al. 2005; Roux et al. 2004).



**Abbildung 1.5 Beeinflussung der mTORC1 Aktivität durch Wachstumssignale**

TRK: tyrosine receptor kinase, IRS: insulin receptor substrate, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, PI2 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, IP3: inositol-1,4,5-trisphosphate; DAG: diacylglycerol; Gq: G-Protein q; PLC: phospholipase C; PDK1: pyruvate dehydrogenase kinase 1; Akt: protein kinase B; PTEN: phosphatase and tensin homolog, ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2; RSK1: p90 ribosomal S6 kinase 1; Ras: rat sarcoma; GSK-3: glycogen synthase kinase 3; Rheb: ras homolog enriched in the brain; AMPK: AMP-activated protein kinase; TSC1/2: tuberous sclerosis protein 1 (hamartin)/2 (tuberin).

- Auch mittels **G-Proteinen** können Signale an das mTOR-System weitergegeben werden. Dabei wird über das Gq-Protein die Phospholipase C (PLC) aktiviert. PLC spaltet in der Zellmembran befindliches PIP<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub> und DAG (Diacylglycerol) spaltet. DAG aktiviert die PKC (Phosphokinase C), welche die AKT direkt oder indirekt über Inhibition von GSK-3 aktivieren kann.
- Die IKK $\beta$  (inhibitorische  $\kappa$ B Kinase- $\beta$ ), eine wichtige downstream gelegene Kinase der TNF $\alpha$ -(Tumornekrosefaktor-alpha)-Signalkaskade, phosphoryliert TSC1 und spielt eine wichtige Rolle in der entzündungsvermittelten Tumor-Angiogenese (Lee et al. 2007).
- Auch die bei der **Embryogenese** essenzielle Wnt (Wingless, Int-1)-Signalkaskade ist mit dem mTOR-System verknüpft und kann eine mTOR-Aktivierung bewirken. Die Wnt-Signalkaskade inhibiert GSK-3, was zur Phosphorylierung von TSC2 und zur Inhibierung von mTORC1 führt (Inoki et al. 2006).

Neben der Rolle als integrales Steuerungselement für den Ablauf anaboler Prozesse hat der TSC1/2 Komplex auch eine wichtige Stellung als zentraler Sensor inne und sorgt dafür, dass diese Prozesse nur bei entsprechend günstigen Umweltbedingungen ablaufen.

So läuft eine Vielzahl von Indikatoren, die auf die Stoffwechsellage schließen lassen, bei der zentralen Leitstelle, dem TSC1/2 Komplex, zusammen:

- Genotoxischer Stress, wie **DNA-Schäden** (Deoxyribonucleic Acid) und Hypoxie werden von dem Tumorsuppressor-Protein53 (p53) wahrgenommen (Feng et al. 2005b). Dabei interagieren die p53- und die mTORs Signalkaskade miteinander und können Zellproliferation und Zelltod koordinieren. (Elkholi, Chipuk 2014). Dabei führen Schäden an der DNA zur Aktivierung von p53, welches über die AMPK (AMP-activated protein kinase) und REDD1 (regulated in development and DNA damage responses 1) innerhalb von Minuten Einfluss auf TSC1/2 nehmen kann.

Darüber hinaus kann die Aktivierung von p53 auch AMPK-unabhängig mTOR inhibieren, indem die mRNA Expression PTENs (Stambolic et al. 2001), als auch die des TSC2 Genes gesteigert und so die mTORC1 Aktivität herunter reguliert wird. Dieser Vorgang benötigt jedoch 12-24 Stunden (Feng et al. 2005b).

- Bei **Hypoxie** sorgt darüber hinaus REDD1 dafür, dass TSC2 aus einer inhibitorischen Verbindung mit dem 14-3-3 Protein entlassen wird und so seine regulierenden Eigenschaften auf mTORC1 ausüben kann (DeYoung et al. 2008). Des Weiteren wirkt Hypoxie über das bestehende Energiedefizit negativ auf mTORC (Schneider et al. 2008)

- Bei einem **Energiedefizit** liegt ein erhöhter AMP/ATP-Quotient vor, welcher über die LKB1 (Liver kinase B1) zu einer gesteigerten Aktivität von AMPK führt, welche wiederum TSC2 aktiviert (Inoki et al. 2003b).

Dabei bleibt zu bedenken, dass die dem TSC 1/2 Komplex vorgeschalteten Enzyme wie AMPK und AKT auch direkten Einfluss auf mTORC1 haben.

Auch Aminosäuren wirken sich auf den Aktivitätsstatus von mTORC1 aus, der AKT-TSC-unabhängig reguliert wird. Verantwortlich dafür ist eine Enzymgruppe Namens Rag (recombination activating gene) (Kim et al. 2008). Dabei stimuliert diese nicht direkt die Kinase-Aktivität von mTORC1, sondern fördern die intrazelluläre Lokalisation von mTOR zu einem Zell-Kompartiment, welches den Aktivator Rheb enthält (Sancak et al. 2008).

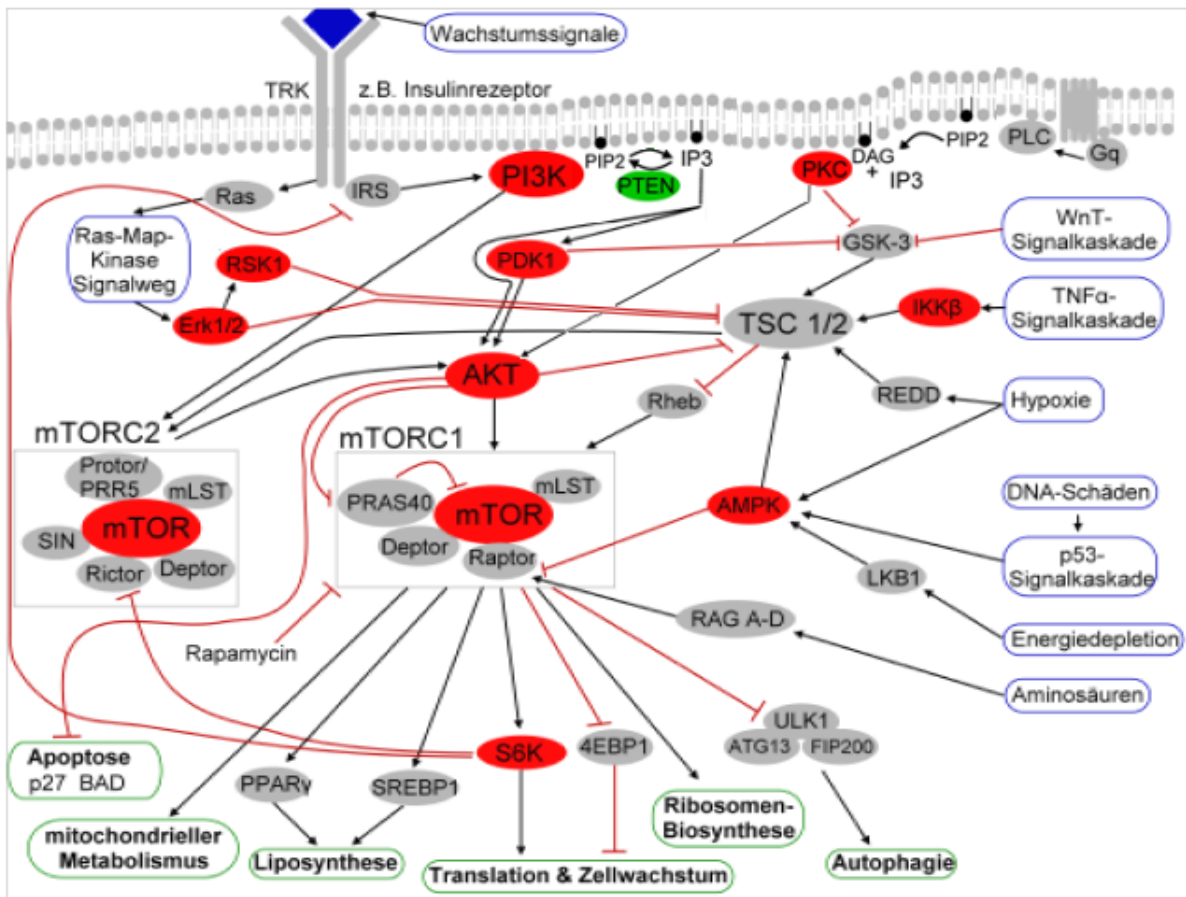
Darüber hinaus sind multiple Regulationsschleifen innerhalb des mTOR-Systems bekannt, von denen jedoch viele noch nicht bis ins letzte Detail verstanden sind:

Es wurde gezeigt, dass die Kinaseaktivität von mTORC2 (an AKT für Ser473) zusammen mit der von PI3K (an Thr308) notwendig ist, um eine maximale Aktivität von AKT zu erreichen (Efeyan, Sabatini 2010). Dies führt über mTOR zur Aktivierung der S6K, welche wiederum über direkte Phosphorylierung von Rictor die mTORC2 Aktivität dergestalt behindert, dass sich negative Auswirkungen auf die Phosphorylierung von AKT zeigen (Dibble et al. 2009).

Weitere negative Rückkopplungen gehen von der aktivierten p70S6 Kinase1 (S6K1) aus. Dabei wird IRS-1 (insulin receptor substrate 1) und PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) durch Phosphorylierung degradiert, was letztendlich zu einer verminderten Aktivierung des PI3K-AKT Weges und somit auch der S6K1 selbst führt (Harrington et al. 2004; Zhang et al. 2007; Huang, Manning 2009).

Über die Regulation von mTORC2 ist nicht sehr viel bekannt. Im Gegensatz zu Nährstoffen können Wachstumsfaktoren mTORC2 beeinflussen (Jhanwar-Uniyal et al. 2015), indem sie förderlich auf die Assoziation von Ribosomen mit mTORC2 wirken. Diese können mTORC2 direkt aktivieren (Zinzalla et al. 2011; Jhanwar-Uniyal et al. 2015) und so die AKT Signalkaskade stimulieren.

Auch der TSC1/2 Komplex soll einen positiven regulatorischen Einfluss durch direkten Kontakt auf mTORC2 nehmen können, wobei Details nicht näher bekannt sind (Huang et al. 2008). Auf diesen Weg kann TSC1/2 sowohl über mTORC1 als auch über mTORC2 positiv auf AKT wirken.



**Abbildung 1.6 Regulation und Interaktion der mTOR Signalkaskade mit anderen Signalwegen**

TRK: tyrosine receptor kinase, IRS: insulin receptor substrate, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, PIP2 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, IP3: inositol-1,4,5-trisphosphate; DAG: diacylglycerol; Gq: G-protein q; PLC: phospholipase C; PDK1: pyruvate dehydrogenase kinase 1; Akt: protein kinase B; PTEN: phosphatase and tensin homolog, ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2; RSK1: p90 ribosomal S6 kinase 1; Ras: rat sarcoma; mTOR: mechanistic target of rapamycin, Deptor: DEP domain-containing mTOR- interacting protein, mLST: mammalian lethal with sec-13 protein 8; PRAS: proline-rich Akt substrate 40 kDa; Raptor: regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin; Rictor: rapamycin-insensitive companion of mTOR; SIN: stress-activated map kinase-interacting protein; Protor: protein observed with rictor 1 and 2; PRR5: proline rich 5 (renal); TSC1/2: tuberous sclerosis protein 1 (hamartin)/2 (tuberin); Wnt: Name zusammengesetzt aus wingless and Int-1; Rheb: ras homolog enriched in the brain; AMPK: AMP-activated protein kinase; GSK-3: glycogen synthase kinase 3; LKB1: liver kinase B1; BAD: Bcl-2-Antagonist of Cell Death; p27: Protein 27; 4E-BP: eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein; S6K1: S6-kinase 1; IKKβ: inhibitor kappa B kinase beta ; REDD: regulated in development and DNA damage responses 1; ULK1: unc-51-like kinase1; ATG13: autophagy-related gene 13; FIP200: focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa, PPARγ: peroxisome proliferator-activated receptor-γ; SREBP1: regulatory element binding protein 1;

rote Ovale: Kinasen; grüne Ovale: Phosphatasen; graue Ovale: weitere Proteine; Pfeil(→):Aktivierung Stoppszeichen (—) Inhibition; blaue Kästen: Umwelteinflüsse bzw. andere Signalkaskaden; grüne Kästen: Effekte, bedingt von der mTOR Aktivierung.

### 1.3.3.1 Aktivierung von mTOR zu p-mTOR

Bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten phosphorylierten mTOR (p-mTOR) handelt es sich um das an der Aminosäure Serin 2448 (Ser2448) phosphorylierte mTOR. Diese

Phosphorylierung wurde über einen Feedbackmechanismus von S6K1 (S6-Kinase 1) durchgeführt. Dabei ist die S6K1 selbst ein Substrat, das von mTORC1 zuvor phosphoryliert und aktiviert wurde (Chiang, Abraham 2005).

Weitere mögliche bekannte Positionen, an denen mTOR phosphoryliert werden kann, sind Threonin 2446 (Thr2446), Ser1261 sowie Ser2481. Bei letzterem handelt es sich um eine Autophosphorylierungsstelle, die über TSC/Rheb vermittelt wird. Auch wenn die Ursachen für die Phosphorylierungen bekannt sind, bleiben viele genauen molekularen Abläufe und die Funktionen dieser Phosphorylierungsstellen weiter im Dunklen (Jacinto 2008). Lediglich bei Ser1261 ist bekannt, dass diese Phosphorylierung eine aktivierende Funktion auf mTORC1 hat und die Voraussetzung für eine weitere Phosphorylierung an Ser2448 und Ser2481 ist (Acosta-Jaquez et al. 2009).

#### 1.3.4 Downstream von mTOR

Die Folgen einer mTOR Aktivierung im Sinne einer Phosphorylierung können als pro proliferative Effekte bezeichnet werden und beeinflussen dabei folgende Abläufe:

Die **Proteinsynthese** wird über die Phosphorylierung von 4E-BP1 reguliert. Phosphoryliert wird es aus der inhibierenden Verbindung mit eIF4E verdrängt und kann die cap-abhängige Translation fördern (Richter, Sonenberg 2005).

Darüber hinaus bewirkt mTOR über die Phosphorylierung der S6 Kinase (S6K) ihre Aktivierung und führt zu einer gesteigerten mRNA-Biosynthese und cap-abhängigen Translation und Elongation. Neben der vermehrten Translation und Aktivierung ribosomaler Proteine (Hay, Sonenberg 2004) soll mTOR durch direkte Stimulation ribosomaler RNA (rRNA) die Ribosomen-Biogenese stimulieren (Laplante, Sabatini 2009).

**Autophagie** ist ebenfalls mTOR reguliert. Liegt ein Nährstoffmangel vor, werden Zellorganellen und Proteinkomplexe autophagisch abgebaut, um wichtige anabole Prozesse wie z.B. die Energieproduktion aufrecht zu erhalten. Für die Autophagie ist ein Proteinkomplex, der aus ULK1 (unc-51-like kinase 1), ATG13 (autophagy-related gene 13) und FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa) besteht von zentraler Bedeutung. mTORC1 kann diesen Komplex durch Phosphorylierung inaktivieren und auf diesem Weg die Apoptose hemmen (Ganley et al. 2009).

Auch die **Lipidsynthese** wird mittels mTOR über die Aktivitätssteigerung von SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1) (Porstmann et al. 2008) sowie von PPAR $\gamma$



(peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) (Kim, Chen 2004) positiv beeinflusst.

Darüber hinaus unterliegen der **mitochondrielle Metabolismus** sowie die mitochondrielle Biogenese der Regulation von mTORC1. Es wurde beobachtet, dass Rapamycin sowohl das mitochondrielle Membranpotenzial, den mitochondriellen Sauerstoffverbrauch und auch den ATP-Spiegel genauso negativ beeinflusst (Schieke et al. 2006) wie die Anzahl der mitochondriellen DNA Kopien und die Aktivität von Genen, die für Proteine des oxidativen Metabolismus codieren (Laplane, Sabatini 2009).

### 1.3.5 Das 4E-binding protein (4E-BP1)

Das 4E-BP (4E-binding protein) nimmt eine zentrale Rolle in Weiterleitung und Umsetzung mTORC1 vermittelter Wachstumssignale ein (Richter, Sonenberg 2005) und stellt einen Negativ-Regulator des Zellwachstums dar (Rousseau et al. 1996). Es reguliert die mRNA Translation von anti-apoptischen Proteine wie z.B. BCL-2 (B-cell lymphoma 2) und c-MYC. Die Steuerung der Translation erfolgt während der Initiationsphase, wenn sich das 5'Ende der mRNA mit dem Ribosom zusammenlagert. Dies wird entscheidend von eIF4E (Eukaryotic initiation factor 4E) gefördert und ermöglicht (Siddiqui, Sonenberg 2015). Erstmals wurde 1990 in Fibroblasten nachgewiesen, dass eine Überexpression von eIF4E zelluläre Transformationen auslösen kann. In nachfolgenden Studien wurden erhöhte eIF4E Spiegel in vielen weiteren Karzinomen festgestellt. Dies stellte eIF4E und seine Regulatoren in den Interessensmittelpunkt zukünftiger gezielter Karzinom-Therapien (Mamane et al. 2006).

4E-BP1 inhibiert den Prozess der Translationskomplex-Zusammenführung, indem es eIF4E reversibel binden und inaktivieren kann (Jia et al. 2012). Dabei steht es selbst unter direkter Kontrolle von mTORC1 (Montero et al. 2012). Un- bzw. hypophosphoryliert liegt 4E-BP1 gebunden an eIF4E und inhibiert seine Funktion. Wird es von mTORC1 phosphoryliert verliert seine Affinität zu eIF4E, welches dann die Proteintranslation initiieren kann (Jia et al. 2012; Proud 2007).

*In vitro* wurden sieben Phosphorylierungsstellen an 4E-BP1 identifiziert: u.a. Thr 37, Thr 46, Ser 65 und Thr 70 (Proud 2004). Die Phosphorylierung an Thr 37 und Thr 46 wird dabei als Startsignal angesehen (Ayuso et al. 2010), denen die als besonders Rapamycin-sensitiv geltenden Phosphorylierungen an Ser 65 and Thr 70 folgen. Jedoch ist noch nicht abschließend die Anzahl an Phosphorylierungen geklärt, die erforderlich ist, um eine Dissoziation von

4E-BP1 und eIF4E herzustellen. Nur so viel scheint klar, es bedarf dazu multiple Phosphorylierungen (Gingras et al. 2001).

### 1.3.6 mTOR im Zusammenhang mit onkologischen Erkrankungen

mTOR ist ein Schlüsselenzym in der Regulation von Zell-Wachstum, -Proliferation und -Differenzierung (Laplanche, Sabatini 2009). Darüber hinaus wird der mTOR Signalkaskade eine bedeutende Rolle in der Regulation der Tumorzelle zugesprochen, wobei sie unerlässlich Bestandteil für die Initiation und Aufrechterhaltung der Mobilität von Tumorzellen, ihrer Invasionsfähigkeit in angrenzende Gewebe sowie für die Bildung von Metastasen ist (Zhou, Huang 2011).

Dass das mTOR System u.a bei Kolon-, Brust-, Harnblasen-, Lungen-, Cervix-, Gastrointestinalen-, Hals-Nacken- und Prostata-Karzinomen sowie bei Lymphomen und Neuroblastomen von großer Bedeutung ist, scheint eine logische Konsequenz zu sein (Mamane et al. 2006).

Dabei bleibt zu berücksichtigen, dass die mTOR Signalkaskade einerseits selbst einige Schlüssel zur Initiation der Zellproliferation in der Hand hält, andererseits aber auch Handlanger vieler weiterer Kaskaden ist, mit der sie in Kontakt steht (s. Abbildung 1.6). Egal von welchem Signalweg initiiert, werden letztendlich viele Tumoreigenschaften über die Aktivierung von eIF-4E vermittelt (Mamane et al. 2006; Mamane et al. 2004).

Um die Schritte der Tumorgenese entschlüsseln zu können, wurde der mTOR Komplex näher betrachtet. Untersuchungen der menschlichen Krebs Genom Datenbank enthüllten dabei eine Reihe verschiedener aktivierender Mutationen im mTOR Komplex (Hardt et al. 2011; Sato et al. 2010; Urano et al. 2007).

Untersuchungen des klarzelliges Nierenzellkarzinoms, dem häufigsten Nierenkarzinom, identifizierten einige Punktmutationen des mTOR-Komplexes. Unter anderem wurden hyperaktivierende Mutationen in der c-terminalen FAT(FRAP-ATM-TTRAP)-Region mTORs ausfindig gemacht. Diese Mutationen führten zu einer verminderten Bindungskapazität der Negativregulatoren Deptor und PRAS40. Dies bedingte eine konsekutive Aktivitätssteigerung von mTORC1 als auch von mTORC2 und verursachte eine gesteigerte Zellproliferation (Ghosh et al. 2015).

Auch Upstream von mTOR wurden in der Signalkaskade beim klarzelligem Nierenzellkarzinom Veränderungen festgestellt. So führte eine Mutation in Rheb zu einer beachtlichen Resistenz gegenüber der Negativkontrolle von TSC1/2 und verursachte letztendlich eine verstärkte mTORC1 Aktivität. Dabei wurde beobachtet, dass diese Mutationen zu keinen Veränderungen der Rapamycin-Sensitivität führten (Ghosh et al. 2015). Aus diesem Grund finden mTOR-Inhibitoren wie z.B. Temsirolimus bei der Therapie des klarzelligem Nierenkarzinoms seit 2007 Anwendung (Meng, Zheng 2015).

Neben Mutationen in mTOR selbst sind jedoch noch wesentlich mehr entscheidende Mutationen in Protoonkogenen wie AKT, PI3K, PKC (Proteinkinase C), RAS oder Tumorsuppressorgenen wie p53, PTEN oder TSC1/2 bekannt, welche die mTOR Signalkaskade als Exekutive benutzen (Agarwal et al. 2015; Guo et al. 2015; Dumstorf et al. 2010; Inoki et al. 2005; Corradetti et al. 2004).

In allen Karzinomsequenzen ist PTEN nach p53 das von Mutationen oder Deletionen meist betroffene Tumorsuppressorgen. Vor allem in Endometriumkarzinomen, Glioblastomen und PCAs wurden häufig Mutationen festgestellt. Neben Veränderungen im PTEN Gen wurden Modifikationen der Expressionshäufigkeit festgestellt, welche die downstream gelegene Kaskade aktivierend beeinflusst. Beobachtete Modifikationen waren Promotormethylierung, transkriptionale Hemmungen, posttranslationale Modifikationen sowie Beeinflussungen mittels mikroRNAs (Guo et al. 2015).

Da die mTOR Signalkaskade in vielen Tumoren überaktiv ist, werden mTOR Inhibitoren nicht nur beim klarzelligem Nierenzellkarzinom angewendet. Auch für Mantelzelllymphome, fortgeschrittene Hormonrezeptor (HR) -positive und HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2) -negative Mammakarzinome, Subependymale-Riesenzell-Astrozytome und Primitiv-Neuroektodermale-Tumore finden heutzutage mTOR Inhibitoren wie Everolimus und Temsirolimus bereits klinische Verwendung (Meng, Zheng 2015).

### 1.3.7 mTOR im Zusammenhang mit der Biologie des Prostatakarzinoms

Beim PCA gibt es ebenfalls Hinweise, dass die mTOR Signalkaskade eine wichtige Rolle in seiner Entstehung einnimmt. Es ist bekannt, dass mTOR und seine aktivierte Form p-mTOR beim PCA vermehrt gebildet werden. Darüber hinaus gibt es Indizien, dass der PI3K/Akt/mTOR Signalweg in 30-50% der PCAs hochreguliert ist (Morgan et al. 2009). Beim metastasierten PCAs waren bei allen untersuchten Geweben Alterationen in diesem (PI3K, RAS/RAF (Rat fibrosarcoma) und RB (Retinoblastom)) Signalwegen zu finden (Taylor et al. 2010).

In verschiedenen experimentellen Modellen induzierte vermehrtes Vorhandensein von eIF4E Malignität. Eine größere Menge an eIF4E kann entweder durch eine gesteigerte Expression oder durch eine vermehrte Phosphorylierung und fehlende Inaktivierung des inhibitorischen 4E-BP1 hervorgerufen werden. In einer immunhistochemischen Untersuchung von 89 Prostatae konnte gezeigt werden, dass beide potenziell zu Malignität führenden Mechanismen gleichzeitig vorlagen, was besonders bei fortgeschrittenen PCAs zu beobachten war (Graff et al. 2009).

Dabei ist jedoch unklar, ob die gesteigerte Proteinexpression durch vermehrte Genablesung, durch eine vermehrte Proteinproduktion oder durch eine optimierte posttranslationale Modifikation zustande kommt. Auch ungeklärt bleibt die Frage, welcher Anteil der erhöhten eIF4E-Expression und der gesteigerten 4E-BP1 Phosphorylierung am gesamten Zellwachstum und an der Proliferation bedingen Signalmenge zugesprochen werden kann.

Auch wenn es bisher noch keine differenzierte Risikoabschätzung gibt, konnte gezeigt werden, dass ein gesteigertes eIF4E- und p4E-BP1 Vorkommen mit einem signifikant reduzierten Patientenüberleben sowie mit der Entstehung androgen unabhängigen Wachstums des PCAs korrelierte (Graff et al. 2009).

Trotz fehlender Berichte über aktivierende mTOR Mutationen beim PCA, gibt es viele Hinweise, dass mTOR vorgeschaltete Parameter ebenfalls mit dem Entstehen und Fortschreiten der Erkrankung assoziiert sind. So ist ein funktioneller PTEN Verlust mit konstitutiv aktivierter AKT sowohl mit einem Tumorprogress, als auch mit der Entstehung eines androgen unabhängigen Wachstums assoziiert und kann schneller zu einer Metastasierung führen (Lotan et al. 2011). Dies kann einerseits an den direkt hemmenden Einflüssen von AKT auf die proapoptischen Proteine BAD (Bcl-2-Antagonist of Cell Death) oder Caspase-9, andererseits an der Aktivierung der mTOR Signalkaskade liegen (Graff et al. 2000; Graff, JR 2002).

Dieser Sachverhalt, Signalkaskaden Crosstalks und Feedback-Loops (s. Abbildung 1.6) veranschaulichen, dass die Unterbindung eines einzelnen Enzyms nicht immer den durchbrechenden Erfolg bringen kann.

In präklinischen Studien mit mTOR Inhibitoren konnten prostatiche intraepitheliale Neoplasien (PIN) zurückgedrängt werden (Majumder et al. 2004) in der Klinik beim Therapieversuch des PCAs mit mTOR-Inhibitoren ließen sich jedoch keine bahnbrechenden Ergebnisse wie bei anderen Tumorentitäten aufzeigen (Vaishampayan et al. 2015; Bitting, Armstrong 2013). Aufgrund der komplexen zellulären Regulationsmechanismen sollten weitere Studien durchgeführt werden, die Kombinationstherapien verschiedener Targets am PCA untersuchen. Dabei sollte das Target „mTOR-Komplex“, als zentrale Schaltstelle dieser Kaskaden ein entscheidender Baustein sein.

Hinsichtlich Diagnostik und Prognostik beim PCA zeigen andere Studien, dass die Verwendung von molekularen Biomarker potenziell möglich und auch erfolgsversprechend scheint. Es wurde von molekularen Veränderungen in der PI3K-AKT Signalkaskade berichtet, die benigne von malignen Prostatazellen unterscheiden und mit einem steigenden Tumorstadium und Tumorgrad sowie mit einem steigenden Risiko für ein biochemisches Rezidiv assoziiert waren (Morgan et al. 2009). Auch konnten Assoziationen zwischen molekularen Markern und Strahlen- (Skvortsova et al. 2008) sowie Chemotherapie-Resistenz (Qian et al. 2010) hergestellt werden. Jedoch sind auch hier weitere Studien zur Steigerung der Aussagekraft wünschenswert.

Trotz dieser Einblicke in die Wichtigkeit der PI3K-AKT Signalkaskade beim PCA haben all diese Erkenntnisse noch keine relevante Bedeutung hinsichtlich Diagnostik, Therapie und Prognostik.

## 1.4 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, an einem Kollektiv, zu dem bereits Daten zur Expression von relevanten Ribonukleinsäuren vorlagen, anhand von immunhistochemischen Untersuchungen die korrespondierenden Proteinexpressionen sowie deren Aktivierungstatus zu ermitteln.

Dabei sollten die zellbiologischen Regulationsmechanismen genauer untersucht werden, mit Hauptaugenmerk auf die lokoregionären Regulationsunterschiede im Prostataraum. Dabei sollte vor allem histologisch benignes, an PCAs angrenzendes Gewebe im Mittelpunkt des Interesses stehen. Zusammen mit Gewebeproben aus Prostatae ohne PCA stellte dies Prostata-Normalgewebe dar. Verhaltensunterschiede zwischen diesem und dem Tumorgewebe sollten ermittelt und analysiert werden.

Es sollte näher untersucht werden, welche lokoregionären Alterationen auf mRNA-Ebene vorlagen und wie die mRNA-Expressionen untereinander korrelierten.

Auf Proteinebene sollte ebenfalls eine genaue Expressionsanalyse - inklusive der Erhebung des Aktivierungsstatus der Parameter - hinsichtlich lokoregionärer Unterschiede erfolgen. Anhand der Analyse der lokoregionären Interaktionen auf mRNA- und auf Protein-Niveau und durch Analyse der transkriptionstranslatorischen Beziehung wurden Hinweise über Regulationsunterschiede im Prostataraum erhofft. Dabei stand vor allem die Frage im Mittelpunkt, auf welchen Ebenen Veränderungen des Expressionsverhaltens auf dem Weg vom benignem- zum Tumorgewebe auftreten.

Durch den Erhalt eines tieferen Einblicks in die potenziellen lokoregionären verschiedenen Regulationsmechanismen des Prostatariums sollten klinische Implikationen abgeleitet werden.

## 2 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit basiert auf einem Datensatz, der im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation am Uniklinikum Tübingen entstanden ist. Dabei wurde bereits auf **mRNA Ebene** das Expressionsmuster von mTOR und 4E-BP1 mittels quantitativer Polymerase Kettenreaktion (PCR) untersucht (Werner 2014). Die vorliegende Arbeit stellt dahingegen Untersuchungen auf **Proteinebene** zur Aufklärung relevanter zellbiologischer Regulationsprozesse an. Letztendlich sollen mRNA- und Proteindaten zusammenhängend betrachtet werden, um weitere Einblicke in die Regulationskaskade der Tumorgenese des PCA zu erlangen.

### 2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Grundlage dieser Dissertation stellte das Patientenkollektiv aus der vorherigen Arbeit dar. Für die Erstellung des endgültigen Studienkollektivs der vorliegenden Arbeit wurde korrespondierend zu jedem Präparat der Vorstudie mindestens eine entsprechende Paraffinprobe bestimmt, welche der Lokalisation der damaligen Entnahmestelle entsprechen sollte. Darüber hinaus wurde das Kollektiv nach folgenden Kriterien ausgewählt (s. Kapitel 2.1.1 Einschlusskriterien und 2.1.2 Ausschlusskriterien):

Das auf diese Art und Weise erstellte Kollektiv wurde um weitere Patienten zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kollektiv ergänzt. Dazu wurden aus einem weiteren Studienkollektiv, welches histopathologisch nach Epstein und Mitarbeitern (Epstein et al. 2009) nachbefundet worden war, konsekutiv Patienten nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- Radikale Prostatektomie (RPE) erfolgt
- Vorliegen klar definierter und mittels Folienstiftmarkierung gekennzeichnete Tumorareale auf HE gefärbten Großflächen-Schnittserien
- Gleason Score zwischen 6 und 10
- Ausreichend großes Tumorareal, um mindestens zwei Gewebezylinder entnehmen zu können
- Vorhandensein von ausreichendem - an das Tumorareal angrenzende - benignen Gewebe

Das sich daraus ergebende Gesamt-Patientenkollektiv wird in Tabelle 1 genauer charakterisiert, welche zwischen Prostatakarzinom-Patienten und Patienten ohne PCA unterscheidet.

	Patienten ohne PCA	Tumorpatienten
Anzahl	21	105
Alter bei OP (in Jahren)	68,7	64,8
OP-Art:		
Zystektomie	8	0
TUR-P	7	0
TVP	6	0
Prostatektomie	0	105
Resektionsstatus:		
R0	-	81
R1	-	23
Rx	-	1
PSA [ng/ml] (Anzahl untersuchter Pat.)	9,73 (10)	11,17 (98)
Tumorstadium		
pT 2a	-	13
pT 2b	-	1
pT 2c	-	55
pT 3a	-	19
pT 3b	-	14
pT 4	-	3
Lymphknotenbefall:		
N0	-	97
N1	-	8
Gleason-Score (GS)		
6	-	12
7a	-	33
7b	-	22
8	-	12
9	-	24
10	-	2

**Tabelle 1: Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit**

Unterscheidung in Tumorpatienten und Patienten ohne PCA, TUR-P: Transurethrale Resektion der Prostata, TVP: transvesikale Prostata Adenomenukleation.

Verwendete Abkürzungen: OP: Operation, TUR-P: Transurethrale Resektion-Prostata, TVP: Transvesikale Prostatektomie, PSA: Prostataspezifisches Antigen, GS: Gleason Score, Pat: Patienten



### 2.1.1 **Einschlusskriterien**

Die in das Studienkollektiv aufgenommenen Patienten mussten als Voraussetzung für die Rekrutierung die untenstehenden Kriterien erfüllen:

- Vorliegen eines Adenokarzinoms der Prostata mit Gleason 6-10 **oder**
- Patienten ohne Prostatamalignom-Erkrankung (benigne Referenzgruppe) bei denen jedoch Prostatagewebe bei der Durchführung einer TUR-P (Transurethrale Resektion der Prostata) gewonnen wurde.
- Bei Patienten die bereits Teil des Patientenkollektives der Vorstudie von Werner waren (Werner 2014), war es erforderlich, dass ausreichend äquivalente Paraffin-Gewebeprobe vorhanden waren. Wurden z.B. von einem Patienten mRNA Daten des Tumorgewebes erhoben, so war es essentiell, dass noch genügend Tumorgewebe asserviert war um daraus einen Tissue Microarray generieren zu können. Dies war Voraussetzung um die Beziehung der bereits erhobenen mRNA-Daten zur Proteinexpression untersuchen zu können. Damit war es möglich Erkenntnisse über die Regulation der mTOR-Signalkaskade im Prostataraum gewinnen zu können.

Darüber hinaus mussten alle folgenden Bedingungen zutreffen:

- Betroffener war Patient in der Urologie des Universitätsklinikums Tübingen
- Vorliegende Einverständniserklärung zur Gewebeasservation des Patienten
- Stattgefundene Operation zwischen 01/2008 und 12/2010
- Alter bei Operation zwischen 40 und 85 Jahren
- Vorliegen eines histopathologischen Befundberichts
- Sofern möglich, initialer bzw. präoperativer PSA-Wert

### 2.1.2 **Ausschlusskriterien**

Um unter anderem Störfaktoren zu eliminieren, welche potenziell Einfluss auf die Testresultate haben könnten, wurden folgende Patienten nicht in die Studie eingeschlossen:

- Patienten mit bekanntem Zweitmalignom (Ausnahme Harnblasenkarzinom (HBCa))
- Patienten mit uneindeutiger Histologie z.B. aufgrund von Artefakten

Darüber hinaus konnten keine Patienten berücksichtigt werden, die alle genannten Kriterien erfüllten, jedoch einer Teilnahme in der Studie widersprachen.

## 2.2 Ablauf der Rekrutierung des Patientenmaterials

Die Gewinnung des Patientenmaterials erfolgte intraoperativ. Dabei handelte es sich um Resektate, die zur pathologischen Aufbereitung routinemäßig in die Pathologie übersandt wurden. Das mittels TUR-P (transurethrale Resektion der Prostata) gewonnene Material wurde in herkömmliche Standardkassetten in Paraffin eingebettet. Die Prostatektomie-Präparate wurden fachgerecht in Apex-parallele Schnitte geschnitten. Sofern keine Großflächenschnitte erstellt wurden, wurden die Resektate in Quadranten unterteilt und ebenfalls in Paraffin eingebettet. Zur weiter folgenden histopathologischen Befundung wurde von jedem Paraffinblock eine HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) erstellt.

Dank der in der Vorstudie exakten Beschreibungen der verwendeten Präparate war es durch genaue Sichtung der histopathologischen Befundberichte und durch gedankliche räumliche Anordnung der erstellten Routine-Paraffinblöcke möglich, die entsprechenden Paraffinproben zu bestimmen, welche der Lokalisation der damaligen Entnahmestelle entsprachen.

Nach erfolgter Einweisung in das Archiv der Pathologie wurden die zu den Paraffinblöcken gehörenden HE-Schnitte asserviert. Unter dem Mikroskop wurden diese näher betrachtet und auf ihnen je zwei bis drei Areale mit Folienstift markiert - „gecircelt“. Diese Markierungen beinhalteten das entsprechende Gewebe des Patienten, welches auch in der Vorstudie Verwendung fand. Tumorareale erhielten eine rote, benigne Areale eine grüne Umrandung. Auf diese Art und Weise gut kenntlich gemacht, konnten sie durch einen Facharzt der Pathologie schnell auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

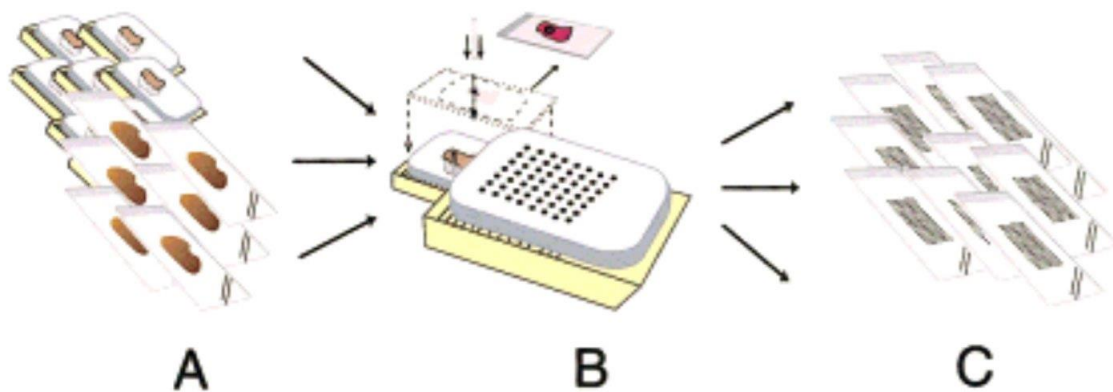
Nach vollzogener Verifikation konnten Tissue Micro Arrays (TMAs) erstellt werden (s. Kapitel 2.3 Die Tissue Microarray Technik), von welchen nach Fertigstellung wiederum selbst HE-Schnitte angefertigt wurden, um abermals zu verifizieren, ob das erforderliche Gewebe der Patienten auch auf den entsprechenden Stellen des Arrays zu finden war. Nach erfolgten Korrekturen und beendetem Verifikationsprozess erfolgten die immunhistochemischen Färbungen (s. Kapitel 2.4.1 Durchführung der Immunhistochemischen Färbungen).

## 2.3 Die Tissue Microarray Technik (TMA)

### 2.3.1 Allgemeine Aspekte

Die Tissue Microarray Technik erlaubt die schnelle simultane Untersuchung einzelner Parameter (DNA, RNA oder Proteinen) in einer hohen Anzahl verschiedener Gewebeproben, welche den unterschiedlichsten Lokalisationen entstammen können (Nocito et al. 2001).

Bis zu 1000 Gewebezylinder können in einem Empfänger-Paraffinblock gestanzt werden, welcher am Microtom in bis zu 200 ca.4-8µm dicke Scheibchen geschnitten werden kann (Kramer et al. 2007). 200 verschiedene „Subjects of Interest“ könnten so in 1000 verschiedenen Gewebeproben zeitgleich betrachtet werden (s. Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1 Übersicht über die Herstellung eines Tissue-Microarrays (TMAs)**

**A)** Bis zu 1000 verschiedene Gewebe Paraffinblöcke dienen als Ausgangspunkt. **B)** Von ihnen werden kleine Gewebezylinder entnommen, welche in einen nativen Paraffinblock gesetzt werden. **C)** Vom fertigen TMA können bis zu 200 4-8µm dicke Schnitte gewonnen und simultan auf unterschiedliche Protein-Marker untersucht werden.

Abbildung aus (Nocito et al. 2001)

Bei der TMA-Herstellung muss zwischen automatischer und manueller Herstellung unterschieden werden, da bei manueller Applikation die mögliche Anzahl verschiedener Probestanzen auf 120 Stück sinkt (Kramer et al. 2007). Jedoch bleibt zu bedenken, dass mit sinkender Anzahl der Gewebezylinder im Paraffinblock sowohl der Durchmesser der Zylinder als auch der Abstand von Zylinder zu Zylinder zunehmen, was das Risiko eines Gewebeerlustes beim Schneiden der TMAs vermindert.

Die TMA-Technik bietet den Vorteil, dass große Patientenkollektive schnell evaluiert werden können, Störgrößen durch die simultane standardisierte Färbung minimiert werden, verschiedenste Parameter an einem Patientenkollektiv untersucht werden können und dabei nur einen minimalen Schaden im Donor-Block entsteht, welcher weiterer Diagnostik zugänglich bleibt.

Die TMA-Technik wurde erstmals Jahre 1998 von Kononen und Mitarbeitern (Kononen et al. 1998) erwähnt, welche erfolgreich verschiedene Biomarker im Mamma-Karzinom untersuchten.

Bei urologischen Präparaten ist die TMA-Technik ebenfalls etabliert - auch beim PCA - im Besonderen bei der Entschlüsselung Zell-Zyklus assoziierter Pathways und alternativer Regulationsmechanismen in der PCA-Progression (z.B. Halvorsen et al. 2003)

### 2.3.2 Technische Durchführung

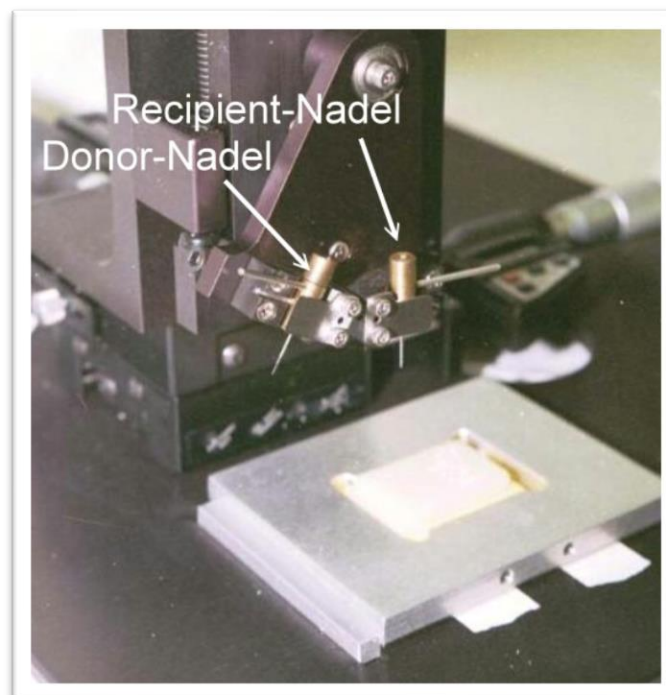
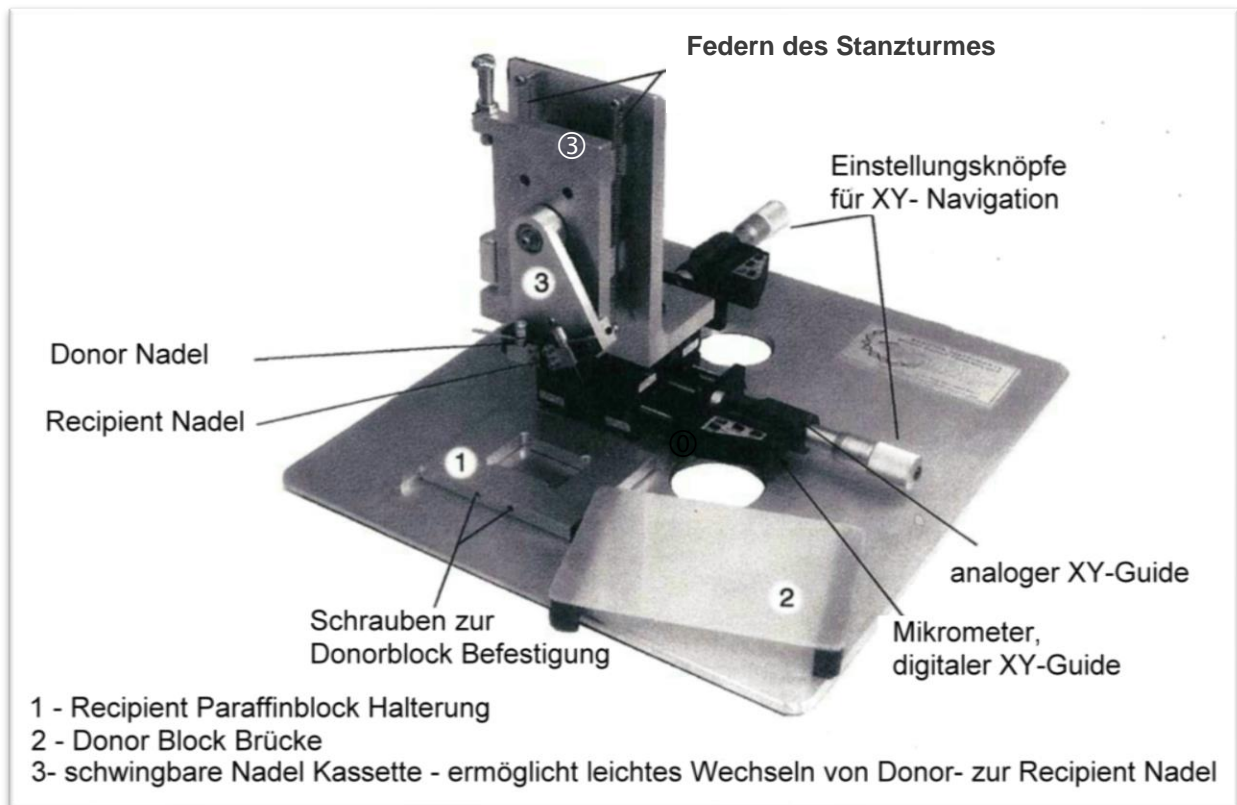
Für die Herstellung der TMAs wurde der Manual Tissue Arrayers (MTA-1) der Firma Beecher Instruments (Beecher Instruments, Inc., 820 Hummingbridge Court, Sun Prairie, WI, USA benutzt (s. Abbildung 2.2 ).

Um einen TMA erstellen zu können, war es erforderlich, genau zu wissen, wo sich die „Area of interest“ befindet. Dafür wurden, sofern nicht bereits vorhanden, HE Schnitte der Blöcke angefertigt, auf denen die gewünschten Areale eingezeichnet wurden (s.o.).

Zu Beginn wurde der leere Recipient Paraffinblock vorbereitet, indem er mit einem Microtom glatt gehobelt wurde um dann in die entsprechende Vorrichtung (Recipient Paraffinblock Halterung) des Manual Tissue Arrayers eingeschraubt werden zu können. Mithilfe einer Recipient Nadel wurde aus dem naiven Paraffinblock eine Paraffin Stanze entnommen, sodass eine zylinderförmige Aussparung entstand.

Daraufhin wurden die gecancelten korrespondierenden HE-Schnitte auf die Donor-Paraffinblöcke gelegt - „gematched“ - und so die „Area of interest“ auf dem Paraffinblock detektiert. Aus diesem wurde mit der etwas dünneren (ca. 1,3 mm im Durchmesser messenden) Donor Nadel ein Gewebszylinder entnommen, welcher in den ausgestanzten Zylinder des Paraffin-Recipient Blocks gesetzt wurde.

Oft waren die aus dem Donor-Block gestanzten Zylinder nicht lang genug, um die ganze Höhe im Recipient-Block auszufüllen. War dies der Fall, wurden weitere Stanzen des gleichen Gewebes in den Stanzzylinder des Recipient-Blocks gesetzt bis dieser aufgefüllt war. Dieses Vorgehen erhöhte die Qualität des TMAs, weil dadurch auch noch in unteren Schichten von allen Zylindern Gewebe vorhanden war und somit mehr Schnitte von einem TMA gewonnen werden konnten.



**Abbildung 2.2 Aussehen des Tissue Microarrayer (MTA-1)**

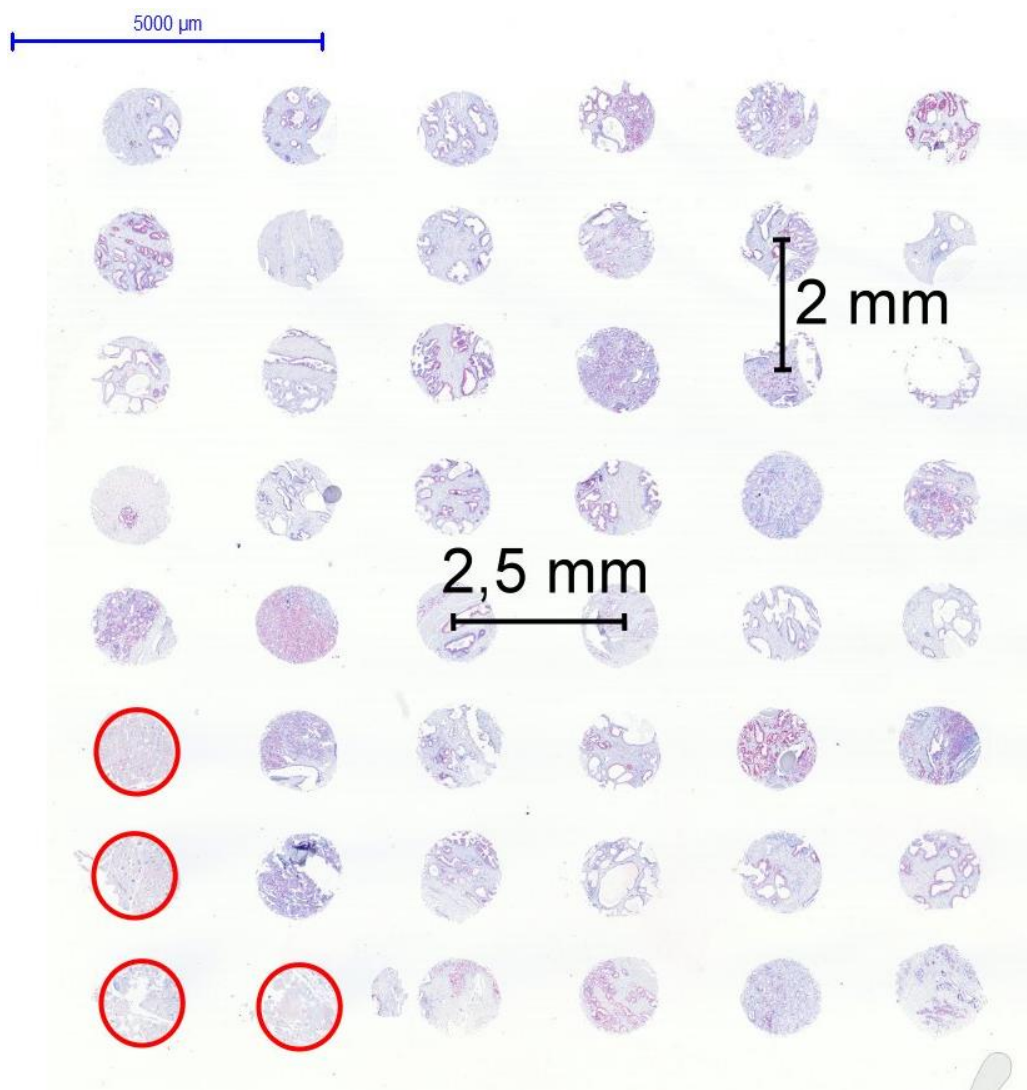
Modifizierte Abbildungen aus dem Instruction Manual des MTA-1, Beecher Instruments, Inc., 820 Hummingbridge Court, Sun Prairie, WI, USA.

**oben:** Übersicht über die Funktionen des MTA-1

**unten:** nähere Darstellung des gefederten Stanzturmes mit der schwenkbaren Nadel Kasette mit Donor- und Recipient-Nadel. Der TMA-Paraffinblock ist in der vorgesehenen silbernen Halterung eingespannt.

Um eine spätere Zuordnung der Patienten zu den entsprechenden Gewebezylindern des TMAs zu ermöglichen, wurde für jeden Array ein genauer Belegungsplan – eine Array Map – erstellt. Dieser gab Auskunft über die Pathologienummer des Patienten, die verwendete Blocknummer und die Art des eingebrachten Gewebes. Er enthielt zusätzlich die Angabe, ob mehrere kleine Donor Gewebezylinder in einer Recipient-Stanze gestapelt wurden.

Um später auf den gefärbten Schnitten eine Orientierung zu haben, wurde als Landmarke in jeden TMA Paraffinblock in die untere linke Ecke aus Schweinemuskel ein „L“ eingebracht (s. Abbildung 2.3). Damit konnte der Belegungsplan zweifelsfrei dem TMA zugeordnet werden.



**Abbildung 2.3 Immunhistochemisch gefärbtes Schnittpräparat eines TMA Blocks**

Übersicht über ein 5µm dickes Schnittpräparat eines TMAs, auf welchem sich 48 Gewebezylinder in einem Abstand (Zentrum zu Zentrum) von 2,5mm auf der Abszisse bzw. 2,0mm auf der Ordinate befinden. Im linken Eck wurde (hier rot umrandet) als zukünftige Orientierungshilfe eine „L“ Landmarke aus Schweinemuskelgewebe eingesetzt.

Von jeder Gewebeprobe wurden mindestens zwei Zylinder in den Recipient-Block gestanzt, wobei die Zentren der Zylinder einen Abstand von 2,5 mm auf der Abszisse und 2,0 mm auf der Ordinate aufwiesen (s. Abbildung 2.3). Auf diese Art entstanden 9 TMA-Paraffinblöcke, welche insgesamt 437 Gewebezylinder beinhalteten.

### **2.3.3 Erstellung der Schnittpräparate und der HE Färbung**

Um das Risiko eines Gewebeverlustes zu verringern, wurden die neu erstellten TMA-Paraffinblöcke auf einen Objektträger aufgeschmolzen. Mit einem Mikrotom (Rotationsmikrotom 1512, Leitz, Wetzlar, Deutschland) wurden von den Blöcken anschließend 5µm dicke Schnitte geschnitten, die zur Glättung in ein warmes Wasserbad (TFB 45, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) überführt wurden. Daraufhin wurden die Schnitte auf einen Superfrost-Plus-Objektträger aufgezogen und zur Trocknung über Nacht bei 37°C in einen Wärmeschrank (ED 35, WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland) aufbewahrt.

Es erfolgte die Anfertigung einer Routine HE-Färbung der Schnitte. Anhand der TMA-Belegungspläne konnte mit Hilfe eines erfahrenen Pathologen der Erfolg der TMA-Herstellung verifiziert werden. Akzidentielle Verfehlungen der „Area of interest“ wurden detektiert und behoben.

## 2.4 Immunhistochemie

### 2.4.1 Allgemeine Aspekte

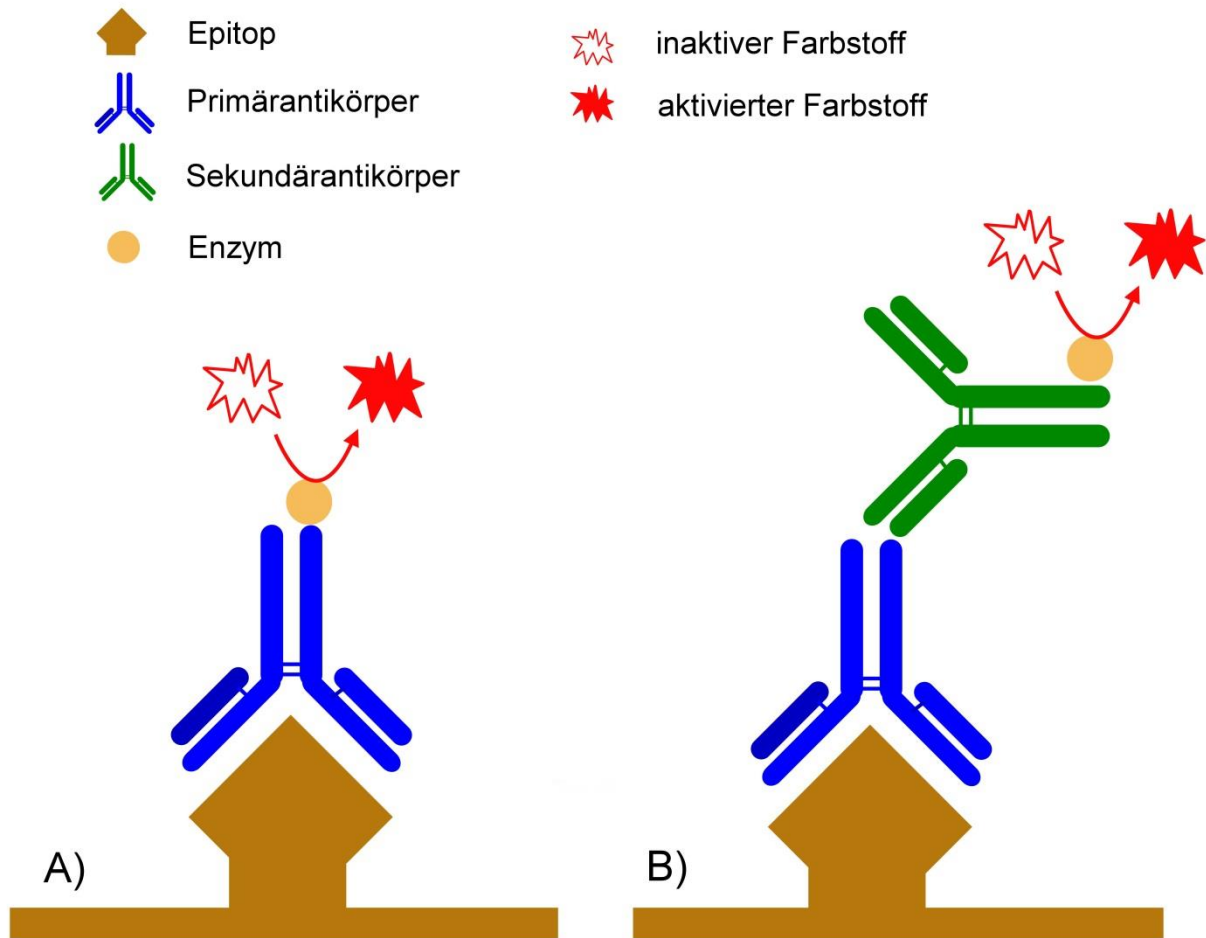
Möchte man eine Tumorregulationskaskade genauer untersuchen, so sollte einerseits mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) die Menge der transkribierten mRNA festgestellt werden (was in der Vorstudie geschah), andererseits muss betrachtet werden wie oft diese transkribierte mRNA in ein Protein translatiert wird. Für Letzteres findet die Immunhistochemie (IHC) Verwendung.

Die IHC verfolgt das Ziel, bestimmte Epitope, welche einen Teil eines speziellen Antigens darstellen, mithilfe von daran bindenden Antikörpern nachzuweisen und sichtbar zu machen. Letztendlich soll in Arealen in denen die Epitope verstärkt vorkommen, ein vermehrtes Färbesignal generiert werden, wohingegen die Areale, in denen diese Epitope nicht vorkommen, ungefärbt bleiben sollen. Das Färbesignal entsteht dabei mithilfe von Nachweissystemen, wobei zwei Methoden unterschieden werden:

der direkte Nachweis, bei dem die antigen-bindenden Antikörper direkt an ein Enzym gebunden sind und der indirekte Nachweis. Dabei bindet ein weiterer sekundärer, Enzym gekoppelter Antikörper spezifisch das Fc-Segment (Fragment crystallisable) des primären antigen-gebundenen Antikörpers.

Durch Applikation einer Farbstoff Vorstufe, welche durch die Antikörper gekoppelten Enzyme zu einem sichtbaren Farbstoff umgewandelt wird, werden die Antikörper-Antigenkomplexe sichtbar gemacht (s. Abbildung 2.4).





**Abbildung 2.4 Darstellung des Prinzips der Immunhistochemie**

- A) Direkte Immunhistochemie: Das die Färbung sichtbar machende Enzym ist an den Primärantikörper gekoppelt.
- B) Indirekte Immunhistochemie: Das die Färbung sichtbar machende Enzym ist an den Sekundärantikörper gekoppelt, der den Primärantikörper detektiert.  
Selbst erstellte Abbildung.

#### 2.4.1 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Bei der angewendeten Untersuchungsmethode der TMAs handelte es sich um die indirekte Immunhistochemie. Dabei kam vorrangig das EnVision™ System zum Einsatz, welches auf die Verwendung Biotin basierender sekundärer Antikörper verzichtet. Biotin, das auch endogen im Gewebe vorkommen kann, würde zu einer starken unspezifischen Hintergrundfärbung führen. Das EnVision™ System basiert dabei auf einer indirekten immunhistochemischen Polymerkonjugat-Methode, wobei Sekundäre-AK mit Anti-Maus und Anti-Kaninchen Ig-Spezifität eingesetzt werden (Kumar, Rudbeck 2009).

Die folgenden drei verwendeten Antikörper wurden von der Firma Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA) erworben:

- mTOR (7C10) #2983, färbt nach Herstellerangaben alles vorhandene mTOR, somit auch das vorhandene phosphorylierte mTOR.
- p-mTOR Ser2448 (49F9) #2976, färbt nach Herstellerangaben alles an Serin2448 phosphoryliertes p-mTOR. An Serin2481 autophosphoryliertes p-mTOR wird dabei nicht explizit gefärbt.
- 4E-BP1 (53H11) #9644 färbt nach Herstellerangaben alles vorhandene 4E-BP1, somit auch das vorhandene phosphorylierte 4E-BP1

Zur IHC von p-4E-BP1 wurde zuerst der Antikörper Anti-phospho-4E-BP1 (Thr70) clone EPR654(2)AY der Firma Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) verwendet, mit welchem sich auch nach mehrfachen Versuchen keine Ergebnisse erzielen ließen. Letztendlich wurde der Antikörper 4E-BP1 (Phospho-Thr70) (Catalogue No.: abx012666) der Firma Abnova (Abnova, Cambridge, Vereinigtes Königreich) erfolgreich verwendet, welcher an Threonin70 phosphoryliertes 4E-BP1 detektiert.

Bei allen vier Primärantikörpern handelte es sich um monoklonale Kaninchenantikörper, welche bereits für in Formalin fixierte, paraffinierte Gewebe etabliert waren.

Die Färbeprotokolle der Antikörper der Firma Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA) unterschieden sich nur in wenigen Details voneinander. Im Folgenden werden diese sofern nicht explizit anders erwähnt zusammen betrachtet. Das Färbeprotokoll der p-4E-BP1 AK der Firma Abnova (Cambridge, Vereinigtes Königreich) wies größere Unterschiede zu den anderen Färbeprotokollen auf und wird getrennt betrachtet aufgeführt.

Alle Antikörper wurden, wie vom Hersteller empfohlen bei -20°C aufbewahrt und mussten vor Start der immunhistochemischen Färbung (IHC) auf Raumtemperatur (21°C) aufgewärmt werden.

Zu Beginn war es erforderlich das Paraffin von den Schnitten zu entfernen. Ein 30-minütiges Abschmelzen in einem Wärmeschrank (ED 35, WTB Binder/Tuttlingen) bei 58°C legte dabei den Grundstein, drei 10-minütige Weiterbehandlungen mit Xylol lösten verbliebene Paraffinreste. Anschließend erfolgte die Rehydrierung, wobei eine absteigende Alkoholreihe mit 100% Ethanol (2x7 Minuten), 96% Ethanol (2x7 Minuten) und 70% Ethanol (1x7 Minuten) verwendet wurde. Die TMAs, welche mit den Cell Signaling Antikörper gefärbt wurden, wurden 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Im Falle der p-4E-BP1 IHC wurde dahingegen eine 30-minütige Behandlung mit 3%igem Wasserstoffperoxid durchgeführt. Dies

diente der Blockung der endogenen Peroxidase-Aktivität. Anschließend wurden die TMAs mit Tris-buffered saline with Tween® 20 (TBST)-Pufferlösung gewaschen, welche sich im Falle von der p-4E-BP1 IHC aus 0,05 mol Trishydroxymethylaminomethan, 0,15 mol NaCl und 0,1 % des Emulgators Tween 20 zusammensetzte.

Darauf wurde eine Demaskierung durchgeführt, um die bei der Paraffin-Fixierung entstandenen Aldehyd-Quervernetzungen zu lösen. Diese würden sonst potenzielle Antigen-Bindungsstellen verhüllen, was ein schwächeres weniger spezifischeres Färbeergebnis zur Folge hätte. Die Demaskierung erfolgte durch Kochen in einer Citrat-Puffer-Lösung (pH 6,0) in der Mikrowelle (Moulinex Micro Chef MO 500) bei 600 Watt, wobei die Kochzeit im Falle von p-mTOR und 4E-BP1 30 Minuten, im Falle von mTOR 20 Minuten und im Falle von p-4E-BP1 15 Minuten betrug.

Nach 30-minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Färbungen jeweils zweimal für 5 Minuten in TBST gewaschen. Im Gegensatz zur TBST die für die p-4E-BP1 Färbung benutzt wurde bestand die für die Antikörper der Firma Cell Signaling verwendete TBST aus 0,05 mol Trishydroxymethylaminomethan, 0,3 mol NaCl und 0,1 % Tween 20.

Die TMAs welche mit den Cell-Signaling Antikörpern gefärbt worden waren, wurden mit 4-8 Tropfen Dualblock versetzt (Dual Endogenous Enzyme Block, Dako S2003, Dako, Glostrup, Dänemark) und damit 10 Minuten lang inkubiert. Diese Maßnahme sollte unspezifische Reaktionen, wie sie z.B. durch endogene alkalische Phosphatasen oder Gewebeperoxidasen geschehen, verhindern und somit ein Hintergrundrauschen unterbinden.

Danach wurden die TMA Antikörper zweimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen. Über Nacht erfolgte darauf die Inkubation mit den Primärantikörpern bei 4°C. Dabei wurden die Antikörper

- mTOR (7C10) #2983 1:25 verdünnt
- p-mTOR Ser2448 (49F9) #2976 1:50 verdünnt und
- 4E-BP1 (53H11) #9644 1:100 verdünnt.

Das verwendete Verdünnungsmedium war das der Firma Dako (Dako, Glostrup, Dänemark) bezogene Dako Diluent S S0809. Im Falle der p-4E-BP1 IHC fand eine 1:75 Verdünnung mit dem Verdünnungsmedium Dako Real Diluent (Dako, Glostrup, Dänemark) Verwendung.

Am nächsten Tag wurden alle TMAs dreimal für 5 Minuten in der jeweiligen TBST-Lösung gewaschen, bevor die sekundären Link-Antikörper appliziert wurden. Nach den Waschsritten wurde im Falle der Cell Signaling Antikörper das EnVision G/2 System AP Testkit (Dako, Glostrup, Dänemark) mit dem Code K5355 zur Sichtbarmachung der Primärantikörper eingesetzt. Der Sekundärantikörper ist sowohl für Rabbit- als auch für Maus-Primärantikörper

geeignet und wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuten Waschschriffen erfolgte die Inkubation mit einem mit alkalischer Phosphatase markierten Amplifikations-Polymer (ENHACER) um den sekundären Antikörper zu verstärken. Im Falle von p-4E-BP1 erfolgte die Detektion des Primärantikörpers mit dem Testkit ADVANCE HRP (Dako, Glostrup, Dänemark) mit dem Code K4069, der ebenfalls einen Sekundärantikörper enthält, welcher sowohl gegen Rabbit- als auch gegen Maus-Antikörper gerichtet ist. Nach erneuten Waschschriffen folgte die Inkubation mit einem Meerrettich-Peroxidase (HRP) polymerisierten Antikörper für 30 Minuten, bevor abermals drei 5-minütige Spülungen mit TBST durchgeführt wurden.

Anschließend wurden die TMAs in Farbsubstrate eingelegt, wobei es sich im Falle der Cell-Signaling IHC um Permanent Red Arbeitslösung (1000µl Permanent Red Substrat und 10µl Permanent Red Chromogen), im Falle der p-4E-BP IHC um Liquide DAB (3,3'-Diaminobenzidine) + Substrate ImmPACT (Vector), das aus 1000µl Puffer und 30µl des Chromogens DAB bestand und im Falle des Testkits ADVANCE um das DAB-Substrat ImmPACT (Vector/Linaris, SK-4105) handelte. Dabei transformierten die Enzyme, welche an die Sekundärantikörper gebunden waren, die applizierten Farbstoffe in eine kräftige Rot-Färbung. Im Falle der p-4E-BP1 IHC kam eine braune Färbung zum Vorschein.

Die Inkubationszeit betrug im Falle von p-4E-BP1 5 Minuten, im Falle von mTOR 7 Minuten, im Falle von p-mTOR 9 Minuten und im Falle von 4E-BP1 10 Minuten. Danach wurde die Farbe 2x5 Minuten in destilliertem Wasser ausgewaschen, bevor eine Gegenfärbung vorgenommen wurde. Es handelte sich um die Hämatoxylin-Färbung nach Meyer, die für 40 Sekunden durchgeführt wurde. Lediglich bei p-mTOR betrug die Färbezeit 60 Sekunden. Das überschüssige Hämatoxylin wurde mit destilliertem Wasser abgewaschen und daraufhin für 7 Minuten mit Leitungswasser gespült. Sein höherer pH-Wert färbte die Präparate leicht blau.

Abschließend wurden die TMAs, bei welchen die Cell-Signaling AK Anwendung fanden, mit dem Eindeckmittel Aquatex (Merck, Darmstadt) konserviert. Die TMAs, die mit Abbexa AK gefärbt worden waren, wurden dehydriert (2x3 Minuten mit 96% Ethanol, 2x5 Minuten mit 100% Ethanol und 3x5 Minuten mit Xylol) anschließend mit dem Eindeckmittel VectaMount™ Permanent Mounting Medium (Vector Laboratories Inc, CA, USA) konserviert und abschließend mit einem Deckglas versiegelt.

#### 2.4.2 Verifikation der Antikörper durch Positiv- und Negativkontrollen

Um die erworbenen Antikörper vor der Anwendung an den Prostata-TMAs auf ihre Funktionstüchtigkeit zu überprüfen wurden Positiv- und Negativkontrollen an Testgeweben durchgeführt.

Für die Durchführung von Positivkontrollen wurden Gewebe von Karzinomen verwendet von denen bekannt war, dass diese das gewünschte Protein stark exprimieren (z.B. Mamma- oder hepatozelluläre Karzinome exprimieren viel mTOR). Eine IHC wurde an diesen Geweben durchgeführt um dann lichtmikroskopisch überprüft, ob der spezifische Antikörper funktioniert und sein Target gebunden hat.

Um unspezifische Anfärbungen auszuschließen wurden Negativkontrollen durchgeführt. Dabei wurden ebenfalls Gewebe verwendet von denen bekannt ist, dass das gewünschte Target-Protein stark exprimiert wird. Bei der Durchführung des Färbeprotokolls wurde jedoch auf den primären Antikörper verzichtet. War die Negativkontrolle erfolgreich, so konnte bei der lichtmikroskopischen Überprüfung keine Färbung festgestellt werden.

#### 2.4.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Nachdem die IHCs erstellt worden waren, wurden sie bei 2-8°C gelagert, bis mit der Auswertung begonnen wurde. Die Auswertung der Färbungen wurde dabei nicht am Mikroskop, sondern am Computer durchgeführt. Dafür wurden die IHCs p-mTOR, 4E-BP1, p-4E-BP1 in das Pathologische Institut der Universität Tübingen gebracht und mit freundlicher Unterstützung der Mitarbeiter des Institutes mit dem Zeiss MIRAX SCAN (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) eingescannt. Die Größe der Schnitte lag zwischen 1,26 GB und 2,95 GB. Mittels der Software Pannoramic Viewer (3DHistech Kft, Budapest, Ungarn) erfolgte die Begutachtung der eingescannten Schnitte.

Im Falle der mTOR Färbung erfolgte das Einscannen am Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart. Dabei wurde der Leica Slide Scanner SCN400 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) verwendet. Die Größe der eingescannten Schnitte variierte zwischen 374 MB und 821 MB. Für die Betrachtung wurde die Software Aperio ImageScope (Aperio Technologies, Vista, CA, USA) benutzt.

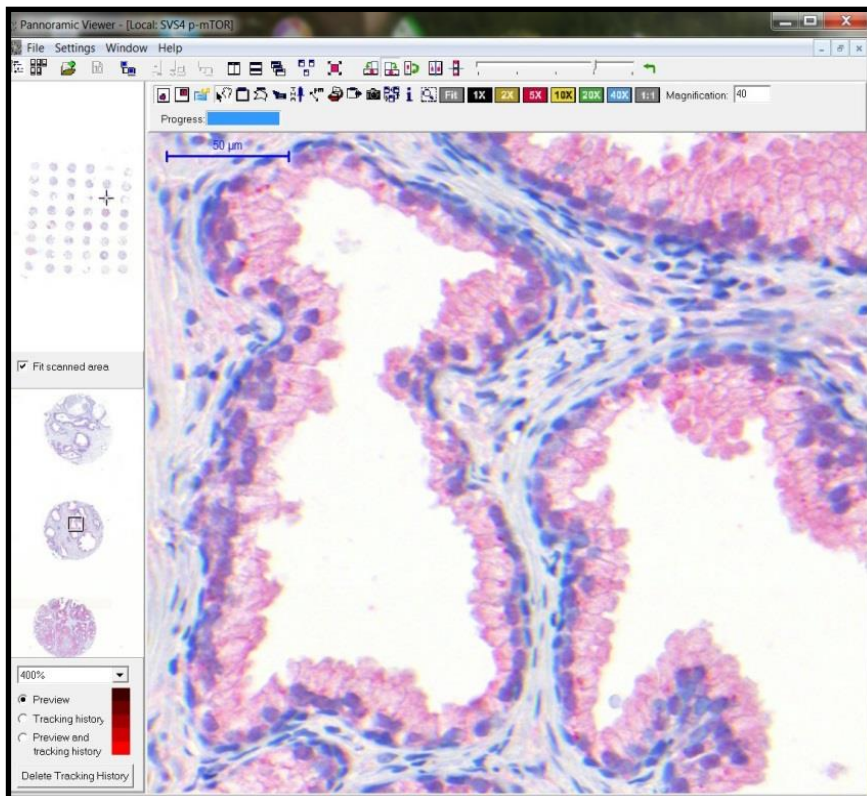
Die Auswertung wurde auf Auswertungsbögen festgehalten, wobei es sich um A3 Ausdrücke der Array Maps handelte. Damit konnte auf den TMAs die Reihenfolge der Gewebezylinder, welche sich als Dots darstellten, zweifelsfrei den Auswertungsbögen zugeordnet werden. Die

Beurteilung erfolgte anonymisiert. Der ermittelte Färbe Score (Zahlenwert) wurde auf den Array-Maps festgehalten, wobei jede IHC zweimal unabhängig voneinander ausgewertet wurde. Jedem Dot wurde abschließend ein Score zugeteilt, der aus den Mittelwerten der beiden Auswertungs-Durchläufe berechnet wurde. Unter diesen Aspekten wurden alle Dots ausgewertet.

#### **2.4.4 Objektivierung und Operationalisierung der immunhistochemischen Färbungen**

Um einen Überblick über die unterschiedlichen Färbeintensitäten der einzelnen Färbungen zu bekommen wurde jeder Dot der TMAs gründlich begutachtet. Durch genaue Observation entwickelte sich sukzessive ein Gefühl für die verschiedenen Färbeintensitäten. Vor dem inneren Auge entstand eine Färbeskala. Um diese Skala objektivieren zu können, wurden exemplarisch Screenshots von repräsentativen Dots erstellt. Diese wurden mit der Software Ulead Photo Impact 7 (Corel GmbH, München, Deutschland) jeweils zu einer semiquantitativen Färbeskala zusammengestellt, aus dem die Abstufungen der Färbeintensitäten genau definiert hervorgingen (s. Kapitel 3.2 Immunhistochemisches Färbeergebnis).

Während der Auswertung war diese Skala immer in einem parallelen Fenster sichtbar und diente als Eichkurve (s. Abbildung 2.5).



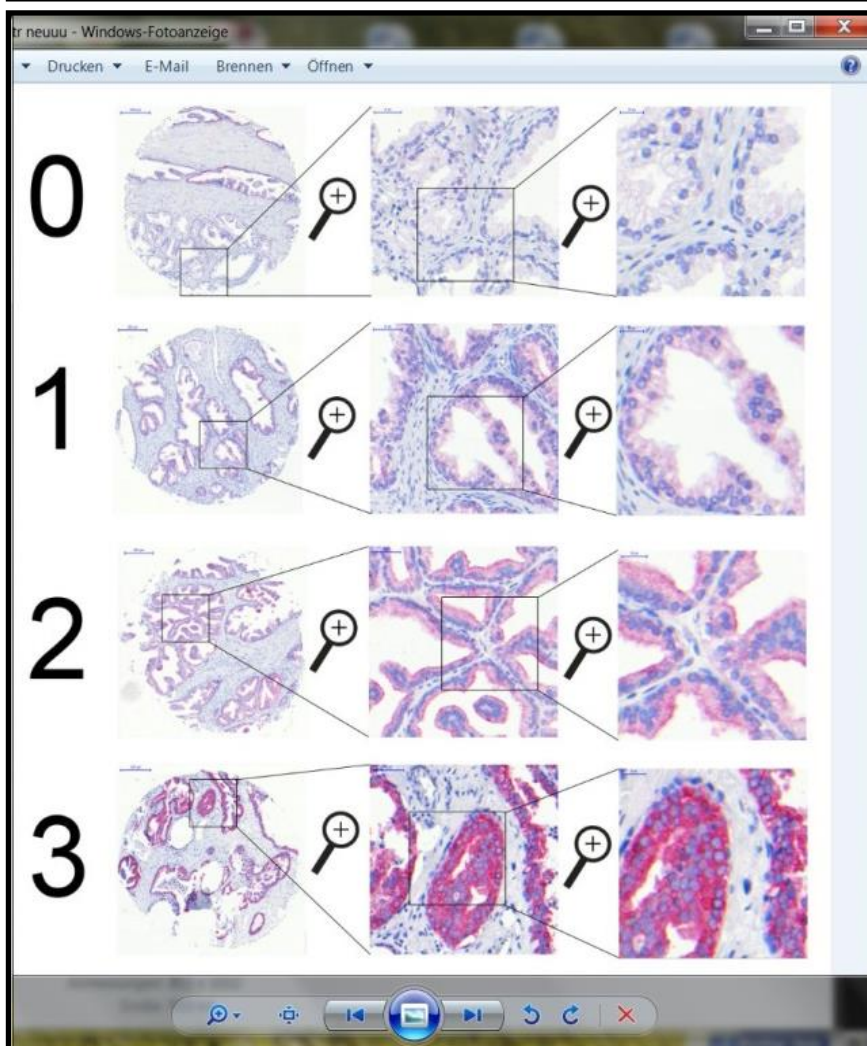
**Abbildung 2.5**  
**Screenshot des**  
**Bildschirms während**  
**der Operationalisierung**  
**der IHC.**

**Oben:**

Darstellung der linken Seite des Bildschirms. Es ist das Programm Pannoramic Viewer (3D Histech Kft, Budapest, Ungarn) geöffnet. Ganz links ist zur Orientierung eine Miniaturabbildung des Objektträgers des TMAs zu sehen. Im großen Fenster ist ein Dot in 400facher Vergrößerung abgebildet.

**Unten:**

Darstellung der rechten Seite des Bildschirms. Es ist parallel die eichende Färbeskala der entsprechenden Färbung geöffnet. Jeder Dot kann auf diese Art einer exakten Evaluation unterzogen werden.

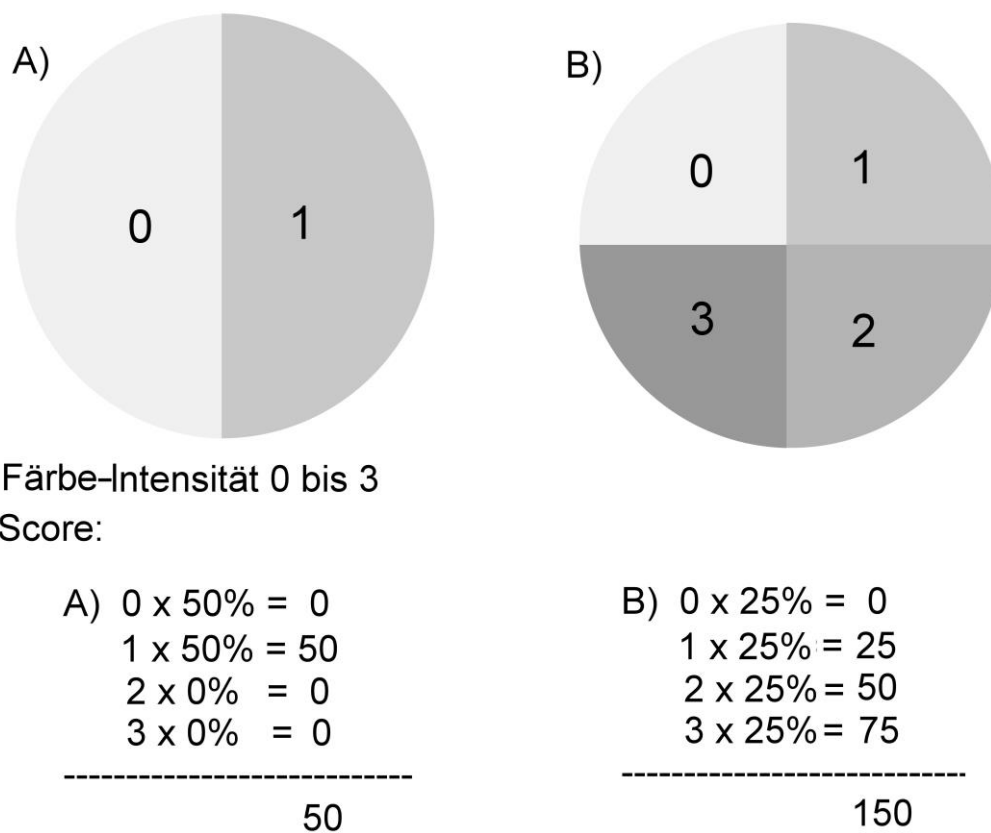


Die Färbe-Intensitäten der einzelnen Dots wurden jeweils in 85facher, 200facher, 400facher und - sofern erforderlich - in 800facher Vergrößerung betrachtet und ausgewertet.

Die Operationalisierung eines Dots, also die Umwandlung der Färbe-Intensitäten der Zellen in eine Zahl erfolgte bei allen Färbungen anhand des Maygarden Scores (Maygarden et al. 1994). Dieser Score fand Anwendung, da innerhalb der gefärbten Dots mehr oder weniger stark ausgeprägte Schwankungen in der Färbe-Intensität vorlagen.

Bei Begutachtung eines auszuwertenden Dots wurden alle Prostata-Drüsenzellen des zu evaluierenden Gewebes (Tumor oder benignes Gewebe) erfasst und vor dem inneren Auge zu einer zusammenhängenden Fläche addiert. Die gesamte Fläche der entsprechenden Drüsenzellen stellte 100% dar (s. Abbildung 2.6).

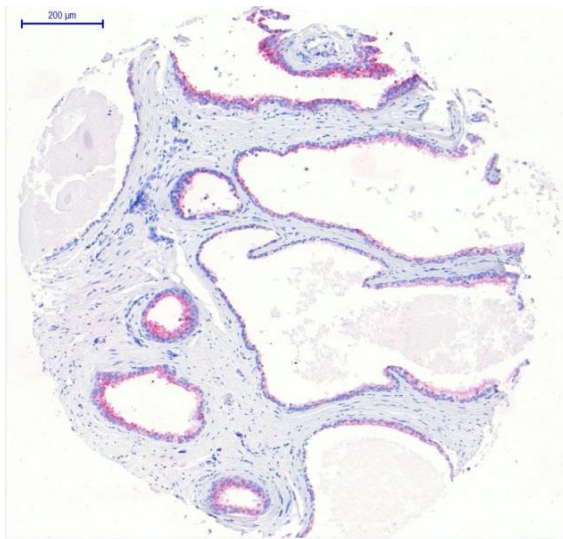
Nun wurde den verschiedenen Färbe-Intensitäten ein entsprechender prozentualer Flächenanteil zugewiesen, wobei die Flächenaufteilung in Schritten von 5 % vorgenommen wurde. Durch Multiplikation des jeweiligen Flächenanteils mit dem Wert der entsprechenden Färbe-Intensität und Addition der einzelnen Teilergebnisse entstand der Gesamt-Färbescore (s. Abbildung 2.7 Beispielhafte Berechnung des Maygarden Scores).



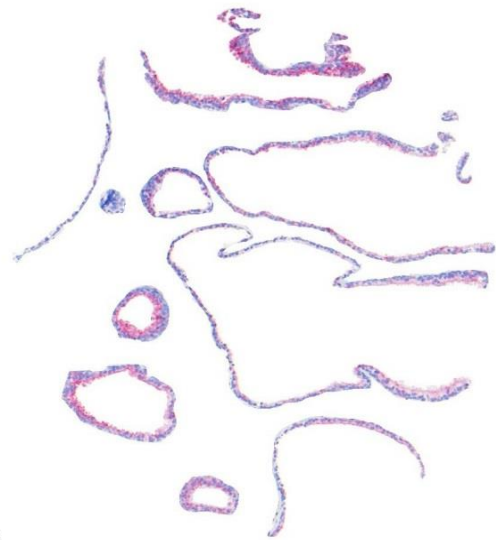
**Abbildung 2.6 Schematische Berechnung des Maygarden Scores**

**A) und B):** Schematische Darstellung zweier Dots, welche aus 100% Prostata Drüsenzellen bestehen. Darstellung der Färbe-Intensitäten 0 bis 3 und exemplarische Berechnung des Färbescores.

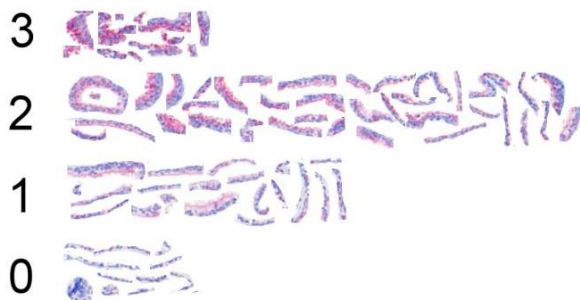




A)



B)



C)

$$10\% \times 3 = 30$$

$$50\% \times 2 = 100$$

$$30\% \times 1 = 30$$

$$10\% \times 0 = 0$$

---

160

D)

**Abbildung 2.7 Beispielhafte Berechnung des Maygarden Scores**

- A) 8,5-fache Vergrößerung eines Dots, Maßstab entspricht 200µm
- B) Alleinige Darstellung des Drüsengewebes, Entfernung des Stomas.
- C) Zerstücklung der Drüsenzellen und Aufschlüsselung anhand der Färbe-Intensitäten (0-3)
- D) Berechnung des Färbe-Scores, welcher sich aus der Summe der Produkte von Färbe-Intensität (0-3) und prozentualen Anteilen des Drüsengewebes der jeweiligen Färbe-Intensität am Gesamtdrüsengewebe berechnet.

## 2.5 Datendokumentation und -auswertung

Die auf den Array Maps dokumentierten Färbe-Scores wurden in Microsoft Excel 2010® (Microsoft Germany, Unterschleißheim) tabellarisch erfasst. Dabei ergänzten die neu erhobenen Daten die Datenbank welche bereits die mRNA aus der Vorgänger Arbeit enthielt. Jeder Patient erhielt eine eigene Zeile. Waren zwei Gewebearten desselben Patienten vorhanden, so erhielt dieser zwei Zeilen.

Die erhobenen Färbescore-Werte jedes Patienten und jeder Gewebeart wurden in eine Spalte zusammengetragen, da immer mehrere Dots pro Patienten existierten. In weiteren Spalten wurde der Mittelwert, der Maximalwert und der prozentuale Anteil des Mittel- bzw. Maximalwertes am maximal zu erreichenden Score bestimmt und notiert. Diese Rohdaten bildeten die Grundlage für die weitere statistische Datenanalyse.

## 2.6 Statistische Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels der Software JMP 10.0® (SAS Inc., Cary, NC, USA).

Dabei wurden Ergebnisse für signifikant befunden, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% war ( $p < 0,05$ ). Lagen bei der Korrelation von stetigen Variablen keine signifikanten Interaktionen und wurden diese nach Dichotomisierung signifikant, so musste das Signifikanzniveau mindestens ( $p < 0,25$ ) betragen um weiter diskutiert zu werden.

Bei der Korrelation von zwei stetigen Variablen wurde eine Regressionsanalyse vorgenommen. Die Auswertung von stetigen und nominalen/ordinalen Beziehungen erfolgte mittels Wilcoxon-Kruskal-Wallis-Test. Waren dabei mehr als zwei Variable gegeneinander auszuwerten, so erfolgte die Untergruppenuntersuchung mittels nachgeschaltetem Tukey-Kramer HSD Test. Die Auswertung von zwei ordinalen Variablen erfolgte mittels der Vier-Felder Tafel (Kontingenztafel) und dem Fischers exakter Test sowie dem Likelihoodverhältnis.

Die grafische Darstellung erfolgte im Falle der von zwei stetigen Variablen durch Einzeichnung der Regressionsgeraden. Im Falle einer Darstellung von stetigen und nicht stetigen Variablen wurden stetige- der Ordinate und nicht stetige Werte der Abszisse zugeordnet. Dabei fanden Säulendiagramme Anwendung, welche den medianen Wert darstellten. Beziehungen von zwei nicht stetigen Variablen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht visualisiert.

## **2.7 Datenschutz**

Alle Patientendaten wurden stets sorgfältig und unter Beachtung des Datenschutzgesetzes §§ 43 und 44 BDSG sowie der ärztlichen Schweigepflicht §203 Abs.3 Satz 2 StGB erfasst und bearbeitet.

Die erhobenen Daten wurden anonymisiert weiterverarbeitet. So wurden Name, Vorname und Geburtsdatum aus der Datenbank entfernt, sodass keine Rückverfolgung zu den einzelnen Patienten möglich war. Darüber hinaus erfolgte die Speicherung der Daten immer verschlüsselt. Dazu wurde das Programm TrueCrypt der TrueCrypt Foundation verwendet.

## **2.8 Ethische Aspekte**

Grundlegendes Kriterium von größter Wichtigkeit zur Erstellung des Patientenkollektives war das Einverständnis der Patienten zur wissenschaftlichen Verwendung ihrer Gewebeproben. Darüber hinaus erhielt die vorliegende Arbeit von der Ethikkommission des Universitätsklinikums das Ethik-Votum 065/2013BO2 vom 7. Februar 2013, das Ethik-Votum 323/2012BO2 vom 27. Juni 2012 sowie das Votum 290/2010BO2 „Retrospektive immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von Proteinparametern des mTOR Signalweges beim Prostatakarzinom mittels der Tissue Micro Array Technik“ vom 21. Januar 2011.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patienten- und Gesamt-Probenkollektive

Die vorliegende Studie hat unterschiedliche Probenkollektive als Basis, welche zusammen das **Gesamt-Patientenkollektiv** bilden und im Folgenden näher dargestellt werden.

Das **Ursprungs-Patientenkollektiv**, welches auf der mRNA-Vorstudie aufbaute, umfasste 104 Patienten (n=104). Das mediane Alter betrug bei Operation 67 Jahre. Der jüngste Patient war 43 Jahre, der älteste 83 Jahre alt.

Das **erweiternde Patientenkollektiv**, zu welchem keine mRNA-Daten vorlagen, beinhaltete 22 weitere Tumor-Patienten (n=22). Bei Operation betrug der Median des durchschnittlichen Alters 64 Jahre, wobei der jüngste Patient 48 Jahre und der älteste Patient 73 Jahre alt waren.

Bei den Patienten des erweiternden Patientenkollektivs gingen immer zwei Gewebe-Proben unterschiedlichen Charakters in die Studie ein: einerseits eine Probe, die aus einem PCA-Areal entstammte, andererseits Prostatagewebe mit benigner Histologie, welches jedoch am Tumor angrenzte. Damit war die Anzahl der ergänzten Proben (n=44) doppelt so groß wie die Anzahl der in die Studie neu aufgenommenen Patienten (n=22).

Das sich daraus ergebende **Gesamt-Patientenkollektiv von 126 Patienten** (n=126) hatte einen medianes Alter von 66 Jahren bei OP. Das Gesamt-Patientenkollektiv wies einen medianen PSA-Wert von 7,6ng/ml auf, wobei die Werte von 0,7ng/ml bis 58,0ng/ml reichten.

Das Gesamt-Patientenkollektiv dieser Studie wurde anschließend in 4 Gruppen aufgeteilt:

- Von der normierenden Referenzgruppe *Gruppe 1* ging *Prostata-Normalgewebe* in die Studie ein. Es gab es zum Zeitpunkt der Probengewinnung histologisch keinen Hinweis auf eine maligne Entartung der Prostata. Von dieser Gruppe soll die Basalexpression von mTOR und 4E-BP1 bzw. ihrer phosphorylierten Formen ermittelt werden.
- Bei *Gruppe 2* handelt es sich um *an Tumor angrenzendes histologisch benignes Gewebe* von Patienten, die an einem PCA litten. Dieses Gewebe stellt somit die Tumordinvasionsfront dar. Es soll stellvertretend für Stanzbiopsien stehen, bei denen der Tumor verfehlt wurde. Es wurde abermals in an low-Gleason (Gleason-Score  $\leq 7b$ ) und in an high-Gleason (Gleason-Score  $\geq 8$ ) Tumore angrenzende Gewebe unterteilt. (*Gruppe 2.1 & 2.2*)
- Bei *Gruppe 3* handelt es sich um Patienten mit *low-Gleason PCAs* (Gleason-Score  $\leq 7b$ )

- *Gruppe 4* enthält Patienten mit einem *high-Risk PCA* (Gleason-Score  $\geq 8$ ).

Gegenstand dieser Arbeit ist das **Gesamt-Probenkollektiv** mit 155 (n=155) verschiedenen Patientenproben (s. Tabelle 2). Neben den zusätzlichen Proben aus dem erweiternden Patientenkollektiv vergrößerte sich das Probenkollektiv um weitere 7 Ereignisse, da bei der Tissue Micro Array Herstellung akzidentiell bei 7 Patienten des Ursprung-Patientenkollektivs das Tumorareal verfehlt und histologisch benigne angrenzende Areale getroffen wurden.

Somit unterschieden sich Gesamt-Patienten- und Gesamt-Probenkollektiv lediglich durch die Gruppe 2, wobei das Gesamt-Probenkollektiv um n=29 Ereignisse größer ist.

Gruppe	Charakteristikum	Gesamtzahl der Patienten	Anteil in %	Gesamtzahl der Proben	Anteil in %
<b>1</b>	Normierende Referenzgruppe	<b>21</b>	<i>16,6%</i>	<b>21</b>	<i>13,5%</i>
<b>2</b>	Histologisch benignes Gewebe organbegrenzter PCAs ...	<b>38</b>	<i>30,2%</i>	<b>67</b>	<i>43,2%</i>
<b>2.1</b>	<i>... mit low-Gleason Tumor (Gleason <math>\leq 7</math>)</i>	35	<i>27,7%</i>	54	<i>34,8%</i>
<b>2.2</b>	<i>... mit high-Gleason Tumor (Gleason <math>\geq 8</math>)</i>	3	<i>2,4%</i>	13	<i>8,4%</i>
<b>3</b>	Organbegrenzte PCAs low/intermediate Gleason $\leq 7$	<b>32</b>	<i>25,4%</i>	<b>32</b>	<i>20,6%</i>
<b>4</b>	Prostatakarzinom high Gleason $\geq 8$	<b>35</b>	<i>27,8%</i>	<b>35</b>	<i>22,6%</i>
	<b>Anzahl insgesamt:</b>	<b><u>126</u></b>		<b><u>155</u></b>	

**Tabelle 2: Übersicht über das Gesamt-Patienten- und Gesamt-Probenkollektiv**

Darstellung des prozentualen und Absoluten Anteils der Untergruppen am Gesamtpatientenkollektiv (n=126) bzw. am Gesamt-Probenkollektiv (n=155).

Patienten von denen eine Probe aus einem Tumorareal entnommen wurde (Gruppe 3 und 4) machten zusammen insgesamt 53,2% des Patientenkollektivs aus. Weitere Eigenschaften dieser einzelnen Patientengruppen können Tabelle 3 entnommen werden.

	<b>Low -Gleason PCA Patienten (Gruppe 3)</b>	<b>High-Gleason PCA Patienten (Gruppe 4)</b>
<b>Anzahl (n)</b>	32	35
<b>medianes OP-Alter (in Jahren)</b>	64	66
<b>medianes PSA</b>	6,9	12,0
<b>Tumorstadium</b>		
<b>pT 2a</b>	4	1
<b>pT 2b</b>	1	0
<b>pT 2c</b>	19	13
<b>pT 3a</b>	3	11
<b>pT 3b</b>	4	8
<b>pT 4</b>	1	2
<b>Lymphknotenstatus</b>		
<b>N0</b>	32	28
<b>N1</b>	-	7
<b>Resektionsstatus</b>		
<b>R0</b>	28	21
<b>R1</b>	4	13
<b>Rx</b>	-	1
<b>Gleason Score (GS)</b>		
<b>6</b>	3	-
<b>7a</b>	18	-
<b>7b</b>	11	-
<b>8</b>	-	11
<b>9</b>	-	22
<b>10</b>	-	2

**Tabelle 3: Eigenschaften der Tumorpatienten**

Darstellung der Tumorpatienten der Gruppe 3 (low-Gleason  $\leq 7b$ ) und 4 (high-Gleason  $\geq 8$ ).

Anzahl, Alter, durchschnittlicher PSA-Wert, Tumorstadium (T), Lymphknotenstatus (N), Resektionsstatus (R) und Gleason Score werden differenziert betrachtet dargestellt.

GS: Gleason Score, PCA: Prostatakarzinom, PSA: Prostata spezifisches Antigen

PCA-Patienten, von denen an Tumor angrenzendes histologisch benignes Gewebe in das Gesamt-Probenkollektiv eingegangen ist und welche in der vorliegenden Arbeit als Patientengruppe 2 bezeichnet werden, sind in Tabelle 4 näher charakterisiert.

	<b>Patienten mit an Tumor angrenzendem Gewebe organbegrenzter PCAs (Gruppe 2)</b>	<b>... mit low-Gleason Tumor (GI ≤7) (Gruppe 2.1)</b>	<b>... mit high-Gleason Tumor (GI ≥8) Gruppe 2.2)</b>
<b>Anzahl (n)</b>	<b>67</b>	<b>54</b>	<b>13</b>
<b>medianes OP-Alter (in Jahren)</b>	<b>65</b>	<b>65,5</b>	<b>64</b>
<b>medianes PSA</b>	<b>6,7</b>	<b>6,5</b>	<b>12,8</b>
<b>Tumorstadium der angr. PCAs:</b>			
<b>pT 2a</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>1</b>
<b>pT 2b</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-</b>
<b>pT 2c</b>	<b>38</b>	<b>33</b>	<b>5</b>
<b>pT 3a</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>5</b>
<b>pT 3b</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>pT 4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-</b>
<b>Gleason-Score des angr. PCAs</b>			
<b>6</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>-</b>
<b>7a</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>-</b>
<b>7b</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>-</b>
<b>8</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>4</b>
<b>9</b>	<b>9</b>	<b>-</b>	<b>9</b>

**Tabelle 4: Eigenschaften der Patienten mit Gewebe Proben aus der Tumorinvasionsfront**

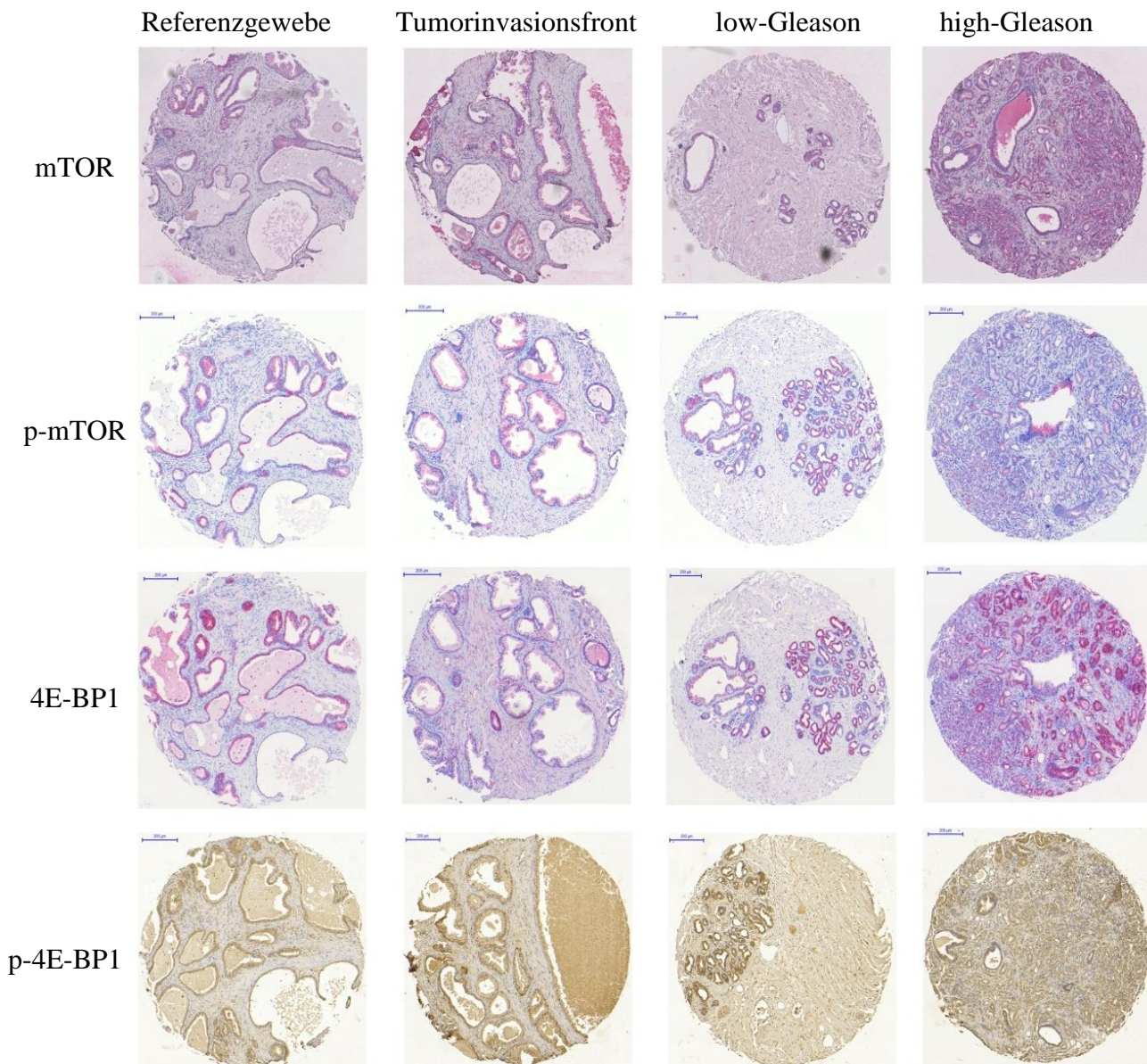
Darstellung der Eigenschaften (Anzahl, Alter, PSA-Wert, Tumorstadium und Gleason-Score des Muttertumors) von Gewebeproben aus Tumor angrenzendem histologisch benignem Gewebe organbegrenzter PCAs, welche in das Gesamt-Patientenkollektiv eingingen (Gruppe 2). Dabei wurde nochmals zwischen an low-Gleason angrenzende (Gruppe 2.1) und an high-Gleason Tumor angrenzende Gewebe (Gruppe 2.2) unterschieden.

OP: Operation, angr.: angrenzend, PCA: Prostatakarzinom, PSA: Prostataspezifisches Antigen, GI: Gleason

## 3.2 Immunohistochemisches Färbeergebnis

### 3.2.1 Auswertbarkeit der Färbungen

Bedingung für die Auswertung der IHCs war das Vorhandensein unbeschädigter Dots, auf welchen Prostata-Drüsenzellen vorhanden waren s. Abbildung 3.1. Bis auf einen Patienten der Gruppe 2 bei der p-4E-BP1 IHC war dies immer der Fall. Die Anzahl der auszuwertenden Dots pro Patient und Gewebe schwankte von Färbung zu Färbung und betrug im Maximalfall sechs.



**Abbildung 3.1** Beispielhafte Übersicht über das Färbeverhalten der verschiedenen Gewebe

Die vier Färbungen (mTOR, p-mTOR, 4E-BP1 und p-4E-BP1) wurden jeweils anhand eines Gewebezylinders (benignes Gewebe, Tumordinvasionsfront, low- und high Gleason Gewebe) dargestellt, welcher in verschiedenen Höhen angeschnitten wurde. Darstellung in 85-facher Vergrößerung. Maßstab=200µm

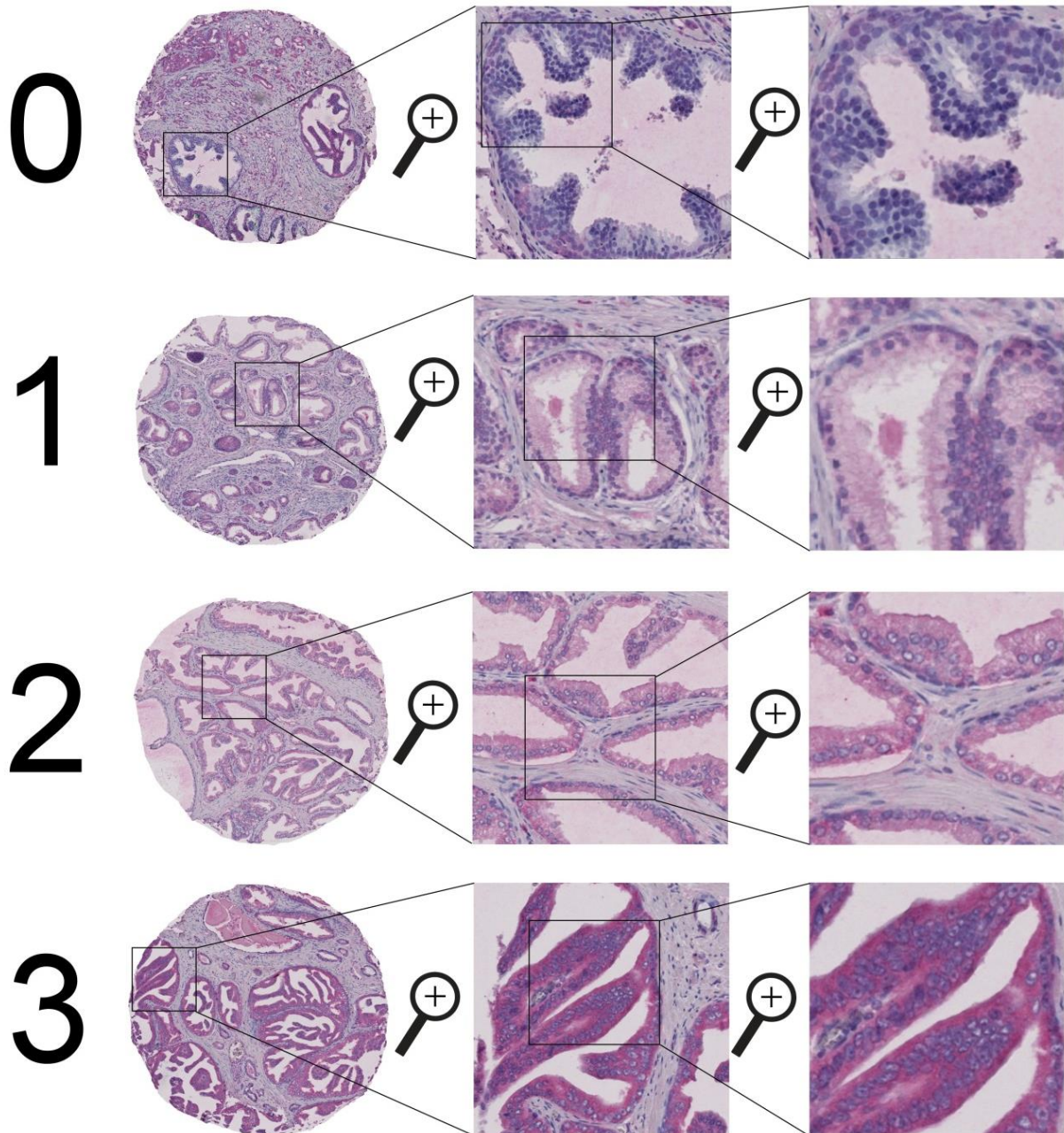


Dabei waren im Falle der mTOR IHC bei 89,0%, im Falle der p-mTOR IHC bei 90,9%, im Falle der 4E-BP1 IHC bei 90,3% und im Falle der p-4E-BP1 IHC bei 82,6% der Gewebeproben mindestens zwei oder mehr Dots pro Patient und Gewebe auswertbar.

Abbildung 3.1 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Färbungen und das jeweilige Färbeverhalten der verschiedenen Gewebe.

### 3.2.2 Darstellung des Färbeverhaltens von mTOR

Die IHC Färbung von mTOR stellte sich oft homogen dar, wobei dann eine gleichmäßige Färbung des Dots zu beobachten war. Abrupte Intensitätsschwankungen konnten nicht verzeichnet werden, dennoch wurden hin und wieder moderate crescendoartige Intensitätsalterationen innerhalb eines Dots festgestellt, sodass keine vorherrschende Färbintensität bestimmt werden konnte.



**Abbildung 3.2 Darstellung der mTOR Färbeskala**

Darstellung in 85-facher Vergrößerung. Die vier Färbungen wurden jeweils anhand eines Gewebezylinders dargestellt, welcher in verschiedenen Höhen angeschnitten wurde. Maßstab=200µm Darstellung der Farbe-Intensitäten 0 bis 3; Vergrößerung links 85-fach (Maßstab=200µm), Mitte 400-fach (Maßstab=50µm); rechts 800-fach (Maßstab=20µm).

**0)** nicht gefärbte Prostata-Drüsenzellen;      **1)** schwach gefärbte Prostata-Drüsenzellen;  
**2)** mäßig stark gefärbte Prostata-Drüsenzellen; **3)** stark gefärbte Prostata-Drüsenzellen.

Es zeigte sich eine schwache, rein zytoplasmatische Violett-Färbung, wobei die Kerne nicht gefärbt waren.

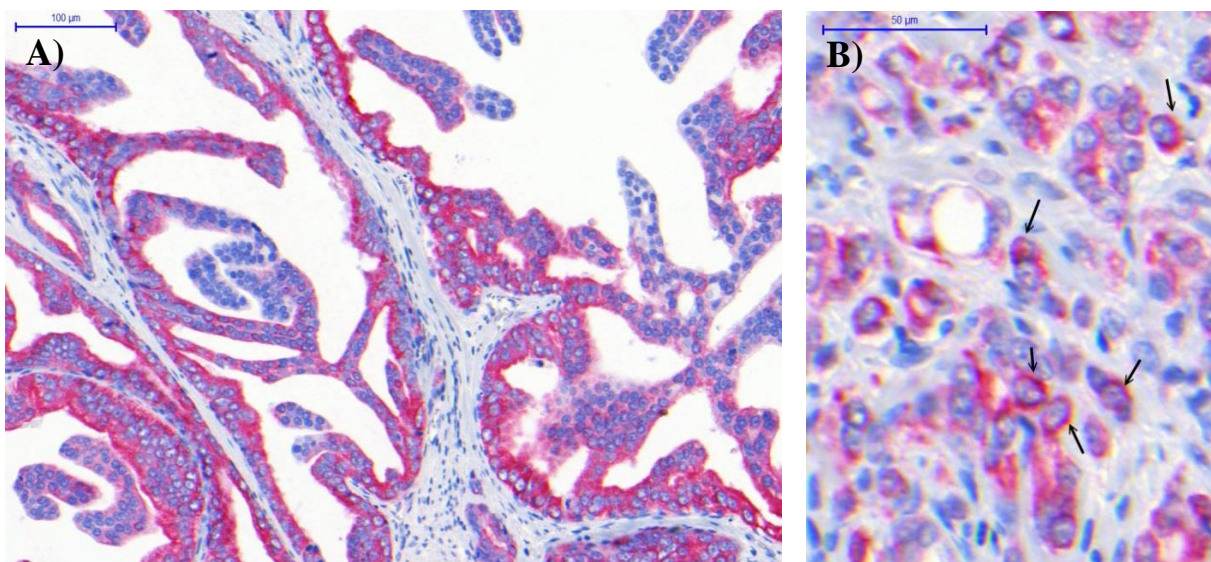
Für die mTOR IHC konnten vier verschiedene Färbeintensitäten (0-3) beobachtet werden, welche in Abbildung 3.2 zu sehen sind. Damit waren potenziell die Zahlenwerte von 0 bis 300 für den p-mTOR Färbescore zu vergeben.

Der Median des Färbescores aller Stanzten betrug 185,00. Vergeben wurden die Score-Zahlenwerte 10 bis 290. Sowohl der Minimum-Score als auch der Maximum-Score entstammte einer Stanze, die aus einem an Tumor angrenzendes Gewebe stammte.

### 3.2.3 Darstellung des Färbeverhaltens von p-mTOR

Die p-mTOR gefärbten Gewebestanzten stellten sich häufig sehr inhomogen dar. Maximal stark gefärbte Zellen lagen oft direkt neben ungefärbten Zellen (s. Abbildung 3.3 A-B). Die Färbung präsentierte sich leuchtend rot und war fast ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert. Gefärbte Kerne waren sehr selten. Immer noch sehr selten, jedoch etwas häufiger, war in schwächer gefärbten Zellen eine leicht verstärkte perinukleäre Färbung zu beobachten (s. Abbildung 3.3 B).

In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich zytoplasmatisch lokalisiertes p-mTOR beurteilt.



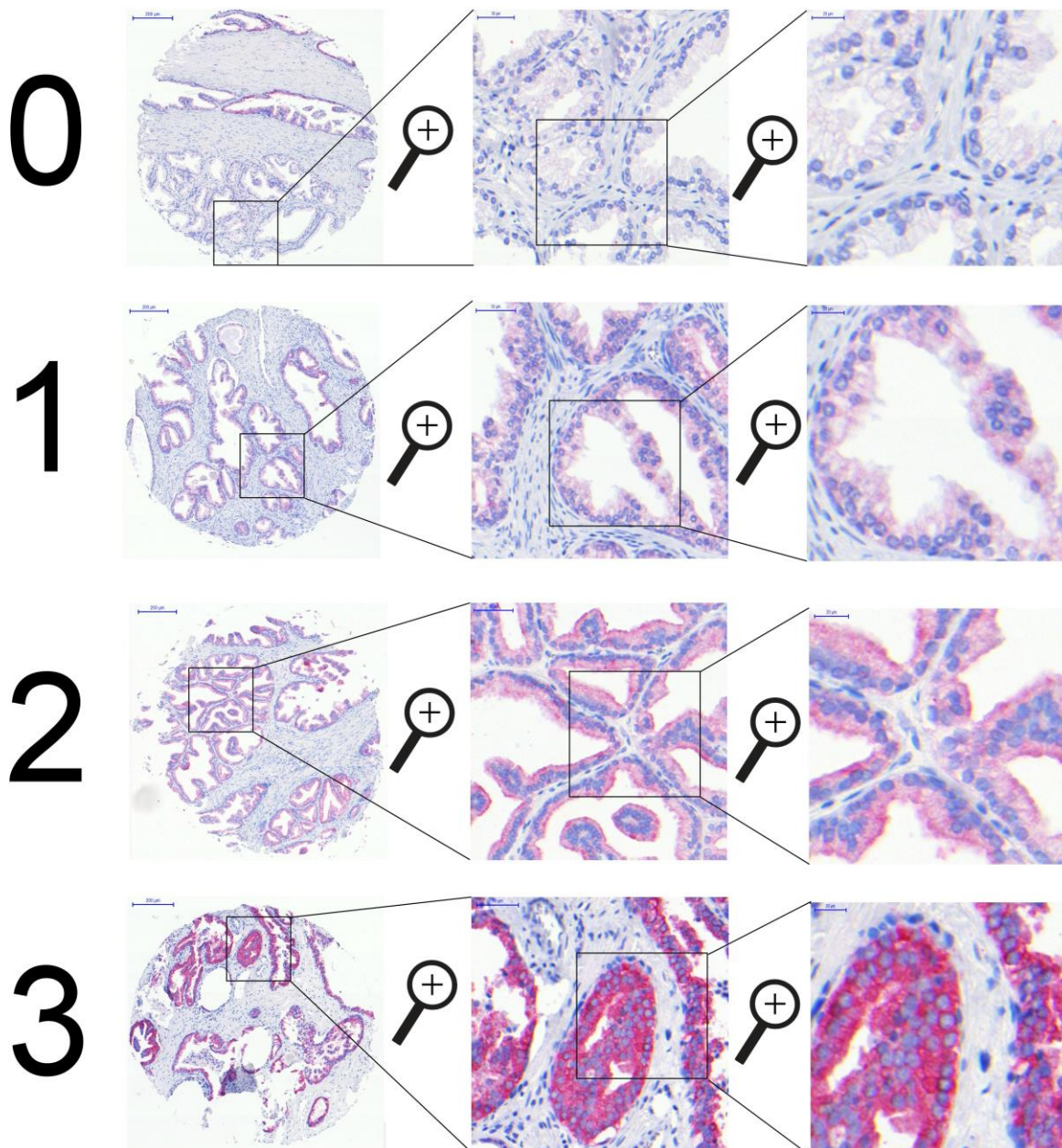
**Abbildung 3.3 Beispielhafte Darstellung des inhomogenen Färbeverhaltens von p-mTOR**

**A)** Beispielhafte Darstellung des inhomogenen Färbeverhaltens; Ausschnitt einer Gewebestanze, 20 fache Vergrößerung. Maßstab=100µm.

**B)** Selten vorkommende verstärkte perinukleäre Färbung (Pfeile). Maßstab=50µm.

Für die p-mTOR IHC wurden vier verschiedene Färbe-Intensitäten (0-3) beobachtet (s. Abbildung 3.4) mit möglichen Färbescore-Zahlenwerten zwischen 0 und 300.

Der mediane Score aller Stanzten betrug 160,00. Tatsächlich Anwendung fanden die Score-Zahlenwerte 10 bis 295. Den Minimum-Score zeigten vier Stanzten, welche allesamt fortgeschrittenen Tumoren (alle Gleason-Score 9) entstammten, den Maximum-Score wies eine Tumorstanze aus low-Gleason-PCA-Gewebe auf.



**Abbildung 3.4 p-mTOR Färbeskala**

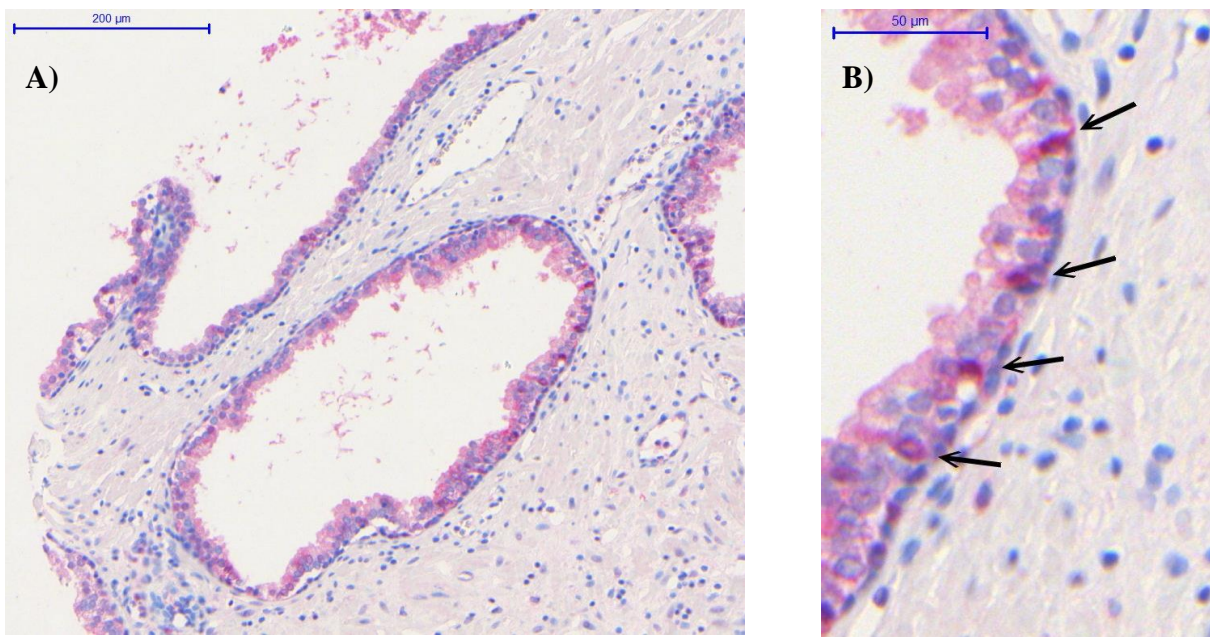
Darstellung der Färbe-Intensitäten 0 bis 3; Vergrößerung: links 85-fach (Maßstab=200µm), Mitte 400-fach (Maßstab=50µm); rechts 800-fach (Maßstab=20µm)

**0**) nicht gefärbte Prostata-Drüsenzellen;      **1**) schwach gefärbte Prostata-Drüsenzellen;  
**2**) mäßig stark gefärbte Prostata-Drüsenzellen;      **3**) stark gefärbte Prostata-Drüsenzellen

### 3.2.4 Darstellung des Färbeverhaltens von 4E-BP1

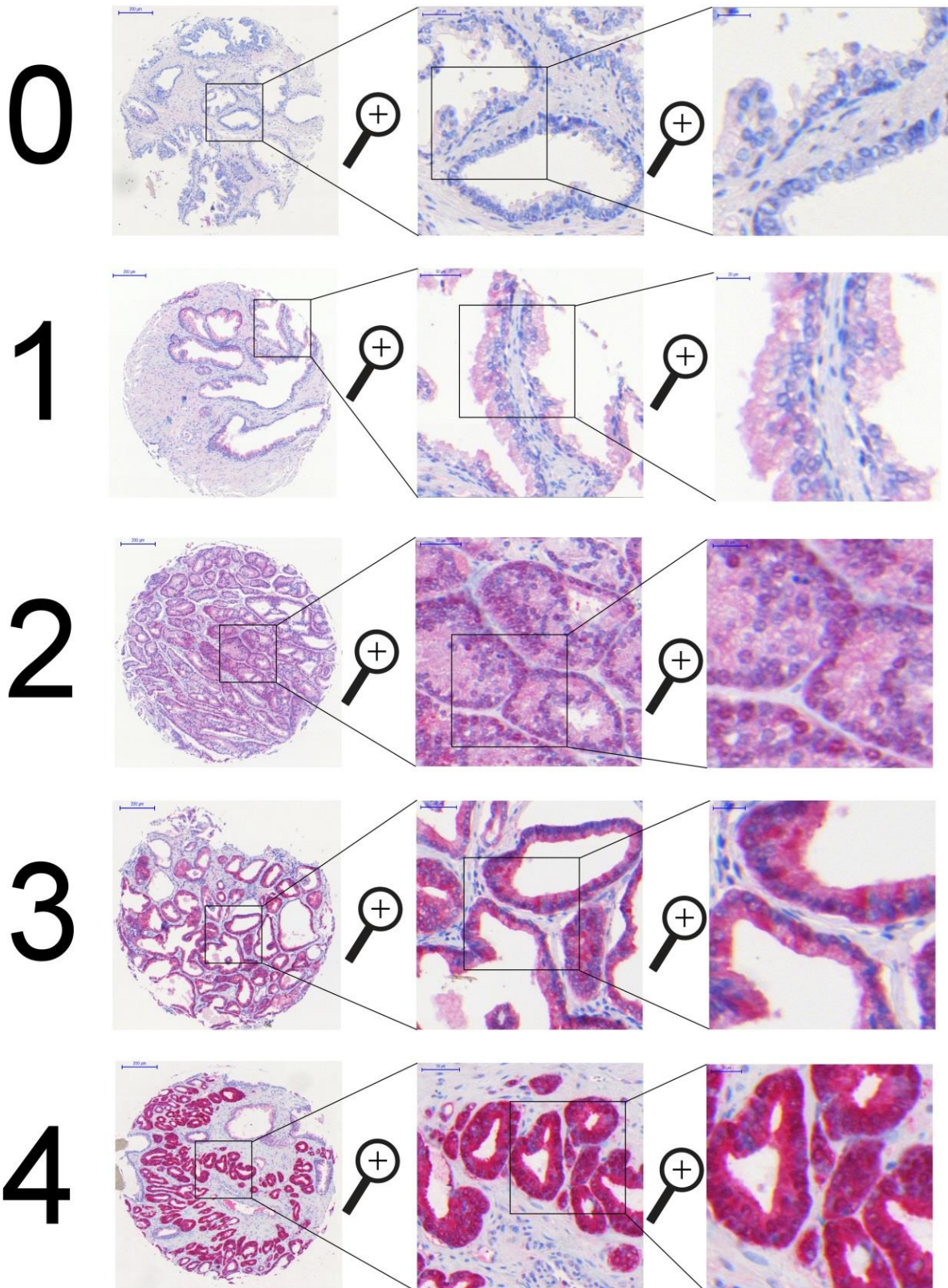
Die 4E-BP1 Färbung gestaltete sich homogen (s. Abbildung 3.5 A) und war durch verschieden intensive Rottöne sehr gut quantifizieren. Dies ermöglichte eine Unterscheidung in fünf verschiedene Färbeintensitäten. Wiederum erhielten nicht gefärbte Prostata-Drüsenzellen den Zahlenwert 0, die am stärksten gefärbten den Zahlenwert 4. (s. Abbildung 3.6).

Abrupte Intensitätsschwankungen kamen nicht vor, jedoch wurden teilweise gemäßigte Farbintensitäts-Schwankungen innerhalb eines Dots beobachtet. Die 4E-BP1-Färbung gestaltete sich als vorwiegend zytoplasmatisch, gelegentlich waren auch Zellkerne mit angefärbt (s. Abbildung 3.5 B). Diese wurden in der Auswertung nicht weitergehend betrachtet. Der Median an vergebenen Score-Punkten betrug 170,00. Drei an Tumor angrenzende Dots und ein Prostata-Normalgewebe beinhaltender Dot erhielten den Minimalscore von 0, eine high-Gleason Tumorstanze erhielt mit 385 von möglichen 400 Score-Punkten den Maximalscore.



**Abbildung 3.5 Beispielhafte Darstellung des inhomogenen Färbeverhaltens von 4E-BP1**

- A) Beispielhafte Darstellung des homogenen Färbeverhaltens der 4E-BP1 Färbung, 150-fache Vergrößerung (Maßstab=200µm)  
B) Beispielhafte Darstellung; vereinzelt gefärbte Kerne, 400-fache Vergrößerung (Maßstab=50µm).



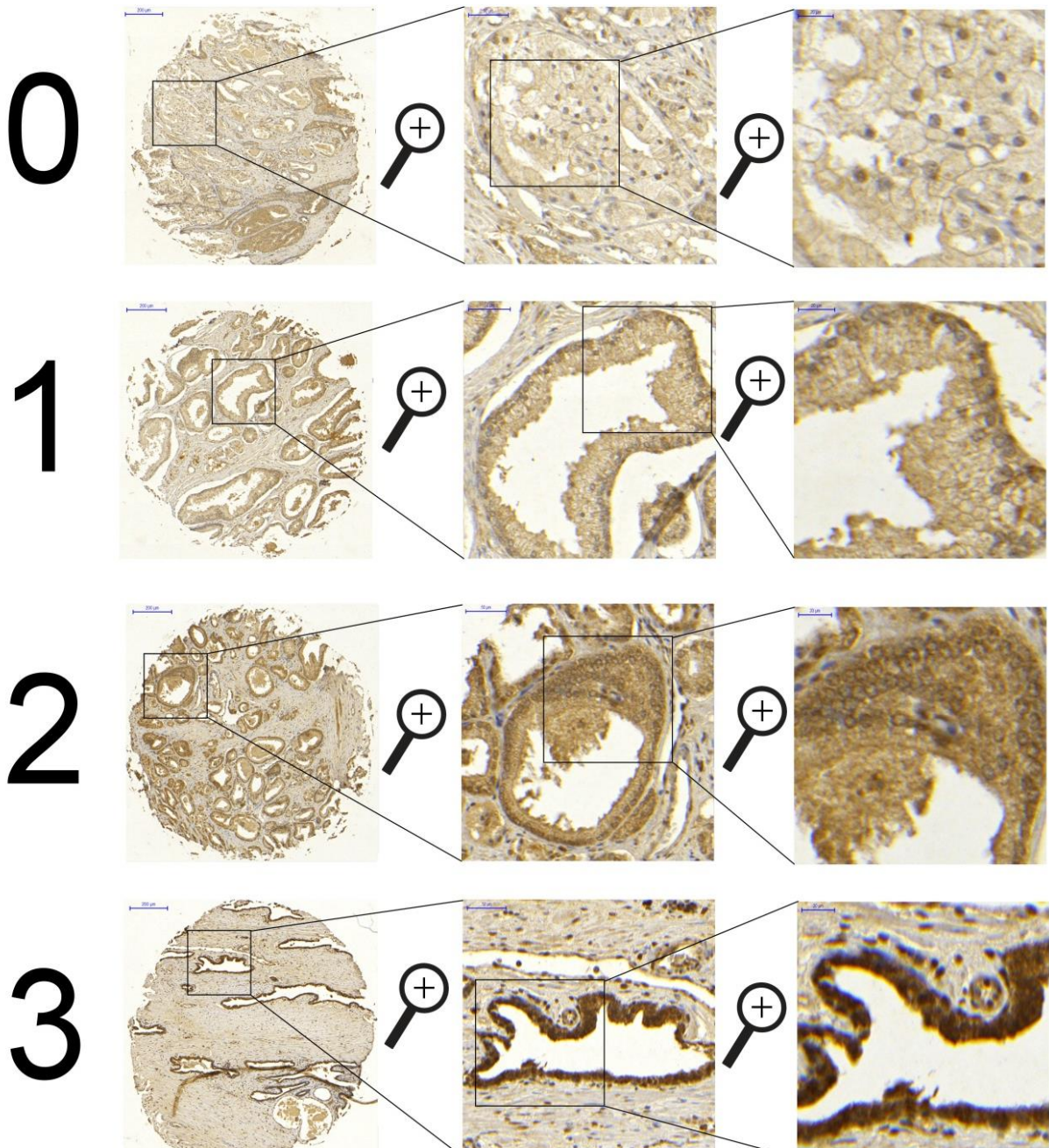
**Abbildung 3.6 4E-BP1 Färbeskala**

Darstellung der Färbeintensitäten 0 bis 4; Vergrößerung: links 85-fach (Maßstab=200µm); Mitte 400-fach (Maßstab=50µm); rechts 800-fach (Maßstab =20µm)

- 0) nicht gefärbte Prostata-Drüsenzellen;
- 1) schwach gefärbte Prostata-Drüsenzellen;
- 2) mäßig stark gefärbte Prostata-Drüsenzellen;
- 3) stark gefärbte Prostata-Drüsenzellen;
- 4) sehr stark gefärbte Prostata-Drüsenzellen.

### 3.2.5 Darstellung des Färbeverhaltens von p-4E-BP1

Die p-4E-BP1 Färbung stelle sich sehr homogen mit nur moderaten Intensitätsschwankungen dar. Dennoch war pro Gewebestanze nur selten eine einzige Farbe-Intensität zu ermitteln. Die Färbung war vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Sie stellte sich im Gegensatz zu den anderen drei Markern, welche chromogen waren, braun-ockerfarbig dar und konnte in vier verschiedene Färbintensitäten eingeteilt werden (s. Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7 p-4E-BP1 Färbeskala**

Darstellung der Färbintensitäten 0 bis 3; Vergrößerung: links 85-fach (Maßstab = 200µm); Mitte 400-fach (Maßstab = 50µm); rechts 800-fach (Maßstab = 20µm).

**0**) nicht gefärbte Prostata-Drüsenzellen;      **1**) schwach gefärbte Prostata-Drüsenzellen;  
**2**) mäßig stark gefärbte Prostata-Drüsenzellen; **3**) stark gefärbte Prostata-Drüsenzellen.

Gefärbte Zellkerne wurden nicht gesondert betrachtet. Der Farbe-Score Median aller Stenzen betrug 132,00. Der geringste Färbescore (10) entstammte einer low-Gleason-PCA-, der höchste (290) einer Tumorinvasionsfront-Gewebestanze.



### 3.3 Re-Evaluation der mRNA Expressionen

Da die mTOR- und die 4E-BP1-mRNA-Expressionen die dieser Arbeit zugrunde liegen als prozentuale Überexpressionen (Werner 2014) und nicht als absolute Überexpressionen zum Housekeeping-Gen HPRT-1 ermittelt wurden, fand eine erneute Auswertung der mRNA Daten unter der Verwendung der absoluten Überexpressionen statt.

#### 3.3.1 Korrelation der mRNA Expressionen mit klinischen Daten

Zwischen dem Alter bei Operation und der 4E-BP1 Expression bestanden keine Korrelationen. Positiv korrelierte jedoch das Alter mit der mTOR Expression ( $mTORmRNA = -0,66 + 0,02 * \text{Alter bei OP}$ ). Der PSA Wert korrelierte ebenfalls nicht mit der 4E-BP1 Expression. Eine fast signifikante ( $p=0,0858$ ) positive Korrelation bestand jedoch zur mTOR Expression ( $PSA = 9,26 + 2,78 * mTORmRNA$ ). Signifikant wurde diese bei Dichotomisierung im Median. Dabei wiesen Patienten mit übermedianem PSA-Wert ( $PSA \geq 8,37$ ) auch übermediane mRNA-Expressionen auf ( $p=0,0309$ ).

#### 3.3.2 Korrelation der mRNA Expressionen mit histopathologischen Eigenschaften

Der Gleason Score hatte signifikante Einflüsse auf die mRNA-Expressionen. Sowohl für mTOR ( $p=0,0175$ ) als auch für 4E-BP1 ( $p=0,0245$ ) waren die Expression bei Gleason-Score  $\geq 8$  signifikant größer als bei Gleason-Score  $< 8$ . Ein gleichartiger Trend zeichnete sich auch für die T-Stadien ab. Dabei zeigten organbegrenzte Tumore ( $T \leq 2$ ) deutlich geringere mTOR- ( $p=0,0705$ ) und 4E-BP1-Expressionen ( $p=0,0798$ ) als organüberschreitende ( $T \geq 3$ ). Keine erwähnenswerten Trends bestanden bezüglich des Lymphknotenstatus<sup>4</sup>.

#### 3.3.3 Lokoregionäre Verteilung der mRNA Expressionen im Prostataraum

##### 3.3.3.1 Einfluss der Entdifferenzierung auf die mRNA Expressionen

Normal- und Tumorgewebe unterschieden sich hinsichtlich der Expressionen von mTOR ( $p=0,8852$ ) und 4E-BP1 ( $p=0,7854$ ) nicht. Signifikante Unterschiede fehlten auch zwischen benignem Referenzgewebe, an Tumor angrenzendem-, low-Gleason-PCA- und high-Gleason-PCA-Gewebe hinsichtlich der mTOR-Expression. Auch wenn nicht signifikant ( $p=0,0825$ ) war die mRNA-Expression im high Gleason-Gewebe deutlich höher als im low-Gleason Gewebe.

Für 4E-BP1 waren die Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Gewebegruppen ebenfalls gering. Lediglich im low-Gleason-PCA- war eine signifikant geringere ( $p=0,0227$ )

Expression als im high-Gleason PCA-Gewebe zu verzeichnen (s.

Tabelle 5).

Mediane Expression	Benignes Normalgewebe (Gruppe 1)	An Tumor angrenzendes Gewebe (Gruppe 2)	Low-Gleason PCA-Gewebe (Gruppe 3)	High-Gleason PCA-Gewebe (Gruppe 4)
mTOR mRNA	0,56	0,46	0,19	0,71
4E-BP1 mRNA	-1,85	-1,95	-2,35	-1,39

**Tabelle 5: Darstellung der medianen mTOR- und 4E-BP1-mRNA Expressionen in Abhängigkeit der Gewebedignität.**

### 3.3.3.2 Einfluss des Tumorstadiums auf die mRNA Expression des am Tumor angrenzenden

#### Normalgewebes

Die mTOR- und 4E-BP1-Expressionen von an low-Gleason- (n=35) und an high-Gleason-Tumoren angrenzendem Gewebe (n=3), (Gruppe 2.1 und Gruppe 2.2) unterschieden sich nicht signifikant voneinander (s. Tabelle 6). Dennoch war der Trend zu beobachten (p=0,1229), dass an low Gleason PCA Tumore angrenzende Gewebe eine geringere mTOR mRNA Expression aufweisen, als Gewebe, welche an high-Gleason PCAs angrenzten.

Mediane Expressionen	Normalgewebe angrenzend an low-Gleason-PCAs (Gruppe 2.1)	Normalgewebe angrenzend an high-Gleason PCAs (Gruppe 2.2)	p-Wert
mTOR mRNA	0,51	0,21	0,1229
4E-BP1 mRNA	-1,94	-2,20	0,4014

**Tabelle 6: Darstellung der medianen mTOR- und 4E-BP1- mRNA Expressionen der Tumordinvasionsfront von low- und high-Gleason PCAs.**

### 3.3.4 Korrelation zwischen den mRNA Expressionen der Marker

Bei Vergleich der mTOR-mRNA-Expression mit der 4E-BP1-Expression zeigte sich folgende signifikante (p=0,0482, r<sup>2</sup>=0,0377) Korrelation: 4E-BP1 = -1,97 + 0,23\*mTOR.

Im Normalgewebe war eine signifikante positive Korrelation zwischen den mRNA-Expressionen zu finden (p=0,0019, r<sup>2</sup>=0,1572), 4E-BP1 = - 2,14 + 0,48\*mTOR, welche jedoch im Tumorgewebe fehlte (p=0,6029, r<sup>2</sup>=0,0063).

Bei differenzierter Betrachtung der Untergruppen war lediglich für Gruppe 2 eine positive Korrelation (p=0,0035, r<sup>2</sup>=0,2137): 4E-BP1 = -2,12 + 0,55\*mTOR.

Bei Gruppe 1 ( $p=0,2307$ ) und Gruppe 3 ( $p=0,2365$ ) waren positive, bei Gruppe 4 ( $p=0,2755$ ) waren negative jedoch nicht signifikante Assoziationen der mRNA Expressionen erkennbar.

### 3.4 Korrelation der Parameter-Expressionen mit histopathologischen Eigenschaften

#### 3.4.1 Prostata-Normalgewebe im Vergleich zu PCA-Gewebe bezüglich der Proteinexpression

Im Folgenden soll eine Gegenüberstellung der Expressionsdaten aller Prostata-Normalgewebe des Gesamt-Patientenkollektivs (Gruppe 1 und Gruppe 2) mit den Daten aller PCA-Gewebe des Gesamt-Patientenkollektivs (Gruppe 3 und Gruppe 4) erfolgen.

##### 3.4.1.1 Prostata-Normalgewebe im Vergleich zu PCA-Gewebe hinsichtlich der Protein-Expressionen von mTOR sowie von p-mTOR

Bei der Betrachtung der medianen **mTOR-Expressionen** von Tumor- zu Prostata-Normalgewebe fiel ein signifikanter Unterschied ( $p=0,0003^*$ ) der Färbeintensitäten auf. Die mediane Färbeintensität von mTOR war im Tumorgewebe mit 200,00 (Range 77,00-285,00) signifikant höher als benignen Geweben, wo sie 171,50 betrug (Range 100,00-265,00, s. Abbildung 3.8 A).

Auch hinsichtlich der **p-mTOR** Expressionen war ein signifikanter Unterschied auszumachen. Dabei war die mediane Färbeintensität im Tumorgewebe mit 147,50 (Range 10,00-257,50) signifikant höher ( $p=0,0099^*$ ) als im Prostata-Normalgewebe (Median 173,50, Range 12,50 – 263,75, s. Abbildung 3.8 C).

##### 3.4.1.2 Prostata-Normalgewebe im Vergleich zu PCA-Gewebe hinsichtlich der Protein-Expressionen des Quotienten p-mTOR/mTOR

Bei der Betrachtung des Quotienten der Färbeintensität von **p-mTOR/mTOR** fiel ebenso ein hoch signifikanter Unterschied ( $p<0,0001^*$ ) zwischen Tumor- und Prostata-Normalgewebe auf. Für Normalgewebe war der mediane Quotient mit 0,95 (Range 0,10-1,95) größer als für Tumorgewebe (Medianer Quotient 0,75; Range 0,05-2,06, s. Abbildung 3.8E)

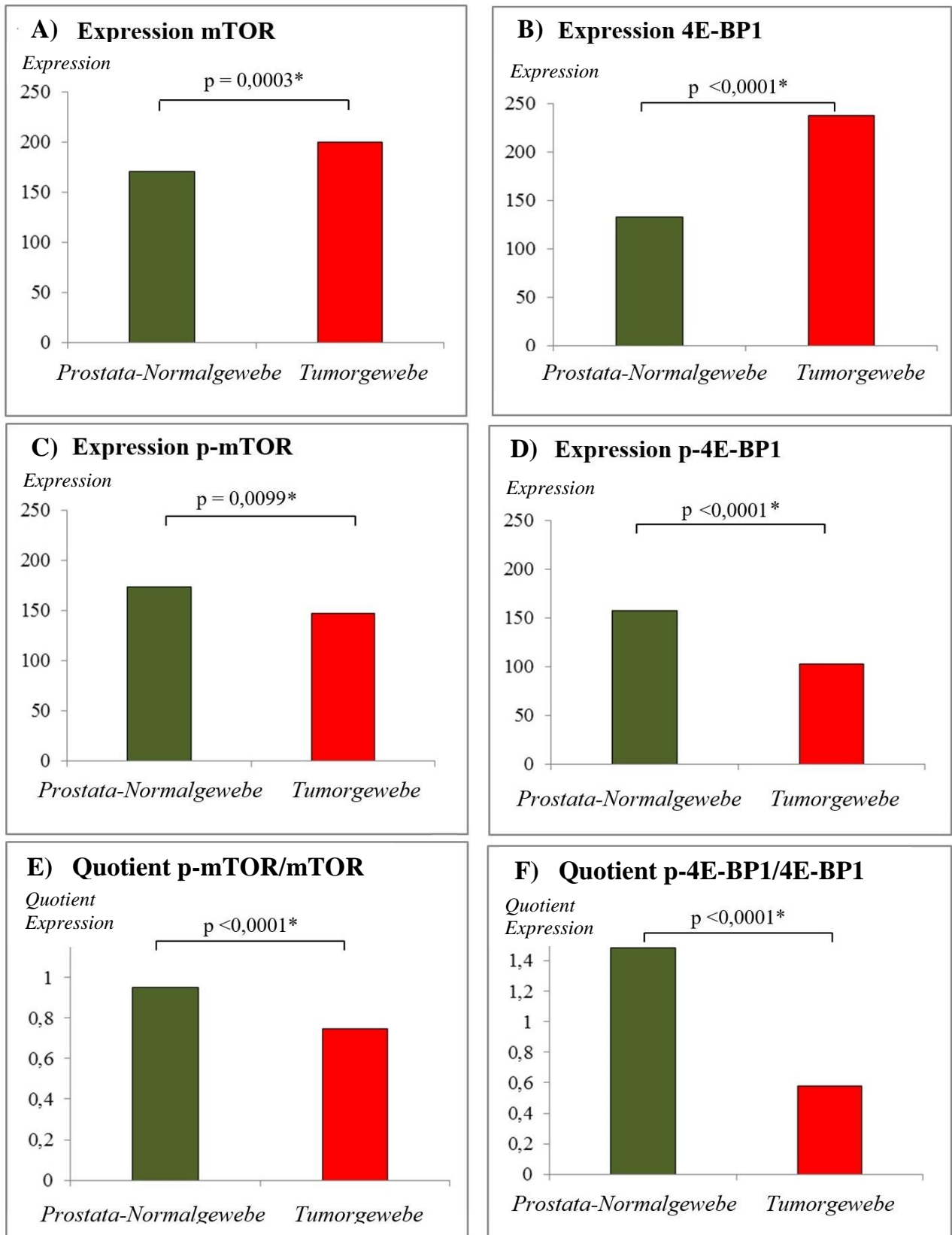
3.4.1.3 Prostata-Normalgewebe im Vergleich zu PCA-Gewebe hinsichtlich der Protein-  
Expressionen von 4E-BP1 und p-4E-BP1

Die Färbeintensitäten von **4E-BP1** im Tumor- und im Prostata-Normalgewebe zeigten hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0,0001^*$ ). Dabei war die mediane Expression im Tumorgewebe fast doppelt so groß (Median 237,50, Range 40,00-382,50) wie im Prostata-Normalgewebe (Median 132,75, Range 31,67-245,00, s. Abbildung 3.8 B).

Ebenso war ein hoch signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001^*$ ) bei der Proteinexpression von **p-4E-BP1** zu beobachten. Hier war die mediane Expression im Tumorgewebe mit 103,75 (Range 30,00-210,00) signifikant geringer als im Prostata-Normalgewebe (Median 157,50, Range 40,00-280,00, s. Abbildung 3.8 D).

3.4.1.4 Prostata-Normalgewebe im Vergleich zu PCA-Gewebe hinsichtlich der Protein-  
Expressionen des Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1

Auch beim Quotienten der Färbeintensitäten von **p-4E-BP1/4E-BP1** ließ sich ein hoch signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001^*$ ) zwischen Tumor- und Normalgewebe der Prostata feststellen. Bei erstgenanntem betrug der Median nur 0,77 (Range 0,14-5,08) und war lediglich halb so groß wie im Normalgewebe (Median 1,49, Range 0,63-7,43, s. Abbildung 3.8 F).



**Abbildung 3.8 A-F: Vergleich der medianen Proteinexpressionen bzw. der Quotienten zwischen Normal- und Tumorgewebe.**

Proteinexpression von mTOR (A), p-mTOR (C), 4E-BP1 (B), p-4E-BP1 (D) sowie die Expression der Quotienten p-mTOR/mTOR (E) und p-4E-BP1/4E-BP1 (F) im Normal- und Tumorgewebe der Prostata, n=155. Proteinexpression angegeben anhand der medianen Färbeintensität.

### 3.4.2 Entdifferenzierung und Staging des PCAs

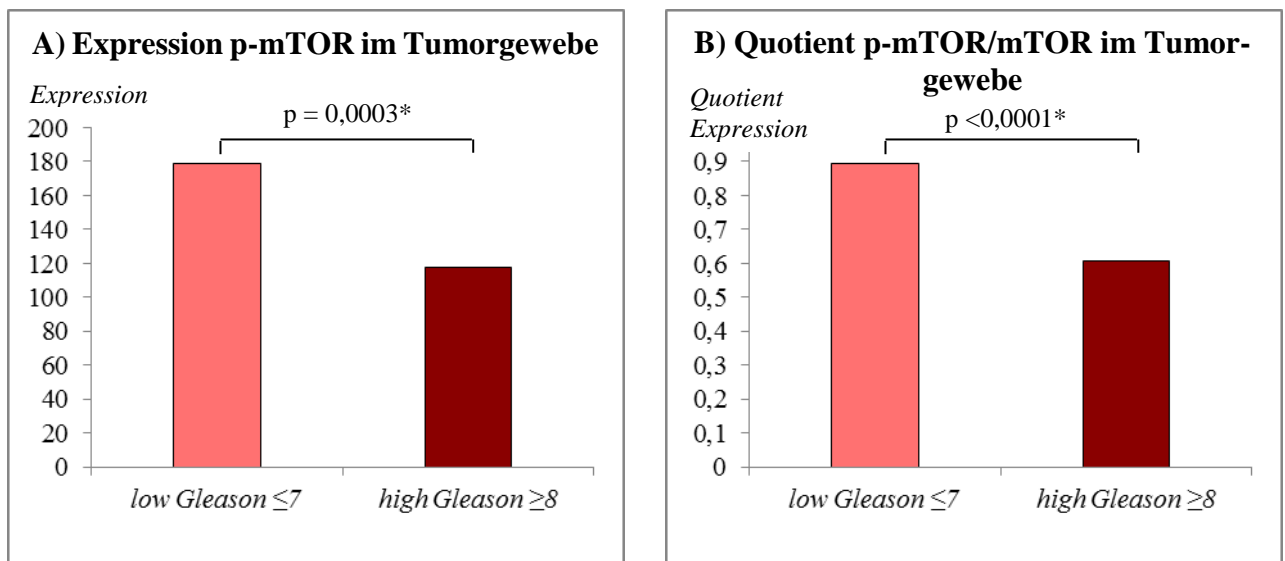
#### 3.4.2.1 Proteinexpression in Abhängigkeit des Gleason-Scores

Hinsichtlich des Gleason-Scores wurde das Kollektiv in eine low (Gleason Score  $\leq 7$ ) und high (Gleason  $\geq 8$ ) Gruppe unterteilt.

Deutliche Resultate zeigten sich hier vor allem für die p-mTOR Färbung, bei der die mediane Färbeintensität bei low-Gleason Tumoren wesentlich höher ( $p=0,0003^*$ ) als bei high-Gleason Tumoren war. Für low-Gleason-Tumore lag der Median bei 178,75 (Range 10,00-257,50), bei high-Gleason-Tumoren lediglich bei 117,50 (Range 12,50-235,00, s. Abbildung 3.9 A).

Auch der Quotient der Färbeintensitäten von p-mTOR/mTOR zeigte hoch signifikante Ergebnisse ( $p<0,0001^*$ ) und war für low-Gleason Tumore (Median 0,90) deutlich größer als für high-Gleason Tumore (Median 0,61, s. Abbildung 3.9 B).

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen low- und high-Gleason Tumoren hinsichtlich der Proteinexpression von mTOR, 4E-BP1, p-4E-BP1 und dem Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1.



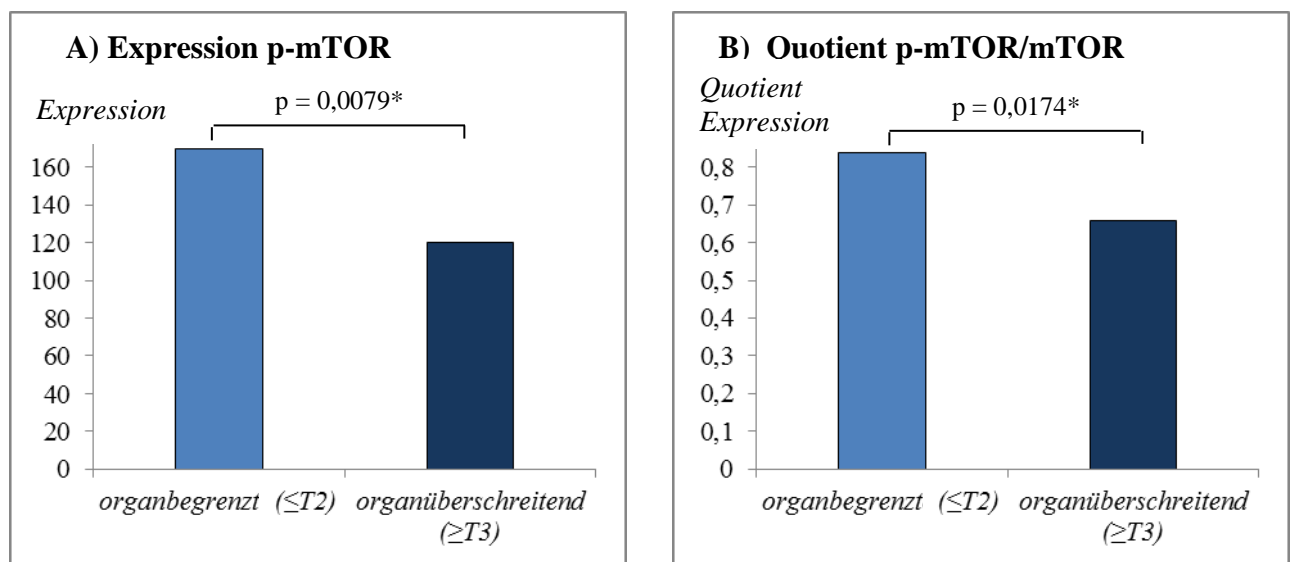
**Abbildung 3.9 A-B: Vergleich der medianen Proteinexpression bzw. des Quotienten im Tumorgewebe**  
Vergleich der Proteinexpression von p-mTOR (A) sowie Darstellung des Quotienten von p-mTOR/mTOR (B) im low- und high-Gleason PCA-Gewebe. Proteinexpression angegeben anhand der medianen Färbeintensität.

### 3.4.2.2 Proteinexpression in Abhängigkeit des T-Stadiums

Bezüglich des T-Stadiums erfolgte eine Unterteilung des Gesamt-Kollektivs in organbegrenzte ( $\leq T2$ ) und organüberschreitende ( $\geq T3$ ) PCAs.

Es zeigte sich, dass die mediane Proteinexpression von p-mTOR signifikant höherer ( $p=0,0079^*$ ) war, wenn es sich um ein organbegrenzt Stadium handelte. Sie lag bei organbegrenzten PCAs bei 169,60 (Range 10,00-235,00), bei organüberschreitenden PCAs hingegen bei 120,00 (Range 12,50-247,50, s. Abbildung 3.10 A).

Auch der Median des Quotienten der Proteinexpressionen von p-mTOR/mTOR war in organbegrenzten PCAs signifikant höher ( $p=0,0174^*$ ) und lag bei 0,84 (Range 0,05-2,06). Bei organüberschreitenden PCAs lag der Median hingegen nur bei 0,65 (Range 0,07-1,56, s. Abbildung 3.10 B).



**Abbildung 3.10 A-B: Vergleich der medianen Proteinexpression bzw. des Quotienten in Abhängigkeit der lokalen Tumorausbreitung.**

Darstellung der Expression von p-mTOR (A), sowie Darstellung des Quotienten p-mTOR/mTOR (B) in organbegrenzten und in organüberschreitenden PCAs. Proteinexpression angegeben anhand der medianen Färbeintensität.

### 3.4.2.3 Proteinexpression in Abhängigkeit des N-Stadiums

Keinen signifikanten Einfluss hatte der Lymphknotenstatus auf die Proteinexpressionen der verschiedenen Proteinparameter.

Auch wenn nicht signifikant ( $p=0,1484$ ), war die mediane p-mTOR Proteinexpression bei Lymphknoten-Metastasen negativen Patienten deutlich größer (Median=152,25 Range 10,00-257,50) als bei Lymphknoten-Metastasen positiven Patienten (Median=117,50, Range 72,50-160,00). Gleiches galt für die p-4E-BP1 Expression ( $p=0,1266$ ,  $n=67$ ).

### 3.4.3 Korrelation mit klinischen Daten der Patienten

#### 3.4.3.1 Proteinexpression in Abhängigkeit des Patientenalters bei Operation

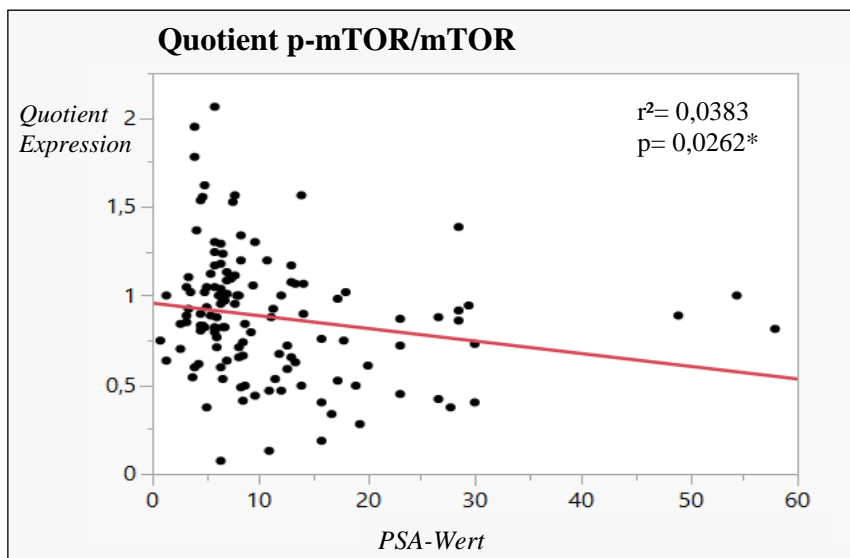
Verglich man die Proteinexpressionen mit dem Alter der Patienten des Gesamt-Kollektivs bei Operation, so gab es für keinen Parameter aussagekräftige Ergebnisse. Auch eine Dichotomisierung des Gesamt-Kollektivs im Median ( $\leq 66$  Jahre und  $> 66$  Jahre) erbrachten keine signifikanten Resultate. Dementsprechend verlief auch ein Vergleich von Untergruppen (Normal- und Tumorgewebe der Prostata) des dichotomisierten Gesamt-Kollektivs.

#### 3.4.3.2 Expression der Parameter in Abhängigkeit des PSA-Wertes

Beim Vergleich des PSA-Wertes mit den verschiedenen Proteinexpressionen zeigte sich alleine für den Quotienten p-mTOR/mTOR eine signifikante negative Korrelation:  $r^2=0,0383$ ,  $p=0,0262^*$  (s. Abbildung 3.11).

Eine Dichotomisierung des Kollektivs in PSA-Werte  $\leq 4$  ng/ml und  $> 4$  ng/ml zeigte keine signifikanten Ergebnisse. Nach Dichotomisierung der PSA-Werte im Median ( $\leq 7,68$  ng/ml und  $> 7,68$  ng/ml) zeigten signifikante Unterschiede der Expressionen für mTOR ( $p=0,0241^*$ ), p-mTOR ( $p=0,0436^*$ ) und den Quotienten p-mTOR/mTOR ( $p=0,0002^*$ ). Die Expressionen von p-mTOR- und p-mTOR/mTOR waren bei kleineren PSA-Werten ( $\leq 7,68$  ng/ml) signifikant höher, die mTOR-Expression hingegen bei höheren PSA-Werten ( $PSA > 7,68$  ng/ml).

Ein Untergruppenvergleich zeigte, dass nur im Tumorgewebe ein signifikanter Zusammenhang zwischen den dichotomisierten PSA-Werten und den Proteinexpressionen von p-mTOR ( $p=0,0144^*$ ) bzw. beim Quotienten p-mTOR/mTOR ( $p=0,0060^*$ ) bestand. Im Normalgewebe war diese Signifikanzen nicht vorzufinden: p-mTOR ( $p=0,8350$ ) bzw. p-mTOR/mTOR ( $p=0,1689$ ).



**Abbildung 3.11**  
**Korrelation des PSA-Wertes mit dem Quotienten p-mTOR /mTOR.**  
Proteinexpression angegeben anhand des Quotienten der medianen Färbeintensität.  $n=129$   
PSA: Prostataspezifisches Antigen



## 3.5 Lokoregionäre Verteilungen im Prostataraum

Im Folgenden sind die Expression der Parameter mit der lokoregionären Verteilung des Entnahmeortes vor dem Hintergrund der Histologie dargestellt. Dabei wurden die Prostata-Normalgewebe zusätzlich als Vergleich herangezogen.

### 3.5.1 Einfluss der Entdifferenzierung auf die Proteinexpression

Im Weiteren wurden Prostata-Normalgewebe, an Tumor angrenzendes Gewebe, Low-Gleason- sowie High-Gleason-Gewebe bezüglich der verschiedenen Proteinparameter-Expressionen untersucht (s. Abbildung 3.12).

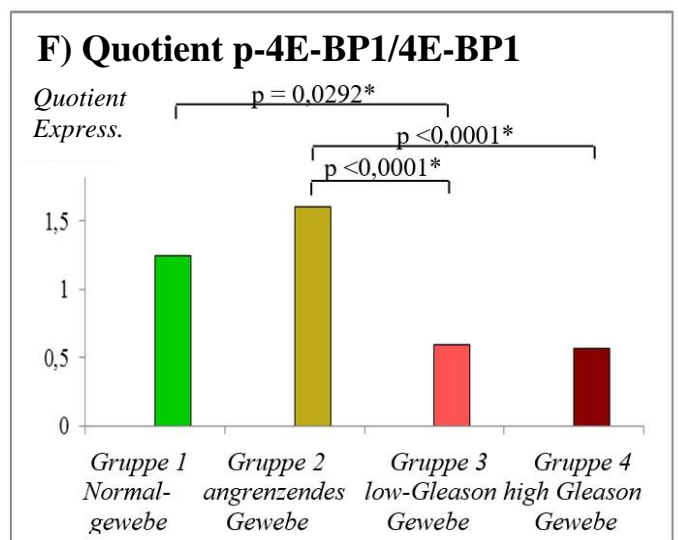
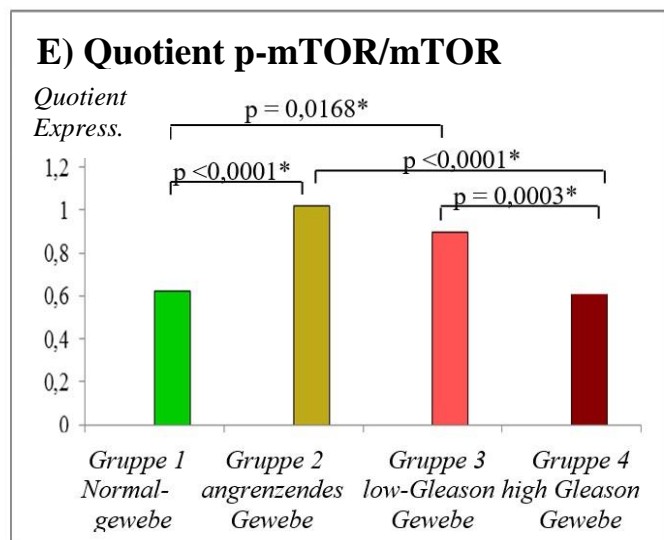
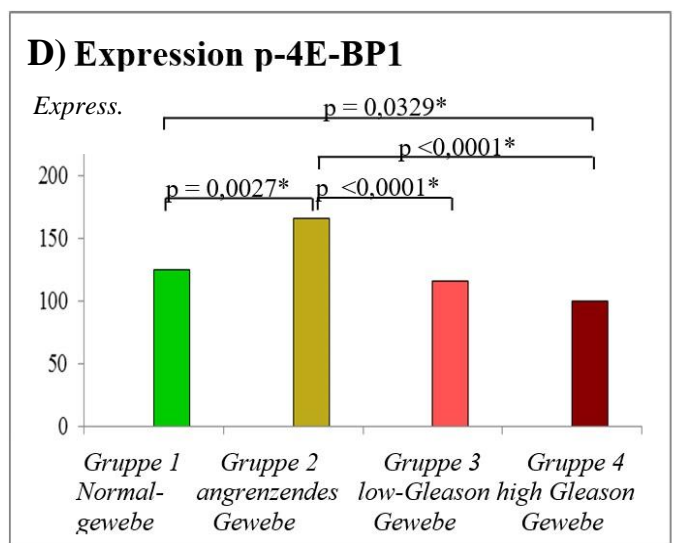
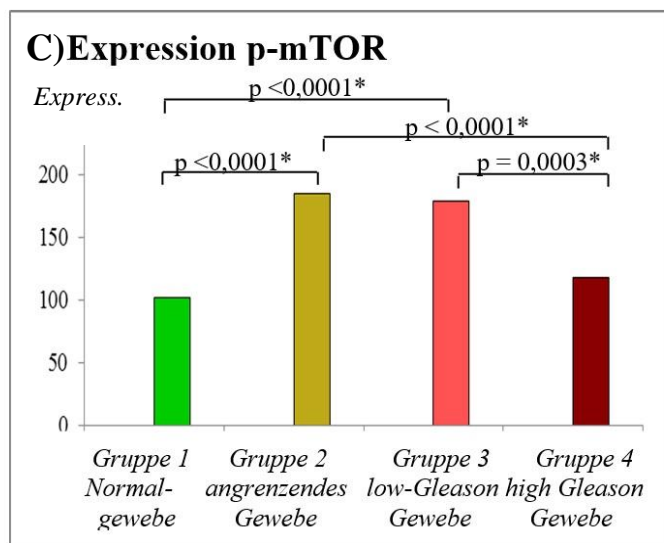
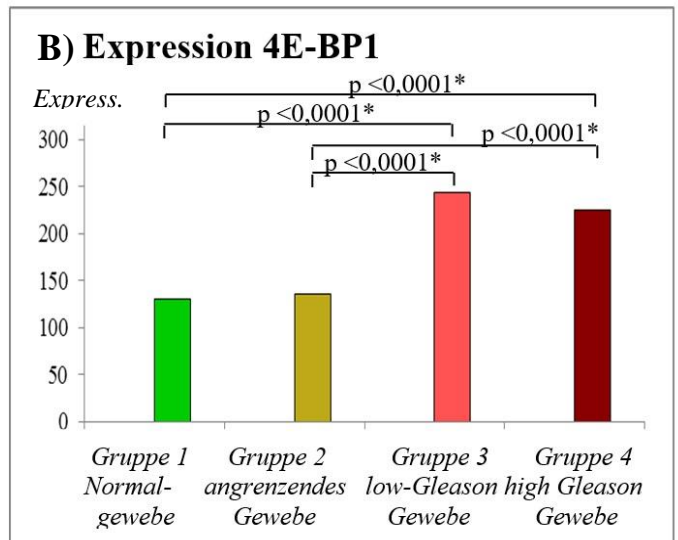
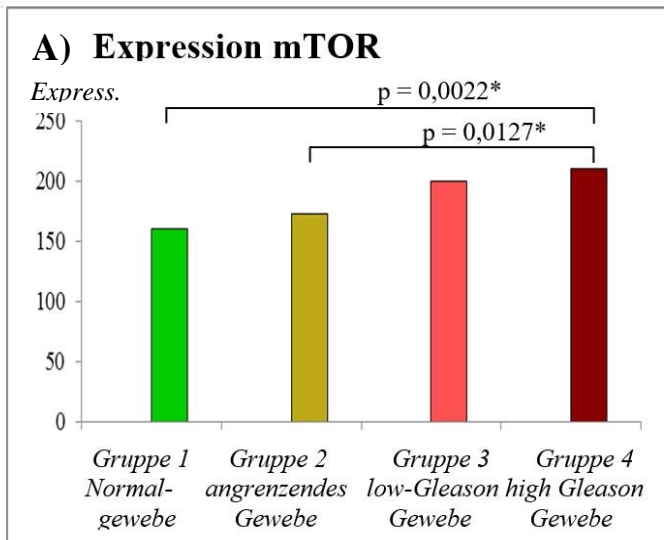
Die mediane Färbeintensität von *mTOR* war im High-Gleason PCA-Gewebe (Gruppe 4) mit 210,00 am größten und sowohl zu Prostata-Normalgewebe (Gruppe 1,  $p=0,0222^*$ ) als auch zu an Tumor angrenzendem Gewebe (Gruppe 2,  $p=0,0127^*$ ) signifikant größer. Dabei betrug die mediane Färbeintensität im Prostata-Normalgewebe 160,00, im an Tumor angrenzenden Gewebe 173,00, im high-Gleason-Gewebe (Gruppe 4) 210,00 und im low-Gleason-Gewebe (Gruppe 3) 200,00 (s. Abbildung 3.12 A).

Die mediane Färbeintensität von *p-mTOR* war mit 185,00 am größten in an Tumor angrenzendem Gewebe (Gruppe 2), dicht gefolgt von low-Gleason-Gewebe (Gruppe 3) mit 178,75. Dahingegen betrug die mediane Färbeintensität im high-Gleason-Gewebe (Gruppe 4) nur 117,50 und im Prostata-Normalgewebe (Gruppe 1) lediglich 102,00.

Es bestanden signifikante Unterschiede zwischen Gruppe 1 und 2 ( $p<0,0001^*$ ), Gruppe 1 und 3 ( $p<0,0001^*$ ), Gruppe 2 und 4 ( $p<0,0001^*$ ) und Gruppe 3 und 4 ( $p=0,0003^*$ , s. Abbildung 3.12 C).

Auch der Quotient der Färbeintensitäten von *p-mTOR/mTOR* zeigte weitere signifikante Unterschiede. Auch hier war die größte mediane Expression in Gruppe 2 mit 1,02 gefolgt von Gruppe 3 mit 0,90, Gruppe 1 mit 0,62 und Gruppe 4 mit 0,61. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen Gruppe 1 und 2 ( $p<0,0001^*$ ), Gruppe 1 und 3 ( $p=0,0168^*$ ), Gruppe 2 und 4 ( $p<0,0001^*$ ) und Gruppe 3 und 4 ( $p=0,0003^*$ , s. Abbildung 3.12 E).

Bei *4E-BP1* war die mediane Färbeintensität bei Gruppe 3 am größten und betrug 243,75. Gruppe 4 folgte mit 225, Gruppe 2 mit 135,00 und Gruppe 1 mit 130,00. Signifikante Unterschiede mit einem jeweiligen Signifikanzniveau von  $p<0,0001^*$  bestanden zwischen Gruppe 1 und 3, Gruppe 1 und 4 sowie zwischen Gruppe 2 und 3 und Gruppe 2 und 4 (s. Abbildung 3.12 B).



**Abbildung 3.12 A-F: Vergleich der medianen Proteinexpressionen bzw. der Quotienten zwischen Normalgewebe, Tumorinvasionsfront, low- und high-Gleason Gewebe:**

Proteinexpression von mTOR (A), p-mTOR (C), 4E-BP1 (B) und p-4E-BP1 (D) sowie die Expressionen der Quotienten von p-mTOR/mTOR (E) und p-4E-BP1/4E-BP1 (F) der Gruppe 1 (Prostata Normalgewebe), Gruppe 2 (Tumorinvasionsfront), Gruppe 3 (low-Gleason-PCA) und Gruppe 4 (high-Gleason-PCA). Express.: Expression. Expression angegeben anhand der medianen Färbeintensität.

War für Gruppe 2 bei 4E-BP1 die mediane Färbeintensität noch am geringsten, so war sie für p-4E-BP1 mit 165,25 am höchsten. Gruppe 1 hatte mit 125,00 die zweithöchste medianen Färbeintensität. Gruppe 3 bzw. Gruppe 4 wiesen Färbeintensitäten von 115,60 bzw. 100,00 auf. Signifikanzen bestanden zwischen Gruppe 1 und 2 ( $p=0,0027^*$ ) sowie zwischen Gruppe 1 und 4 ( $p=0,0329^*$ ), Gruppe 2 und 3 ( $p<0,0001^*$ ) und Gruppe 2 und 4 ( $p<0,0001^*$ ).

Auch der Quotient der Färbeintensitäten von p-4E-BP1/4E-BP1 zeigte signifikante Unterschiede. Auch hier war die größte mediane Expression mit 1,61 in Gruppe 2 gefolgt von Gruppe 1 mit 1,24, Gruppe 4 mit 0,56 und Gruppe 3 mit 0,59. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen Gruppe 1 und 3 ( $p=0,0292^*$ ), Gruppe 2 und 3 ( $p<0,0001^*$ ) sowie zwischen Gruppe 2 und 4 ( $p<0,0001^*$ ).

### 3.5.2 Einfluss des Tumorstadiums auf die Proteinexpression des am Tumor angrenzenden Normalgewebes

Bei der Gegenüberstellung der Expressionen von Normalgeweben angrenzend einerseits an low-Gleason und andererseits an high-Gleason organbegrenzter PCAs, zeigten sich die in Abbildung 3.13 dargestellten Ergebnisse:

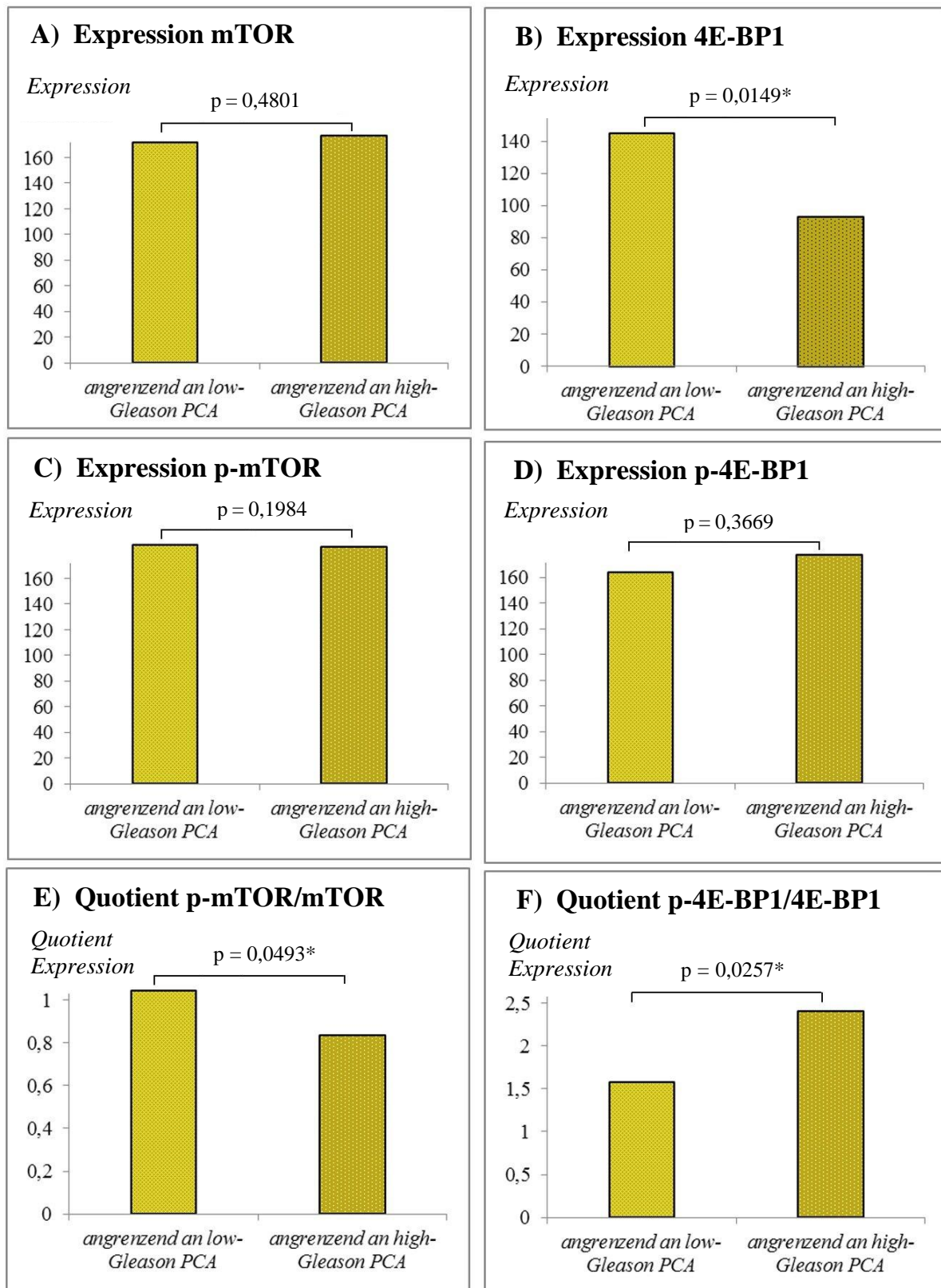
Signifikante Unterschiede lagen dabei für den Quotienten p-mTOR/mTOR, 4E-BP1 und den Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1 vor. Die genauen p-Werte sowie die Mediane der einzelnen Proteinparameter sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Keinen signifikanten Einfluss nahm dahingegen das Tumorstadium (organbegrenzt, organüberschreitend) auf die Proteinexpressionen der angrenzenden Gewebe.

Proteinparameter	Mediane Expressionen der Tumorinvasionsfront von low-Gleason PCAs	Mediane Expressionen der Tumorinvasionsfront von high-Gleason PCAs	p-Wert
<b>mTOR</b>	171,50	177,00	0,4801
<b>p-mTOR</b>	186,00	185,00	0,1934
<b>p-mTOR/mTOR</b>	1,05	0,83	0,0493*
<b>4E-BP1</b>	145,00	93,00	0,0149*
<b>p-4E-BP1</b>	164,30	177,50	0,3669
<b>p-4E-BP1/4E-BP1</b>	1,52	2,41	0,0257*

**Tabelle 7: Darstellung der medianen Proteinexpressionen der Tumorinvasionsfront von low- und high-Gleason PCAs.**

Es erfolgt die Angabe des Signifikanzniveaus der Unterschiedlichkeit zwischen beiden Geweben. Mit einem Stern gekennzeichnete Werte sind signifikant ( $p<0,05$ ).



**Abbildung 3.13 A-F: Vergleich der medianen Proteinexpressionen bzw. der Quotienten innerhalb der Tumorinvasionsfront.**

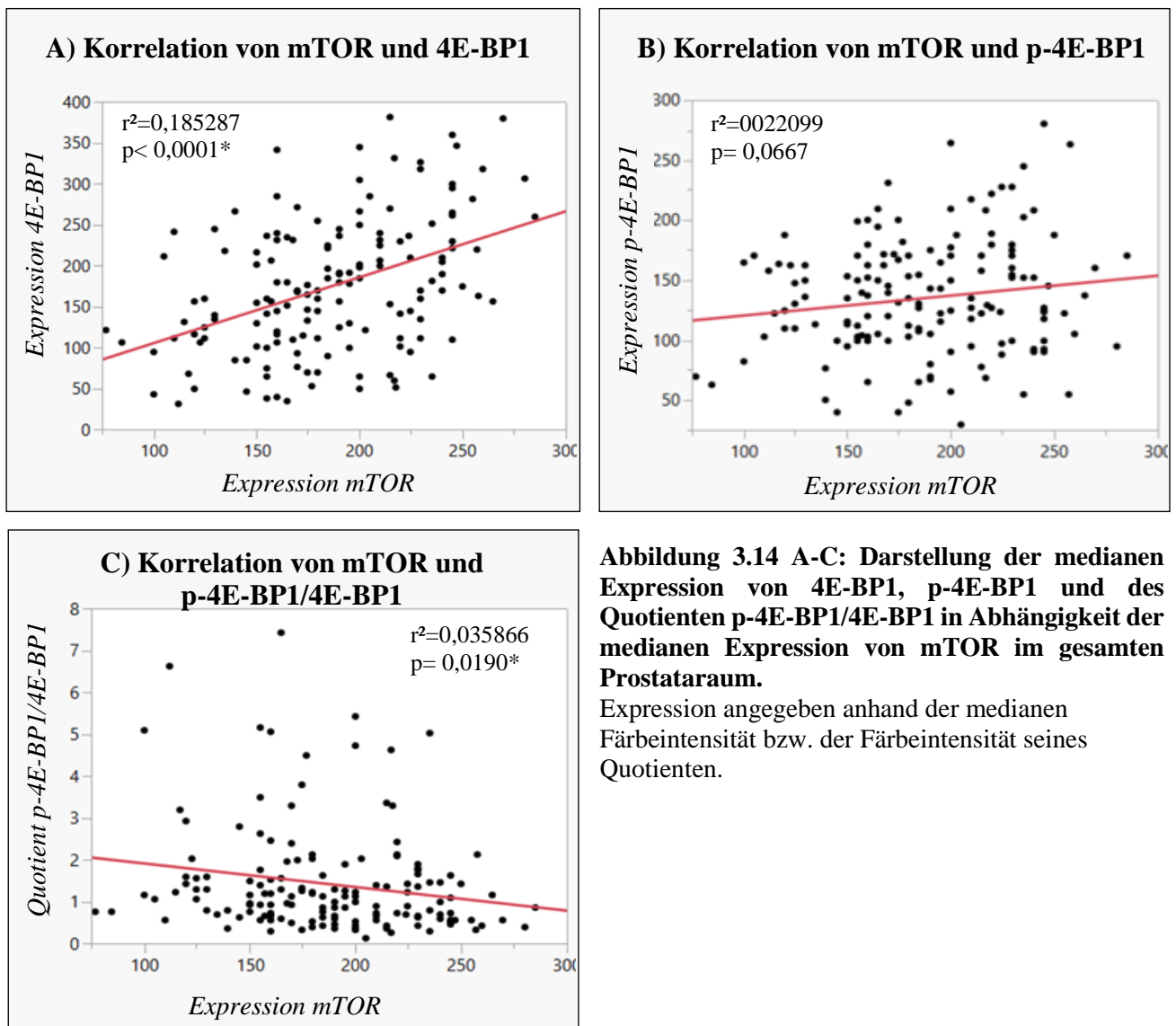
Vergleich der angrenzenden Gewebe an low- bzw. an high-Gleason Tumore hinsichtlich der mTOR Expression (A), der p-mTOR Expression (C), der 4E-BP1 Expression (B), der p-4E-BP1 Expression (D) sowie des Quotienten der Expression von p-mTOR/mTOR (E) und p-4E-BP1/4E-BP1 (F). Expression angegeben anhand der medianen Färbeintensität.

### 3.6 Interaktionen der Proteinparameter vor dem Hintergrund einer Signaltransduktion

#### 3.6.1 Interaktion von mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und Quotienten im gesamten Prostata-Raum

Im Folgenden wurde die Interaktion der Expression von mTOR mit den nachgeschalteten Expressionen von 4E-BP1, seiner phosphorylierten Form sowie des Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1 dargestellt.

Dabei zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen der mTOR- und 4E-BP1-Expression ( $r^2=0,18529$ ,  $p<0,0001^*$ ,  $n=155$ ,  $4E-BP1=26,28 + 0,80*mTOR$ , s. Abbildung 3.14 A), sowie der mTOR-Expression und dem Quotienten aus p-4E-BP1/4E-BP1 ( $r^2=0,0458$ ,  $p=0,0190^*$ ,  $n=153$ ,  $Quotient= 2,50 -0,01*mTOR$ , s. Abbildung 3.14 C).



**Abbildung 3.14 A-C: Darstellung der medianen Expression von 4E-BP1, p-4E-BP1 und des Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1 in Abhängigkeit der medianen Expression von mTOR im gesamten Prostataraum.**

Expression angegeben anhand der medianen Färbeintensität bzw. der Färbeintensität seines Quotienten.

Keine signifikante, jedoch berichtenswerte Korrelationen bestand zwischen mTOR und p-4E-BP1 ( $r^2=0,02210$ ,  $p=0,0667$ ,  $n=153$ ,  $p\text{-}4\text{E-BP1}=104,55 + 0,17*\text{mTOR}$ , s. Abbildung 3.14 B).

Im Weiteren wurde eine Dichotomisierung aller in 3.6.1 genannten Proteinparameter in  $\leq$ Median und  $>$ Median vorgenommen und gegeneinander abgetragen.

Es bestätigten sich dabei die signifikanten Ergebnisse für die Interaktion von mTOR mit 4E-BP1 und mit dem Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1, eine signifikante Interaktion zwischen mTOR und p-4E-BP1 konnte nicht gezeigt werden.

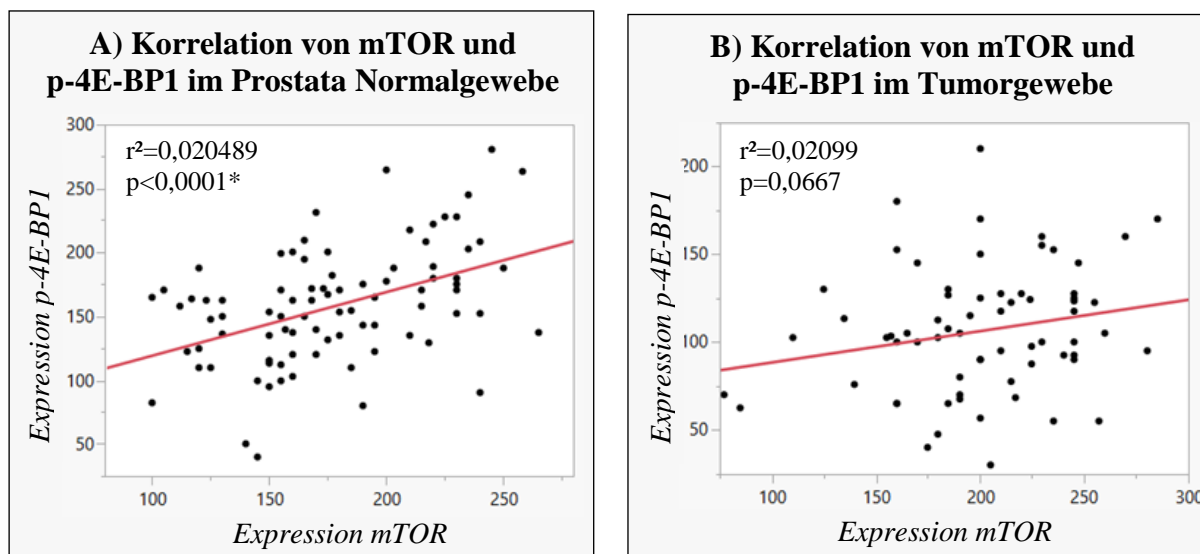
### 3.6.1.1 Interaktion von mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und Quotienten im Normal- und

#### Tumorgewebe

In den **Normalgeweben** bestanden signifikante Zusammenhänge zwischen mTOR und 4E-BP1 ( $p=0,0276*$ ,  $r^2=0,0552$ ,  $n=88$ ,  $4\text{E-BP1}=78,06 + 0,30*\text{mTOR}$ ) sowie zwischen mTOR und p-4E-BP1 ( $p<0,0001$ ,  $r^2=0,2049$ ,  $n=86$ ,  $p\text{-}4\text{E-BP1}=70,04 + 0,50*\text{mTOR}$ ). Die Expression von mTOR und p-4E-BP1/4E-BP1 interagierten nicht signifikant ( $p=0,7422$ ), auch nicht bei Dichotomisierung beider Parameter im Median.

Betrachtete man die Korrelation von mTOR und den nachgeschalteten Proteinparametern im **Tumorgewebe**, so zeigte sich Folgendes: Eine signifikante Korrelation bestand hier ebenfalls zwischen mTOR und 4E-BP1 ( $p<0,0001*$ ,  $r^2=0,2021$ ,  $n=67$ ,  $4\text{E-BP1}=80,87 + 0,77*\text{mTOR}$ ). Jedoch bestanden keine signifikanten Korrelationen zwischen mTOR und p-4E-BP1 sowie zwischen mTOR und p-4E-BP1/4E-BP1, auch nicht bei Dichotomisierung beider Parameter im Median.

Festzuhalten ist, dass Korrelationen zwischen mTOR und 4E-BP1 sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe bestanden. Eine signifikante Korrelation zwischen der mTOR und p-4E-BP1 Expression jedoch ausschließlich im Prostata-Normalgewebe zu sehen war (s. Abbildung 3.15 A-B).



**Abbildung 3.15 A-B: Korrelation der mTOR- und p-4E-BP1-Expression in Geweben unterschiedlicher Dignität.**

Darstellung der Korrelation der Expressionen von mTOR und 4E-BP1 im Normalgewebe (A) n=86 und im Tumorgewebe (B) n=67. Expression angegeben anhand der medianen Färbeintensität.

### 3.6.1.2 Interaktion von mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und Quotienten im benignen-, im an Tumor angrenzenden Gewebe, sowie im low- und high-Gleason-Gewebe

Die Korrelation der Expression der Proteinparameter mTOR gegenüber 4E-BP1, p-4E-BP1 und p-4E-BP1/4E-BP1 für Prostatanormalgewebe, an Tumore angrenzende sowie low-Gleason und high-Gleason PCA-Gewebe ergab folgende Ergebnisse:

Im **benignen Gewebe** bestand eine Korrelation zwischen der Expression von mTOR zu 4E-BP1 ( $r^2=0,2229$ ,  $p=0,0307^*$ ,  $n=21$ ,  $4E-BP1=18,79 + 0,68*mTOR$ ) und von mTOR zu p-4E-BP1 ( $r^2=0,2083$ ,  $p=0,0376^*$ ,  $n=21$ ,  $p-4E-BP1=39,05 + 0,56*mTOR$ ). Keine Korrelation bestand zwischen mTOR und p-4E-BP1/4E-BP1, auch nicht, wenn eine Dichotomisierung beider Parameter im Median vorgenommen wurde.

Im **an Tumor angrenzenden Gewebe** bestand lediglich eine Korrelation zwischen der Expression von mTOR und p-4E-BP1 ( $r^2=0,1776$ ,  $p=0,0005^*$ ,  $n=65$ ,  $p-4E-BP1=89,46 + 0,43*mTOR$ ). Keine Korrelationen bestanden zwischen mTOR und 4E-BP1 sowie zwischen mTOR und p-4E-BP1/4E-BP1, selbst dann nicht, wenn beide Parameter im Median dichotomisiert wurden.

Im **low-Gleason PCA-Gewebe** bestand nur eine Korrelation zwischen mTOR und 4E-BP1 ( $r^2=0,2991$ ,  $p=0,0012^*$ ,  $n=32$ ,  $4E-BP1=105,80 + 0,73*mTOR$ ). Im **high-Gleason PCA-Gewebe**

bestand ebenfalls nur zwischen mTOR und 4E-BP1 eine Korrelation ( $r^2=0,2145$ ,  $p=0,0051^*$ ,  $n=35$ ,  $4E-BP1=36,49 + 0,91*mTOR$ ).

Keine Korrelationen für beide Gewebe bestanden zwischen den anderen beiden Parametern, auch dann nicht, wenn eine Dichotomisierung der Parameter im Median vorgenommen wurde.

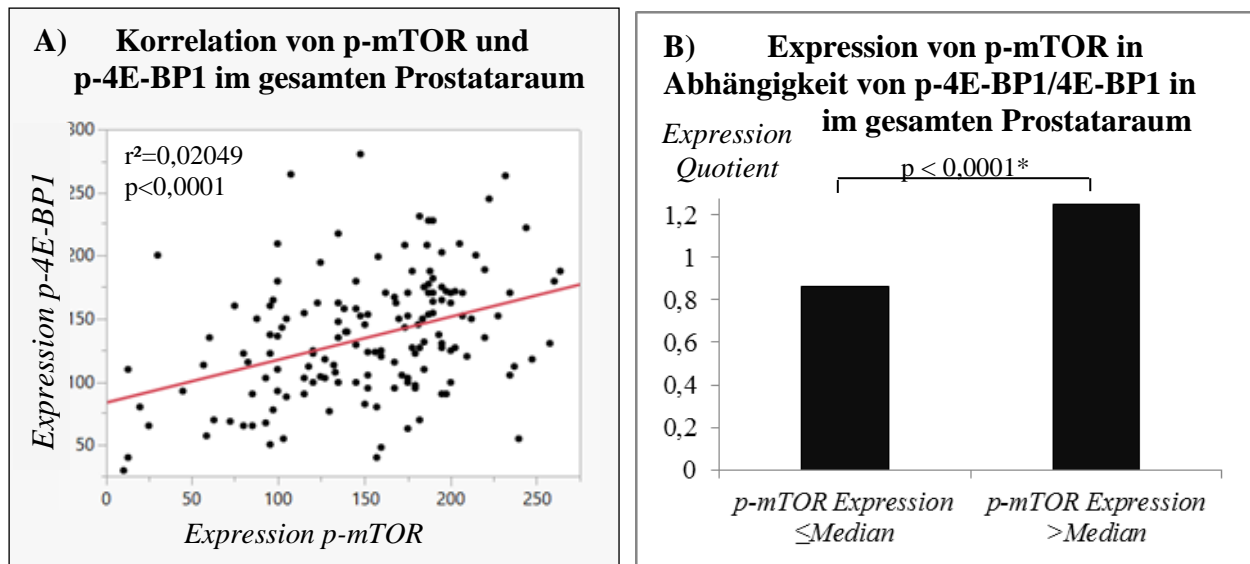
Somit bestand die Korrelation zwischen mTOR und 4E-BP1 sowohl im low-Gleason-, high-Gleason- als auch im Normalgewebe, jedoch nicht im am Tumor angrenzenden Gewebe. Ebenfalls vergebens war dort der Versuch eine Interaktion zwischen mTOR und p-4E-BP1 festzustellen, welche noch im Normalgewebe existierte.

### **3.6.2 Interaktion von p-mTOR mit 4EB1, p-4E-BP1 und Quotienten im gesamten Prostataraum**

Die Interaktion der Expression von p-mTOR mit den nachgeschalteten Expressionen von 4E-BP1, seiner phosphorylierten Form sowie des Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1 ergaben folgende Resultate: Signifikante Korrelationen bestanden nur zwischen der p-mTOR- und p-4E-BP1-Expression ( $r^2=0,1464$ ,  $p<0,0001^*$ ,  $n=153$ ,  $p-4E-BP1=84,06 + 0,34*p-mTOR$ , s. Abbildung 3.16 A).

Keine Signifikanzen bestanden zwischen den Expressionen von p-mTOR und p-4E-BP1. Bei Dichotomisierung aller in 3.6.2 genannten Proteinparameter im Median gab es folgende signifikante ( $p<0,0001^*$ ) Interaktion von p-mTOR. Bei p-mTOR Werten  $>Median$  lag die mediane p-4E-BP1/4E-BP1 Expression bei 1,24, hingegen bei p-mTOR-Werten  $\leq Median$  nur bei 0,86 (s. Abbildung 3.16 B).





**Abbildung 3.16 A-B: Darstellung der medianen Proteinexpression von p-4E-BP1 bzw. des Quotienten in Abhängigkeit der medianen p-mTOR Expression im gesamten Prostataraum.**

- A)** Darstellung der Korrelation der medianen Expression von p-4E-BP1 mit der medianen Expression von p-mTOR.
- B)** Darstellung der medianen Expression von p-4E-BP1/4E-BP1 in Abhängigkeit der im Median dichotomisierten Expression von p-mTOR.  
Expression angegeben anhand der medianen Färbeintensität.

### 3.6.2.1 Interaktion von p-mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und Quotienten im Normal- und Tumorgewebe

In den *Normalgeweben* bestand nur eine signifikante Interaktion zwischen der medianen Expression von p-mTOR und p-4E-BP1 ( $p=0,0014^*$ ,  $r^2=0,1153$ ,  $n=86$ ,  $p-4E-BP1=110,04 + 0,30 \cdot p-mTOR$ ). Die Expression von p-mTOR und 4E-BP1 sowie von p-mTOR und p-4E-BP1/4E-BP1 interagierten nicht signifikant.

Auch im *Tumorgewebe* bestand genau wie im Normalgewebe eine signifikante Interaktion zwischen p-mTOR und p-4E-BP1 ( $r^2=0,1202$ ,  $p=0,0040^*$ ,  $n=67$ ,  $p-4E-BP1=76,15 + 0,22 \cdot p-mTOR$ ).

Keine signifikante Korrelation bestanden, auch bei Dichotomisierung der Parameter im Median, zwischen p-mTOR und 4E-BP1 sowie p-mTOR und p-4E-BP1/4E-BP1.

### 3.6.2.2 Interaktion von p-mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und dem Quotienten

p-4E-BP1/4EBP im benignen-, im an Tumor angrenzenden-, sowie im low-Gleason- & high-Gleason-Gewebe

Im **benignen Gewebe, im an Tumor angrenzenden Gewebe** sowie für **low-Gleason-PCA-Gewebe** gab es keine signifikanten Interaktionen der Expression von p-mTOR mit seinen nachgeschalteten Proteinen – auch nicht nach Dichotomisierung.

Lediglich die Korrelation von p-mTOR mit p-4E-BP1 in **high-Gleason-Gewebe** war signifikant ( $r^2=0,1422$ ,  $p=0,0255^*$ ,  $n=35$ ,  $p-4E-BP1=71,01 + 0,26^* p-mTOR$ ).

### **3.6.3 Interaktion vom Quotienten p-mTOR/mTOR mit 4EB1, p-4E-BP1 und Quotienten**

Die Interaktion der Expression vom Quotienten p-mTOR/mTOR war mit allen nachgeschalteten Expressionen signifikant:

mit der Expression von 4E-BP1 ( $r^2=0,0785$ ,  $p=0,0004^*$ ,  $n=155$ ,  $4E-BP1=230,61-62,94^*p-mTOR/mTOR$ ), mit der Expression von p-4E-BP1 ( $r^2=0,0471$ ,  $p=0,0071^*$ ,  $n=153$ ,  $p-4E-BP1=110,87 + 29,33^*p-mTOR/mTOR$ ) sowie mit der Expression des Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1 ( $r^2=0,0482$ ,  $p=0,0064^*$ ,  $n=153$ ,  $p-4E-BP1/4E-BP1=0,77 + 0,79^* p-mTOR/mTOR$ ).

#### 3.6.3.1 Interaktion vom Quotienten p-mTOR/mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und Quotienten im Normal- und Tumorgewebe

Verglich man die Expression des Quotienten p-mTOR/mTOR im **Normalgewebe** und im **Tumorgewebe**, erhielt man keine signifikanten Korrelationen, auch wenn eine Dichotomisierung der in 3.6.3.1 genannten Parameter im Median vorgenommen wurde. Fast ( $p=0,0651$ ,  $r^2=0,0514$ ,  $n=67$ ) korrelierten beide Quotienten im Tumorgewebe negativ miteinander.

#### 3.6.3.2 Interaktion vom Quotienten p-mTOR/mTOR mit 4E-BP1, p-4E-BP1 und Quotienten im benignen-, an Tumor angrenzenden, sowie im low- und high Gleason-Gewebe

Der Vergleich der Interaktionen der Expressionen vom Quotienten p-mTOR/mTOR mit den ihm nachgeschalteten Parametern erbrachte für **benignes, an Tumor angrenzende Gewebe**

sowie für *high-Gleason-PCA-Gewebe* keine signifikanten Korrelationen, auch nicht bei Dichotomisierung der in 3.6.2.2 genannten Parameter im Median. Im high Gleason-Gewebe bestand jedoch fast eine positive signifikante Korrelation zwischen beiden Quotienten ( $r^2=0,0991$ ,  $p=0,0655$ ,  $n=35$ )

Lediglich für *low-Gleason-PCA-Gewebe* bestanden signifikante Korrelationen zwischen dem Quotienten p-mTOR/mTOR und 4E-BP1 ( $r^2=0,3287$ ,  $p=0,0006^*$ ,  $n=32$ ,  $4E-BP1=324,57 - 86,62 \cdot p\text{-mTOR/mTOR}$ ) und zwischen dem Quotienten p-mTOR/mTOR und dem Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1 ( $r^2=0,1434$ ,  $p=0,0326^*$ ,  $n=32$ ,  $p\text{-4E-BP1/4E-BP1}= 0,41 + 0,26 \cdot p\text{-mTOR/mTOR}$ ). Keine signifikante Interaktion bestand zwischen dem Quotienten p-mTOR/mTOR und p-4E-BP1.

### 3.6.4 Übersicht über die Interaktionen auf Protein-Niveau in Abhängigkeit des Gewebes

A) Gewebe-übergreifend	mTOR	p-mTOR	p-mTOR /mTOR
4E-BP1	Ja p=0,0001 +	X p=0,5409 -	Ja p=0,0004 -
p-4E-BP1	X p=0,0667 +	Ja p=0,0001 +	Ja p=0,0071 +
p-4E-BP1 /4E-BP1	Ja p=0,0311 -	Ja* p=0,1142 +	Ja p=0,0122 +

B) Normal-Gewebe	mTOR	p-mTOR	p-mTOR /mTOR
4E-BP1	Ja p=0,0276 +	X p=0,1410 +	X p=0,9409 -
p-4E-BP1	Ja p=0,0001 +	Ja p=0,0014 +	X p=0,8700 +
p-4E-BP1 /4E-BP1	X p=0,9415 -	X p=0,8475 +	X p=0,7771 +

C) Tumor-gewebe	mTOR	p-mTOR	p-mTOR /mTOR
4E-BP1	Ja p=0,0001 +	X p=0,6724 +	X p=0,0651 -
p-4E-BP1	X p=0,0820 +	Ja p=0,0040 +	X p=0,1715 +
p-4E-BP1 /4E-BP1	X p=0,1830 -	X p=0,4415 +	X p=0,1566 +

D) benignes Gewebe	mTOR	p-mTOR	p-mTOR /mTOR
4E-BP1	Ja p=0,0307 +	X p=0,1127 +	X p=0,5065 +
p-4E-BP1	Ja p=0,0376 +	X p=0,4544 +	X p=0,8583 -
p-4E-BP1 /4E-BP1	X p=0,5119 -	X p=0,1450 -	X p=0,2056 -

E) low-Gleason-PCA Gewebe	mTOR	p-mTOR	p-mTOR /mTOR
4E-BP1	Ja p=0,0012 +	X p=0,3699 -	Ja p=0,0006 -
p-4E-BP1	X p=0,2064 +	X p=0,1776 +	X p=0,9886 +
p-4E-BP1 /4E-BP1	X p=0,3320 -	X p=0,1019 +	Ja p=0,0326 +

F) Tumor-invasionsfront	mTOR	p-mTOR	p-mTOR /mTOR
4E-BP1	X p=0,1190 +	X p=0,2183 +	X p=0,6182 -
p-4E-BP1	Ja p=0,0005 +	X p=0,2005 +	X p=0,0615 -
p-4E-BP1 /4E-BP1	X p=0,8174 -	X p=0,3257 -	X p=0,6839 -

G) high-Gleason-PCA Gewebe	mTOR	p-mTOR	p-mTOR /mTOR
4E-BP1	Ja p=0,0051 +	X p=0,6371 +	X p=0,2692 -
p-4E-BP1	X p=0,1317 +	Ja p=0,0255 +	X p=0,1179 +
p-4E-BP1 /4E-BP1	X p=0,2220 -	X p=0,4205 -	X p=0,0655 +

**Tabelle 8: Übersicht über signifikante Korrelationen auf Proteinebene.**

Darstellung signifikanter Korrelationen (*positive + oder negative -*), mit Angabe des Signifikanzniveaus (p=) zwischen der Proteinexpression von mTOR, p-mTOR, p-mTOR/mTOR und den Proteinexpressionen der nachgeschalteten Parameter 4E-BP1, p-4E-BP1, p-4E-BP1/4E-BP1 in den verschiedenen Geweben: Gewebeübergreifend (A), Tumorgewebe (B), Normalgewebe (C), benignes Gewebe (D) Tumorinvasionsfront (F), low-Gleason-PCA-Gewebe (E) und high-Gleason-PCA-Gewebe (G).

Farbliche Kodierung: **Grün**: signifikante Korrelation; **Gelb**: fast signifikante Korrelation; **Rot**: keine signifikante Korrelation. \*Signifikanzen erst nach Dichotomisierung im Median

### 3.7 Interaktionen auf unterschiedlicher Regulationsebene vor dem Hintergrund einer Signaltransduktion

Im Folgenden wurden mRNA- und Proteinexpressionen der unterschiedlichen Parameter des Gesamt-Patientenkollektivs gegeneinander abgetragen und dichotomisiert: mRNA im Median und 25%,75% Quartil, die Proteinexpressionen im Median.

#### 3.7.1 Auswirkung der mTOR-mRNA Expression auf die Proteinexpression von mTOR, p-mTOR und Quotient, 4E-BP1 und p-4E-BP1 und Quotient

Verglich man die Expression der mTOR-mRNA mit der Expression der nachgeschalteten Proteine, ergaben sich signifikante Interaktionen zu der Proteinexpression von p-mTOR und p-mTOR/mTOR:

Eine erwähnenswerte negative, jedoch nicht signifikante Korrelation bestand zwischen der mTOR-mRNA und der p-mTOR Proteinexpression ( $p=0,0905$   $r^2=0,2784$   $n=104$ ). Bei Dichotomisierung der mRNA-Expression zeigte sich, dass die **p-mTOR Expression** signifikant ( $p=0,0399^*$ ) geringer war, sofern die mRNA-Expression  $>$ Median war. (mRNA $\leq$ Median: mediane p-mTOR Proteinexpression=173,35; mRNA $>$ Median: mediane Proteinexpression=140,00).

Trug man beide Parameter im Median dichotomisiert gegeneinander ab, wurde obige Aussage mit einem Likelihood-Verhältnis von  $p=0,0485^*$  bestätigt. (Bei 55,7% (29/52) lag eine übermediane Proteinexpression vor, sofern mRNA-Expression $\leq$ Median war, wohingegen lediglich 36,54% (19/52) derjenigen mit einer mRNA-Expression $>$ Median auch eine übermediane Proteinexpression zeigten).

Auch bei im 25% Quartil dichotomisierter mRNA wurden signifikante Ergebnisse mit gleicher Aussage erzielt. (Bei mRNA $\leq$ 25% lag die mediane p-mTOR Proteinexpression bei 175,00, bei mRNA $>$ 25% lag die mediane Proteinexpression bei 151,00,  $p=0,0278^*$ ). Das Likelihood-Verhältnis für im 25% Quartil dichotomisierte mRNA betrug für die 4 Felder-Tafel  $p=0,0227^*$ . (Bei 65,38% (17/26) lag eine übermediane Proteinexpression vor, wenn mRNA $\leq$ 25%war. Dies war lediglich bei 39,74% (31/78) der Fall, sofern die mRNA $>$ 25% betrug).

Auch zwischen der mTOR-mRNA und **p-mTOR/mTOR-Expression** lag ein signifikanter ( $p=0,0467^*$ ) Zusammenhang vor. Bei mRNA Expression von $\leq$ 25% betrug der Median des Quotienten 1,00. War die mRNA Expression  $>$ 25%, so lag die mediane Proteinexpression des Quotienten bei 0,83.

Keine Interaktionen bestanden zwischen mTOR-mRNA und der Proteinexpression von mTOR, 4E-BP1, p-4E-BP1 und dem Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1.

3.7.1.1 Auswirkungen der mTOR-mRNA Expression auf nachgeschaltete Proteinparameter – Vergleich im Normal- und Tumorgewebe

Im *Normalgewebe* bestand lediglich eine signifikante Interaktion zwischen der mTOR-mRNA und der Expression des **Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1**:

Bei mRNA-Expression  $\leq 25\%$  war die mediane Proteinexpression des Quotienten mit 1,78 signifikant größer ( $p=0,0450^*$ ) als für mRNA  $>25\%$  (mediane Proteinexpression bei 1,30). Keine signifikanten Interaktionen gab es für die anderen Proteinparameter. Dennoch konnte zwischen mTOR-mRNA und p-4E-BP1-Proteinexpression eine fast signifikante ( $p=0,0722$ ) negative Korrelation mit  $r^2=0,0547$  festgestellt werden.

Signifikante Interaktionen im *Tumorgewebe* bestanden zwischen mTOR-mRNA und p-mTOR-Proteinexpression, sowie der Proteinexpression des Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1. Für die **p-mTOR-Proteinexpression** galt mit einem Likelihood-Verhältnis von  $p=0,0191^*$ , dass bei 69,23% (9/13) eine übermediane Expression vorlag, sofern die mRNA-Expression  $\leq 25\%$  betrug. War sie  $>25\%$ , so hatten nur 10/32 (31,25%) eine übermediane p-mTOR Proteinexpression ( $n=45$ .)

Die gleiche Aussagetendenz mit einem Likelihood-Verhältnis von  $p=0,0566$  bestand bei Dichotomisierung von mRNA und Proteinexpression im Median.

Für die Interaktion zwischen mTOR-mRNA und der **p-4E-BP1/4E-BP1-Proteinexpression** betrug das Likelihood-Verhältnis  $p=0,0441^*$  ( $n=41$ ). So hatten 23,08% (3/13) eine übermediane Proteinexpression, sofern die mRNA  $\leq 25\%$  war, wohingegen dies nur 3,13% (1/32) bei einer mRNA-Expression von  $>25\%$  zu beobachten war.

Keine Signifikanzen gab es bei mTOR, p-mTOR/mTOR, 4E-BP1 und p-4E-BP1.

Fast signifikant ( $p=0,0544$ ) war das Verhältnis von mTOR-mRNA und p-mTOR/mTOR-Proteinexpression. Betrug die mRNA  $\leq 25\%$ , so lag der Median der Proteinexpression bei 0,90 und für mRNA  $>25\%$  bei 0,87354.

3.7.1.2 Auswirkungen der mTOR-mRNA auf nachgeschaltete Proteinparameter – Vergleich im Normal-, angrenzenden, low- und high-Gleason-PCA-Gewebe

Für **Normalgewebe** bestanden keine nennenswerten Interaktionen.

Bei an **Tumor angrenzendem Gewebe** bestand nur eine signifikante Interaktion zwischen mTOR-mRNA und dem Quotienten der **p-4E-BP1/4E-BP1-Proteinexpression**. Betrachtete man im 25%Quartil dichotomisierte mRNA, so betrug der signifikante ( $p=0,0260^*$ ) Unterschied der medianen Proteinexpressionen 1,98 ( $mRNA \leq 25\%$ ) gegenüber 1,32 ( $mRNA > 25\%$ ).

Nicht signifikant, aber dennoch erwähnenswert ist die negative Korrelation zwischen mTOR-mRNA und der p-4E-BP1-Expression,  $p=0,0913$ ,  $r^2=0,0793$ ,  $n=37$ .

Bei **low-Gleason-PCA** bestanden nennenswerte und signifikante Interaktionen zwischen mTOR-mRNA und der **p-mTOR-Proteinexpression**: So korrelierte die mRNA positiv mit der medianen p-mTOR Proteinexpression,  $p=0,0552$   $r^2=0,1983$ .

Signifikant wurde die Interaktion bei Dichotomisierung der mRNA 75%Quartil. So lag die mediane p-mTOR Proteinexpression bei 178,00 ( $mRNA \leq 75\%$ ), wohingegen sie 223,75 betrug sofern die  $mRNA > 75\%$  war ( $p=0,0081^*$ ,  $n=20$ ).

Auch wenn sie nicht signifikant war ( $p=0,1118$ ), korrelierte die mTOR-mRNA positiv mit der mTOR-Proteinexpression ( $r^2=0,1344$ ). Bei Dichotomisierung im der mRNA im Median betrug die mediane mTOR-Proteinexpression 190,00 für  $mRNA \leq \text{Median}$ , hingegen 220,00 bei  $mRNA > \text{Median}$  ( $p=0,0674$ ,  $n=20$ ).

Keine erwähnenswerte Interaktion gab es zwischen mTOR-mRNA und der Expression der Proteine von 4E-BP1, p-4E-BP1 sowie der Quotienten von p-mTOR/mTOR sowie p-4E-BP1/4E-BP1.

Bei **high-Gleason-PCA** und signifikante bestanden erwähnenswerte Korrelationen zwischen mTOR-mRNA und der Proteinexpression von mTOR sowie von p-mTOR.

So bestand sowohl eine negative Korrelation zwischen mTOR-mRNA und mTOR- ( $p=0,0855$   $r^2=0,1234$ ,  $n=25$ ) als auch der p-mTOR- Proteinexpression ( $p=0,2225$ ,  $r^2=0,0640$   $n=25$ ). Bei Dichotomisierung der mRNA im 25%Quartil wurde diese sichtbare Tendenz mit einem Likelihood-Verhältnis von  $p=0,0332^*$  für die **mTOR-Proteinexpression** signifikant. 100% (4/4) wiesen eine übermediane mTOR-Proteinexpression bei  $mRNA \leq 25\%$  auf. Betrug die  $mRNA > 25\%$  war dies nur bei 52,38% (11/21) der Fall.

Auch die mediane **p-mTOR Proteinexpression** war bei  $mRNA \leq 25\%$  größer und lag bei

152,50, hingegen nur bei 122,00 sofern die mRNA > 25% war ( $p=0,0495^*$   $n=25$ ).

Diese Aussage wurde weiter bestätigt, wenn die mTOR-mRNA im 75% Quartil dichotomisiert wurde. Mit einem Likelihood-Verhältnis von  $p=0,0322^*$  war bei mRNA  $\leq 75\%$  in 26,67% der Fälle (4/15) die Proteinexpression übermedian. Dies war nie der Fall (0/10) sofern eine mRNA-Expression von >75% betrachtet wurde.

Keine berichtenswerte Interaktionen bestanden zwischen mTOR-mRNA und der Proteinexpression von 4E-BP1, p-4E-BP1 sowie den Quotienten aus p-4E-BP1/4E-BP1 und p-mTOR/mTOR.

### 3.7.2 **Auswirkung der 4E-BP1 mRNA Expression auf die Proteinexpression von 4E-BP1 und p-4E-BP1 und Quotient**

Keine signifikanten Interaktionen bestanden beim gewebeübergreifenden Vergleich zwischen 4E-BP1-mRNA und den nachgeschalteten Proteinen. Erwähnenswert ist dennoch die negative Korrelation zwischen 4E-BP1-mRNA und der p-4E-BP1-Proteinexpression ( $p=0,1367$ ,  $r^2=0,0218$ ).

#### 3.7.2.1 *Auswirkungen der 4E-BP1-mRNA auf nachgeschaltete Proteinparameter - Vergleich im Normal- und Tumorgewebe*

Für Normalgewebe gab es für 4E-BP1 und p-4E-BP1 keine signifikante Interaktion mit 4E-BP1-mRNA.

Für den Quotienten **p-4E-BP1/4E-BP1** gab es jedoch mit dem Likelihood-Verhältnis von  $p=0,0131^*$  eine signifikante Interaktion. Bei Dichotomisierung der mRNA im 75% Quartil hatten 100% (10/10) eine übermediane Proteinexpression (4E-BP1-mRNA > 75%). Dies war lediglich bei 70,8% (34/48) der Fall, sofern die mRNA  $\leq 75\%$  betrug.

Für **Tumorgewebe** gab es weder für 4E-BP1 noch für den Quotienten p-4E-BP1/4E-BP1 nennenswerte Interaktionen mit der 4E-BP1-mRNA.

Nennenswert war die negative Korrelation ( $r^2=0,0553$ ,  $p=0,1200$ ) der 4E-BP1-mRNA mit der **p-4E-BP1-Proteinexpression**. Bei Dichotomisierung war die mediane Proteinexpression von p-4E-BP1 bei mRNA  $\leq 25\%$  mit 127,25 signifikant größer ( $p=0,04174^*$ ) als bei mRNA > 25%, wo sie nur bei 102,50 lag ( $n=45$ ).



3.7.2.2 Auswirkungen der 4E-BP1 mRNA auf nachgeschaltete Proteinparameter – Vergleich im Normal-, angrenzenden, low- und high-Gleason-PCA-Gewebe

Im **benignen Gewebe** gab es zwar keine Interaktionen zwischen der 4E-BP1-mRNA und der 4E-BP1-Proteinexpression, dafür jedoch signifikante Interaktionen mit der p-4E-BP1-Expression, sowie der Proteinexpression des Quotienten p-4EBP/4E-BP1.

Wurde im 75%Quartil dichotomisiert und betrug die mRNA $\leq$ 75% wurden bei 55,3% (10/18) eine übermediane **p-4E-BP1** Proteinexpressionen beobachtet, jedoch nie (0/3) bei mRNA $>$ 75%. Das Likelihood-Verhältnis betrug p=0,0374\* (n=21).

Eine übermediane Expression des **Quotienten** mit einem Likelihood-Verhältnis von p=0,0389\* bestand bei 87% (14/16) für mRNA $>$ 25%, hingegen nur bei 40% (2/5) für mRNA $\leq$ 25%.

Im **an Tumor angrenzenden Gewebe** bestand lediglich für den Quotienten eine signifikante mRNA-Protein-Interaktion. 100% (7/7) exprimierten bei mRNA $>$ 75% übermedian, lediglich 70% (21/30) bei mRNA $\leq$ 75%. Das Likelihood-Verhältnis lag bei p=0,0359\*.

Weder für **low-Gleason-** noch für **high-Gleason-PCA-Gewebe** bestanden Interaktionen zwischen mRNA und Proteinexpression.

3.7.3 Übersicht über die Interaktionen der mTOR- bzw.4E-BP1-mRNA mit den ihnen nachgeschalteten Proteinparametern in Abhängigkeit der Gewebe-Entität

A) Gewebe- übergreifend	mTOR mRNA	4E-BP1 mRNA
mTOR (Prot.)	X - p=0,6106	
p-mTOR (Prot.)	Ja - p=0,0905	
p-mTOR/mTOR (Prot.)	Ja - p=0,1239	
4E-BP1 (Prot.)	X + p=0,8658	X - 0,7195
p-4E-BP1 (Prot.)	X - p=0,1037	X - p=0,1676
p-4E-BP1/4E-BP1 (Prot.)	X - p=0,3640	X - p=0,8679

B) Normal-Gewebe	mTOR mRNA	4E-BP1 mRNA
mTOR mTOR (Prot.)	X - p=0,437	
p-mTOR mTOR (Prot.)	X - p=0,2291	
p-mTOR/mTOR (Prot.)	X - p=0,5071	
4E-BP1 (Prot.)	X + p=0,7908	X - p=0,5087
p-4E-BP1 (Prot.)	X - p=0,6030	X - p=0,7902
p-4E-BP1/4E-BP1 (Prot.)	Ja - p=0,3254	Ja + p=0,5607

C) Tumorgewebe	mTOR mRNA	4E-BP1 mRNA
mTOR (Prot.)	X - p=0,8445	
p-mTOR (Prot.)	Ja - p=0,2410	
p-mTOR/mTOR (Prot.)	X - p=0,1301	
4E-BP1 (Prot.)	X - p=0,9900	X - p=0,5024
p-4E-BP1 (Prot.)	X - p=0,4511	Ja - p=0,1200
p-4E-BP1/ 4E-BP1 (Prot.)	Ja - p=0,2927	X - p=0,4937

D) benignes Gewebe	mTOR mRNA	4E-BP1 mRNA
mTOR (Prot.)	X - p=0,8610	
p-mTOR (Prot.)	X - p=0,9180	
p-mTOR/mTOR (Prot.)	X - p=0,9977	
4E-BP1 (Prot.)	X + p=0,9125	X - 0,6862
p-4E-BP1 (Prot.)	X + p=0,5763	Ja - p=0,9856
p-4E-BP1/4E-BP1 (Prot.)	X - p=0,9894	Ja + p=0,9533

E) Low-Gleason- PCA Gewebe	mTOR mRNA	4E-BP1 mRNA
mTOR (Prot.)	X + p=0,1203	
p-mTOR (Prot.)	Ja + p=0,0565	
p-mTOR/mTOR (Prot.)	X - p=0,6911	
4E-BP1 (Prot.)	X + p=0,9114	X + p=0,8891
p-4E-BP1 (Prot.)	X + p=0,8619	X - p=0,2399
p-4E-BP1/ 4E-BP1 (Prot.)	X - p=0,9617	X - p=0,1799

<b>F) Tumor-invasionsfront</b>	mTOR mRNA	4E-BP1 mRNA
mTOR (Prot.)	X - p=0,4660	
p-mTOR (Prot.)	X + p=0,6960	
p-mTOR/mTOR (Prot.)	X + p=0,4391	
4E-BP1 (Prot.)	X + p=0,6362	X - p=0,6071
p-4E-BP1 (Prot.)	X - p=0,0765	X - p=0,7707
p-4E-BP1/ 4E-BP1 (Prot.)	Ja - p=0,4390	Ja + p=0,6461

<b>G) high-Gleason-PCA Gewebe</b>	mTOR mRNA	4E-BP1 mRNA
mTOR (Prot.)	Ja - p=0,0822	
p-mTOR (Prot.)	Ja - p=0,2271	
p-mTOR/mTOR (Prot.)	X - p=0,7745	
4E-BP1 (Prot.)	X + p=0,8134	X - p=0,4703
p-4E-BP1 (Prot.)	X - p=0,9184	X - p=0,9441
p-4E-BP1 /4E-BP1 (Prot.)	X - p=0,3377	X + p=0,4702

**Tabelle 9 Übersicht über die Interaktionen zwischen mRNA- und Protein-Niveau**

Überblick über signifikante Interaktionen (positive+ oder negative-) bei Dichotomisierung der mRNA (im Median sowie im 25% und 75% Quartil) und Dichotomisierung der Proteinexpression (nur im Median) zwischen mTOR-mRNA bzw. 4E-BP1-mRNA und der Proteinexpression (Prot.) der verschiedenen Geweben (gewebeübergreifendes Prostatagewebe (A), Normalgewebe (B), Tumorgewebe (C), benignes Gewebe (D), Gewebe der Tumorinvasionsfront (F), low-Gleason-PCA-Gewebe (E) und high-Gleason-PCA-Gewebe (G)). Es erfolgte die Angabe des Signifikanzniveaus (p=) bei direkter Korrelation der Expressionen. Farbliche Kodierung: **Dunkelgrün**: signifikante Interaktion (bei Dichotomisierung) und sichtbare direkte Korrelation ( $p < 0,25$ ); **Hellgrün**: signifikante Interaktion bei Dichotomisierung jedoch ohne ersichtliche Korrelation ( $p \geq 0,25$ ); **Gelb**: fast signifikante Korrelation, jedoch keine Interaktion bei Dichotomisierung; **Rot**: weder Interaktion noch Korrelation.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zielsetzung der Arbeit

Das erste Ziel der vorliegenden Dissertation war die Darstellung der Proteinparameter mTOR und 4E-BP1 sowie ihrer phosphorylierten Formen in verschiedenen histologischen Prostata-Gewebearten. Da zu einer Großzahl der Patienten in einer vorherigen Studie bereits mRNA Daten ermittelt wurden (Werner 2014), stellte die Auswertung und die Korrelation dieser Daten mit den Proteinexpressionen ein weiteres Ziel der Arbeit dar. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse aus den Korrelationen und Interaktionen zwischen mRNA und Proteindaten erfolgte eine genauere Evaluation der Regulationsmechanismen in der mTOR Signalkaskade hinsichtlich lokoregionärer Unterschiede. Man erhoffte sich, die Tumorevolution des Prostatakarzinoms besser verstehen und daraus gegebenenfalls klinisch relevante Erkenntnisse ableiten zu können.

Der Nachweis, dass das mTOR-System im PCA eine wichtige Rolle spielt, wurde bereits mehrfach erbracht (Siu et al. 2015; Sutherland et al. 2014; Bitting und Armstrong 2013; Evren et al. 2011; Taylor et al. 2010; Pourmand et al. 2007).

Hinsichtlich des mTOR-Systems sollte die Frage näher beleuchtet werden, auf welcher Stufe die Tumorprogression bezüglich der Expressionen von mTOR und 4E-BP1 startet, ob sich im Verlauf auch klinisch relevante Veränderungen ergeben und wie sich diese Verhältnisse im Prostataraum vor allem im Bereich der Tumorfront gestalten. Es soll untersucht werden, auf welchen zellulären Regulationsebenen in welchen Stadien und in welchen Lokalisationen sich Alterationen in der Signalkaskade ereignen. Somit wurde die Frage gestellt:

Liegt eine veränderte mRNA-Synthese - also eine modifizierte Transkription - im Tumorgewebe vor, wird die gebildete mRNA vermehrt oder vermindert translatiert und somit die Proteinexpression alteriert oder finden im Tumorgewebe aberrante posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen statt?

Auch wenn es bezüglich dieser speziellen Fragestellungen kaum Vergleichsliteratur gibt, so liegen zumindest vergleichbare Studien vor, die durch Untersuchungen von mTOR und 4E-BP1 downstream gelegenen Proteinen einen Anhalt bieten (Sheridan et al. 2015).

Weiter sollte der Frage nachgegangen werden, ob Unterschiede im Verlauf der Tumorevolution und des Tumorprogresses vorliegen und wie früh bereits metabolische Veränderungen im Tumor beziehungsweise im tumorumgebenden Gewebe nachzuweisen sind. Liegen bereits signifikante Veränderungen des Metabolismus in der Tumordinvasionsfront vor? Falls ja, auf welcher Ebene treten diese erstmalig und dominierend auf und unterscheiden sich diese vom

Tumormetabolismus? Diese Fragen sollten abschließend auch im Hinblick auf sich daraus eventuell ergebende neuartige Ansätze für eine Targeted-Therapie betrachtet werden.

Ähnlich wie in der Arbeit von Schanz sollte speziell auch das umgebende Tumormilieu näher untersucht werden (Schanz 2015). Dabei wurden von jedem Tumorgewebe auch Gewebeprobe aus dem an das Karzinom angrenzende histologisch benigne Gewebe - der Tumorinvasionsfront - entnommen. Auf diese Art und Weise sollten immunhistochemische Profile der verschiedenen Gewebe erstellt werden. Es sollte versucht werden, potenzielle Marker zu identifizieren und deren Auftreten zu quantifizieren, welche im histologisch benignen Gewebe bereits Hinweise auf das Vorliegen eines möglichen Karzinoms geben könnten. Dies ist in anderen Studien bereits ansatzweise erfolgt (Heni et al. 2012; Aufderklamm et al. 2011a; Waalkes et al. 2010; Merseburger et al. 2006b). Sollte die vorliegende Studie diese Erkenntnisse bekräftigen, so könnte sie von außerordentlich großer Bedeutung sein, da die konventionelle lichtmikroskopische Histologie meist außerstande ist, die Frage der genauen Dignität des Gewebes und dem potenziellen Vorliegen eines PCAs in der Nachbarschaft zu beantworten. Es könnte nicht Anspruch einer modernen Tumordiagnostik sein, alleine auf Grundlage der Histologie Entscheidungen von großer Tragweite zu treffen, wenn mittels der Immunhistochemie wesentlich weiterreichende und genauere Informationen aus dem gewonnenen Stanzbiopsie-Material gewonnen werden könnten.

Das Problem für die genaue Diagnostik per Stanzbiopsie liegt dabei in dem multifokalen Wachstumsmuster und der Heterogenität des PCAs selbst. Zwar erhöhen technische Hilfsmittel, wie die TURS, die Biopsie-Erfolge und Treffsicherheit (Loeb & Partin 2011), jedoch führt bei negativer Histologie der Stanzbiopsien und fortbestehendem klinischen Verdacht eines PCAs oft kein Weg daran vorbei, die Stanzbiopsie zu wiederholen (Walz et al. 2006; Djavan et al. 2001). Um wirklichkeitsnähere Studienbedingungen zu schaffen, wurde in dieser, wie auch in anderen Studien zuvor (Sheridan et al. 2015; Waalkes et al. 2010; Jendrossek et al. 2008; Merseburger et al. 2006b), zur Begegnung dieses Problems das Gewebe der Gruppe 2, welches histologisch benignes Gewebe der Tumorinvasionsfront repräsentiert, mit einem zufälligen Abstand zum Tumor entnommen. Genauso wenig wie im klinischen Alltag bekannt ist, wie weit ein potenzieller Tumor bei der Biopsie verfehlt wurde, so wenig wurde der Abstand der Stanzbiopsien der Tumorinvasionsfront zum Tumor im Vorhinein definiert.

Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob eventuell alleine durch Betrachtung der Tumorinvasionsfront gegebenenfalls Aussagen über die Behandlungsbedürftigkeit (Stenzl et al. 2009, Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V 2009) getroffen werden können.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit stellte speziell die Untersuchung fortgeschrittener Tumore dar (high Gleason), da für diese Tumore oft Therapieoptionen fehlen. Zwar scheint der Ansatz einer Intervention des mTOR-Pathways mit mTOR Inhibitoren wie Everolimus und Temsirolimus eine logische und vielversprechende Idee zu sein, jedoch konnten einige Studien (Rathkopf et al. 2015; Armstrong et al. 2013; Kruczek et al. 2013; Amato et al. 2008) keinen oder nur einen geringen Effekt zeigen. Gründe könnten die autonome Hochregulation von downstream von mTOR gelegenen Effektorproteinen wie 4E-BP1 sein, welche für die Tumorgenese eine entscheidende Rolle spielen (Furic et al. 2010; Armengol et al. 2007; Graff et al. 2009). Ein anderer Grund könnte die Heterogenität der Tumore sein. Gerade in fortgeschrittenen Tumoren treten vermehrt chromosomale Instabilitäten auf (Lee et al. 2011). Diese könnten bedingen, dass Targets, welche im normalen oder im low-Gleason Gewebe noch vorhanden waren, in darwinistischer Art verloren gegangen sind und so eine Multidrug-Resistance bedingt haben könnten (Lee et al. 2011). Andererseits gut denkbar könnte ein Grund sein, dass die Aktivierung des mTOR-Systems ein Frühereignis ist, welches im Laufe der Tumorevolution durch andere Alterationen ersetzt wird. Der gezielte Einsatz von mTOR Inhibition könnte somit bei fortgeschrittenen Tumoren sein Target dergestalt verpassen, dass das anvisierte Ziel gar nicht mehr existiert.

Aus diesem Grund ist es essenziell, dass - ähnlich wie bei der Mamma-CA Therapie bereits etabliert - ein individualmedizinischer Therapieansatz auch beim PCA anvisiert wird. Vor Einleiten einer gezielten Therapie sollte geklärt sein, ob diese Zielparameter überhaupt noch exprimiert werden. So sollten die Patienten zu selektieren sein, welche für bestimmte Therapiesettings geeignet sind. Prädiktive Marker, die ein gutes Therapieansprechen indizieren, sind somit entscheidend.

## 4.2 Proteinexpressionscharakteristika des mTOR Komplexes

### 4.2.1 Expressionscharakteristika des mTOR Proteins

Es ist schon seit längerem bekannt, dass mTOR meist im malignen Gewebe vermehrt exprimiert wird (Aufderklamm et al. 2011b; Jendrossek et al. 2008; Kremer et al. 2006). Auch Schanz zeigte, dass die Expressionen von mTOR im Tumorgewebe höher waren als im benignen Gewebe (Schanz 2015).

Diese Ergebnisse konnten auch in dieser Arbeit bestätigt werden. So war beim Vergleich von Normal- zu Tumorgewebe eine signifikant höhere Expression im Tumorgewebe vorzufinden ( $p=0,0003$ ). Die Subanalyse zwischen benignem Referenzgewebe und histologisch benignem Gewebe der Tumordinvasionsfront zeigte hinsichtlich der mTOR-Expression keine signifikanten Unterschiede auf ( $p=0,4875$ ). Genauso wenig unterschieden sich die Expressionen zwischen low- und high-Gleason Gewebe ( $p=0,4266$ ), wobei jeweils in den erstgenannten Geweben tendenziell weniger mTOR exprimiert wurde.

Die von Schanz postulierte Annahme, dass hohe mTOR-Expression ein Frühereignis der Tumorentwicklung darstellen würde, konnten in dieser Studie nur teilweise bestätigt werden (Schanz 2015). Zwar war die Expression von mTOR in der Tumordinvasionsfront tendenziell höher als im benignen Gewebe, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ( $p=0,4875$ ). Somit kann die These eines Frühereignisses weder bestätigt noch widerlegt werden.

In der gedachten Progressionssequenz von benignem Gewebe bis zum high-Gleason Gewebe war ein kontinuierlicher Anstieg der mTOR-Expression zu erkennen. Tumorgewebe generell weist einen erhöhten Metabolismus auf, welcher nur unter suffizienter Sauerstoffzufuhr aufrechterhalten werden kann. Somit ist im Tumorzentrum die Wahrscheinlichkeit einer Hypoxie größer als in der Peripherie. Hypoxie wiederum ist in der Lage, die mTOR Aktivität durch Hypophosphorylierung zu unterdrücken (Arsham et al. 2003), was zu einem vermehrten Anfall von unphosphoryliertem mTOR führen würde. Ein möglicher Erklärungsansatz für die ansteigende Menge von mTOR in der gedachten Progressionssequenz von benignem Gewebe zum high-Gleason Gewebe wäre gefunden, welcher die signifikante mTOR-Überexpression ( $p=0,0127$ ) im high-Gleason Gewebe im Vergleich zur Tumordinvasionsfront erklären könnte. Zudem ist zu bemerken, dass sich bei der patientenzentrierten Auswertung ein signifikant ( $p=0,0241$ ) positiver Zusammenhang zwischen hohen mTOR-Expressionen und hohen PSA-Werten abzeichnete, sofern die PSA-Werte im Median dichotomisiert wurden. Betrachtet man die mTOR-Expression als Indikator für Zellproliferation (Zhou & Huang 2010), so bestätigt sich auch unter der Verwendung des Gewebemarkers PSA, welcher nachgewiesenerweise mit

dem Gleason Score korreliert (Freedland et al. 2005), dass mTOR bei fortgeschrittenen Tumoren verstärkt exprimiert wird.

Letztendlich lässt sich festhalten, dass sich die Studie der Grundaussage, dass mTOR im malignen Gewebe vermehrt exprimiert wird (Jendrossek et al. 2008; Kremer et al. 2006) anschließen, die differenzierten Aussagen von Schanz jedoch nicht validieren kann (Schanz 2015).

#### 4.2.2 Expressionscharakteristika des p-mTOR Proteins

Die aktivierte Form des mTOR Komplexes – p-mTOR – ist für weitere Aktivierung von proliferativen Faktoren und somit auch für die Tumorgenese essenziell (Zhou und Huang 2010, Laplante, Sabatini 2009, Inoki et al. 2006). Aus diesem Grund steht vor allem p-mTOR im Interessensmittelpunkt vieler Studien.

##### 4.2.2.1 Expressionscharakteristika des p-mTOR Proteins zwischen Tumor- und

##### Normalgewebe

Auch wenn nicht alle Studien zu den gleichen Ergebnissen und Schlussfolgerungen hinsichtlich der Expressionscharakteristika im Prostataraum kamen lässt sich festhalten, dass die Mehrheit eine Überexpression von p-mTOR im Tumorgewebe im Vergleich zum Prostata-Normalgewebe ermitteln konnte (Sutherland et al. 2014; Aufderklamm et al. 2011b; Dai et al. 2009; Brown et al. 2008; Jendrossek et al. 2008; Kremer et al. 2006).

Jenen pauschalen Aussagen kann sich diese Studie jedoch nicht anschließen. Vergleich man Prostata-Normalgewebe mit Tumorgewebe, so wie in den genannten Vergleichsstudien getan, war bei dieser Studie ähnlich wie bei Muller et al. und Evren et al. eine signifikant ( $p=0,0099$ ) niedrigere Expression von p-mTOR im Tumorgewebe festzustellen (Muller et al. 2013; Evren et al. 2011, 2010).

Bei differenzierterer Betrachtung der Untergruppen von Normal- und Tumorgewebe zeigten sich große Unterschiede und Auffälligkeiten. Dabei war die niedrigste Expression von p-mTOR im benignen Prostatagewebe zu finden, die höchste Expression in der Tumordinvasionsfront, dem histologisch benignen, einen am PCA angrenzenden Gewebe, ( $p<0,0001$ ), wobei beide Gewebe zusammen als Prostata-Normalgewebe bezeichnet wurden. Da das Gewebe der Tumordinvasionsfront dem benignen Gewebe in der Anzahl weit überlegen war (Verhältnis  $> 3:1$ ) und die Expressionsunterschiede dieser Gewebe am größten waren, führte dies zu einer Überschätzung der Expression des Prostata-Normalgewebes im Vergleich zum Tumorgewebe.



Diese Studie konnte sich somit nur der Großzahl der Studien anschließen, sofern benignes Prostatagewebe mit Tumorgewebe verglichen wurde. Letzteres wies dann eine signifikant ( $p=0,0111$ ) höhere p-mTOR Expression auf.

Die hoch signifikanten ( $p<0,0001$ ) Unterschiede im Prostata-Normalgewebe zwischen benignem Referenzgewebe und an Tumor angrenzendem histologisch benignem Gewebe - dem Gewebe der Tumordinvasionsfront, sind besonders hervorzuheben, handelt es sich doch histologisch um nicht voneinander unterscheidbares Gewebe. Dies bedeutet jedoch, dass in der Umgebung eines PCAs auf immunhistochemischer Ebene starke Aberrationen in der Gestalt einer p-mTOR- Überexpression vorzufinden sind, obwohl das Gewebe histologisch noch keinerlei Veränderungen aufweist. Es ist ein klarer Beweis dafür erbracht, dass die lichtmikroskopischen (histologischen) Grenzen eines Prostata-CAs nicht mit denen des Tumor-Mikromilieus des PCAs gleichzusetzen sind. Es scheint, als seien lichtmikroskopische Veränderungen die zeitlich letzten Veränderungen in der Tumorphyse, während Aberrationen zellulärer Signalkaskaden bereits wesentlich früher auftreten ohne sich jedoch morphologisch zu manifestieren. Somit könnte p-mTOR als potenzieller Biomarker bei der Detektion von PCAs in histologisch benignem Gewebe von Stanzbiopsien dienen. Bereits andere Studien berichteten von ähnlichen potenziellen Biomarkern (Heni et al. 2012; Waalkes et al. 2010; Merseburger et al. 2006b), welche eine genauere Gewebe-Evaluation hinsichtlich ihrer Dignität ermöglichen könnten. p-mTOR scheint sich jedoch aufgrund der starken Expressionsunterschiede innerhalb des Normalgewebes hierfür besonders zu eignen, wie bereits auch Schanz feststellte (Schanz 2015). Die sich daraus ergebenden Konsequenzen werden gesondert diskutiert s. Kapitel 4.6.1 Prädiktion eines angrenzenden PCAs.

#### 4.2.2.2 Expressionscharakteristika des p-mTOR Proteins innerhalb des Tumorgewebes

Bei differenzierter Betrachtung des Tumorgewebes stellte sich dieses bei Weitem nicht homogen dar. Große Expressionsdifferenzen waren festzustellen. Diese waren vor allem zwischen low- und high-Gleason Tumoren waren diese zu verzeichnen. Dabei war die Expression bei high-Gleason PCAs signifikant geringer als die bei low-Gleason PCAs ( $p=0,0003$ ). Ähnliche Ergebnisse zeigten bereits Evren et al. (Evren et al. 2011, 2010).

Betrachtete man die Untergruppen von Tumor- und Normalgewebe, so war die höchste Expression in der Tumordinvasionsfront zu verzeichnen, tendenziell geringere Expressionen ( $p=0,3327$ ) wurden in low-Gleason PCAs ermittelt, wohingegen signifikant geringere Expressionen im high-Gleason PCA Gewebe zu finden waren ( $p<0,0001$ ). Setzt man die bei Evren et al. beschriebenen high grade PINs mit dem in dieser Studie verwendeten 'Gewebe der

Tumorinvasionsfront‘ gleich, so bestätigen sich beide Studien gegenseitig. Evren et al. (2010) berichten über eine kontinuierlich abnehmende p-mTOR-Expression; angefangen bei high grade PINs, über Gleason Score 6 und 7 bis hin zum high-Gleason PCA. In der Studie von Evren et al. 2001 fand jedoch kein benignes Prostata-Gewebe als Vergleichs- und Eichpunkt der basalen p-mTOR Expression Anwendung (Evren et al. 2010).

#### 4.2.2.3 Expressionscharakteristika des p-mTOR Proteins in der Tumorinvasionsfront

Beim Vergleich der Tumorinvasionsfront fiel auf, dass an low-Gleason PCAs angrenzende Gewebe eine höhere p-mTOR Expression aufwiesen als an high-Gleason PCA angrenzende Gewebe. Auch wenn die Unterschiede nicht signifikant waren ( $p=0,1984$ ), war ein klarer Trend diesbezüglich erkennbar. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bereits in der Tumorinvasionsfront karzinogene Eigenschaften der angrenzenden Tumore zu finden sein könnten. Aussagen zur Dignität eines Tumors könnten somit gegebenenfalls bereits durch alleinige differenzierte Betrachtung der histologisch benignen Gewebe getroffen werden.

#### 4.2.2.4 Expressionscharakteristika des p-mTOR Proteins hinsichtlich klinisch, pathologischer Eigenschaften

Hinsichtlich der patientenzentrierten Auswertung zeigte sich, dass die Expression von p-mTOR im organbegrenzten Stadium ( $\leq T2$ ) signifikant höher ( $p=0,0079^*$ ) war als im organüberschreitenden ( $T\geq 3$ ). Auch bei Dichotomisierung der PSA-Werte im Median wiesen kleinere PSA-Werte signifikant ( $p=0,0436$ ) höhere p-mTOR-Expressionen auf als größere PSA-Werte. Diese zum Gleason-Score analogen Entwicklungen könnten damit korrespondieren, dass weiter fortgeschrittene Tumore öfters einen höheren Gleason-Score aufweisen als organbegrenzte, kleine Tumore. Dies zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit (72% der organüberschreitenden Tumore waren high Gleason Tumore, während 63% der organbegrenzten Tumore low-Gleason Tumore waren, Likelihood-Verhältnis  $p=0,0034$ ). Bei einem Untergruppenvergleich zeigte sich des Weiteren, dass die Assoziation von dichotomisierten PSA-Werten und p-mTOR-Expression nur im Tumorgewebe bestand ( $p=0,0144$ ), während sie im Normalgewebe nicht mehr vorzufinden war ( $p=0,8350$ ).

Dass sowohl lokal als auch histologisch fortgeschrittene Tumore eine niedrigere p-mTOR-Expression aufweisen, könnte durch die von Evren et al. postulierte Annahme einer zunehmenden Hypoxie bei schneller und starker Tumorprogression erklärt werden. Dies wäre genau dann der Fall, wenn die Tumor-Proliferationsgeschwindigkeit der der Neoangiogenese überlegen wäre (Evren et al. 2010). Wie bereits erwähnt, hat Hypoxie zwar das Potenzial, den

mTOR-Signalweg durch vermehrte Expression von HIF-1 $\alpha$  und VEGF zu unterdrücken (Arsham et al. 2003) und auf diese Art und Weise die Angiogenese zu fördern (DeYoung et al. 2008; Brugarolas et al. 2004), jedoch scheint diese Möglichkeit bei fortgeschrittenen Tumoren entweder verloren gegangen, insuffizient oder ineffektiv zu sein (s. Kapitel 4.2.3 Aktivierungsstatus von mTOR auf Proteinebene und Kapitel 4.2.4 Zusammenschau der lokoregionären Expressionscharakteristika des mTOR Proteins).

Letztendlich lässt sich zusammenfassend sagen, dass diese Studie allen genannten Studien zustimmen kann, sofern keine verallgemeinerten, sondern differenzierte Aussagen getroffen werden. Eine Unterscheidung des Normalgewebes in Gewebe der Tumordinvasionsfront und benignes Referenzgewebe ist dabei zwingend erforderlich, da sich diese Gewebe hochsignifikant durch ihre Proteinexpressionen unterscheiden, wobei die höchsten p-mTOR-Expressionen in der Tumordinvasionsfront zu finden waren.

#### 4.2.3 Aktivierungsstatus von mTOR auf Proteinebene

Da der in dieser Studie verwendete monoklonale mTOR-Antikörper sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes mTOR, der p-mTOR Antikörper hingegen nur an Ser 2448 phosphoryliertes p-mTOR bindet, war es essenziell, den Quotienten von p-mTOR und mTOR zu bilden, um den Anteil des aktiven, phosphorylierten mTOR zu ermitteln.

Dabei war der mTOR-Aktivitätsindex im Normalgewebe um 28% signifikant ( $p < 0,0001$ ) höher als im Tumorgewebe. Ein auf den ersten Blick erstaunliches Resultat, würde man doch im Tumorgewebe eine gesteigerte zelluläre Aktivität erwarten. Vergleich man jedoch lediglich benignes Referenzgewebe mit Tumorgewebe, so änderte sich der Trend und die mTOR Aktivität war im Tumorgewebe um 20% größer – wenn auch nicht signifikant ( $p = 0,3756$ ). Bei der Gegenüberstellung von benignem Referenzgewebe mit low-Gleason Gewebe war die Expression um 44% größer und der zuvor bestehende Trend wurde signifikant ( $p = 0,0168$ ).

Betrachtet man des Weiteren den Aspekt, dass im Tumorgewebe signifikant mehr mTOR vorliegt als im Normalgewebe, so wäre es ausreichend, wenn nur ein geringer Teil der großen Menge des vorliegenden mTORs aktiviert würde, um Wachstum zu initiieren.

Kruck et al. berichteten Ähnliches für das klarzellige Nierenzellkarzinom, wo beim Vergleich von benignem Gewebe mit Tumorgewebe ein deutlich erhöhter mTOR-Aktivitätsindex im Tumorgewebe gefunden wurde. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die mTOR-Aktivierung im Nierenzellkarzinom über eine gesteigerte Phosphorylierung und nicht über eine gesteigerte Proteinexpression ablaufe (Kruck et al. 2010). Ähnlich kann auch beim PCA

argumentiert werden, gerade bei der gedachten Progressionssequenz hinsichtlich der Tumorinitiierung. Histologisch benignes Gewebe und Gewebe der Tumordinvasionsfront unterschieden sich kaum hinsichtlich ihrer mTOR Expressionen. Jedoch besteht ein hoch signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ) zwischen diesen Geweben bezüglich des Aktivierungsstatus, welcher in der Tumordinvasionsfront wesentlich höher war.

Beim weiteren Vergleich des Studienkollektivs war festzustellen, dass die mTOR-Aktivität bei high-Gleason Tumoren wieder signifikant abnahm und 22% geringer ( $p = 0,0003$ ) war als im low-Gleason PCA-Gewebe. Zu einem gleichen Ergebnis kam auch Schanz, welcher ebenfalls eine geringere Aktivität in höhergradigen Gleason Tumoren fand, aber keine Signifikanzen nachweisen konnte (Schanz 2015). Bei der Arbeit von Aufderklamm et al., bei der jedoch keine Differenzierung zwischen low- und high-Gleason PCA Gewebe vorgenommen worden war, wurde ebenfalls eine geringere mTOR-Aktivität im Tumorgewebe als im angrenzenden Gewebe festgestellt. Da jedoch der mediane Gleason-Score bei 6 lag, ist das Karzinomgewebe in der Studie von Aufderklamm et al. mit dem low-Gleason Gewebe in dieser Studie zu vergleichen (Aufderklamm et al. 2011b). Damit lassen sich sowohl die Studie von Kruck et al., Aufderklamm et al. und Schanz (Kruck et al. 2010; Aufderklamm et al. 2011b; Schanz 2015) mit den Ergebnissen dieser Studie vereinbaren.

Zu berichten ist, dass es für den mTOR-Aktivitätsindex sehr viele Parallelen zu der p-mTOR-Expression gab, welche zum Teil bereits für p-mTOR diskutiert wurde.

- Benignes Referenzgewebe wies auch hier die niedrigste – Gewebe der Tumordinvasionsfront hingegen deutlich (64% höher) die höchste mTOR-Aktivität auf ( $p < 0,0001$ ). So war auch die Aktivität von mTOR in low-Gleason PCA Gewebe um 28% signifikant ( $p = 0,0003$ ) höher als im high-Gleason PCA Gewebe.

Somit stellte sich die lokoregionäre Verteilung des mTOR-Aktivitätsindex hinsichtlich ihrer lokoregionären Verteilung identisch dar wie die der p-mTOR- Expression. Sogar die Signifikanzniveaus waren in drei von vier Fällen identisch.

- Für organbegrenzte Tumoren galt gleichfalls, dass der mTOR-Aktivitätsindex signifikant höher ( $p = 0,0174$ ) war als in organüberschreitenden Tumoren.
- Darüber hinaus fiel beim PSA-Wert eine signifikante ( $p = 0,0262$ ) negative Korrelation auf, welche bei der p-mTOR-Expression lediglich bei Dichotomisierung im Median bestand.
- Die Assoziation vom im Median dichotomisierten PSA-Wert und des mTOR-Aktivitätsindex bestand auch hier nur im Tumorgewebe ( $p = 0,0060^*$ ), nicht jedoch im Normalgewebe ( $p = 0,1689$ ).

Diese Parallelen zwischen dem mTOR-Aktivitätsindex und p-mTOR sind ein wegweisender Hinweis für das Verständnis des Regulationsmechanismus des mTOR-Systems und sollen im folgenden Kapitel 4.2.4 gesondert diskutiert werden.

War bei der Untersuchung der verschiedenen Tumorinvasionsfronten für p-mTOR nur zu erahnen, dass die Expressionen in der low-Gleason Tumorinvasionsfront höher waren als in der high-Gleason Tumorinvasionsfront, so war dieser Trend für die mTOR-Aktivität signifikant ( $p=0,0493$ ). Damit erhärtet sich der Hinweis, dass schon das histologisch benigne Gewebe der Tumorinvasionsfront die Eigenschaften des Primärtumors präsentiert und widersprechen den Erkenntnissen von Schanz, welcher postulierte, dass die Expressionscharakteristika in der Tumorinvasionsfront genau gegenteilig zu denen der Primärtumore seien (Schanz 2015). Eine hohe mTOR-Aktivität scheint somit ein Frühereignis der Tumorgenese zu sein, da sowohl die p-mTOR-Expression als auch der Aktivitätsindex in der Tumorinvasionsfront hoch signifikant höher ( $p<0,0001$ ) waren als im benignen Vergleichsgewebe. Auch Muller et al. kamen zu der gleichen Schlussfolgerung (Muller et al. 2013). Sie sahen die Abnahme der mTOR-Aktivität beim Fortschreiten des Tumorwachstums in einer im gleichen Zug auftretenden Hypoxie begründet, die zu einem Verlust von p-mTOR führte und mit einer schlechten Prognose verbunden war (Muller et al. 2013).

Dass dennoch im Tumorgewebe bzw. low-Gleason PCA Gewebe - verglichen zum benignen Gewebe - höhere Aktivitäten ( $p=0,3756$  bzw.  $p=0,0168$ ) vorliegen, könnte dadurch begründet sein, dass ein TSC2- bzw. ein PTEN-Verlust eine Hypoxie-induzierte Inhibition der mTOR-Aktivität unterdrücken (Kaper et al. 2006) und somit trotz Hypoxie eine vergleichsweise erhöhte mTOR Aktivität vorliegen kann. Weitere davon unabhängige wachstumsliberalisierende Mutationen könnten diesen Prozess unterstützen.

#### **4.2.4 Zusammenschau der lokoregionären Expressionscharakteristika des mTOR Proteins**

Die mTOR-Expression war im Tumorgewebe signifikant höher als im Prostatanormalgewebe und nahm mit steigender Malignität von benignem Gewebe zur Tumorinvasionsfront, zu low- und zu high-Gleason PCA Gewebe kontinuierlich zu. Eine signifikant vermehrte ( $p=0,0099$ ) Phosphorylierung und Aktivierung konnte hingegen im Normalgewebe verzeichnet werden, was einen im Normalgewebe um 29% signifikant ( $p<0,0001$ ) erhöhten Aktivitätsindex bei signifikant ( $p=0,0003$ ) weniger mTOR Absolut-Menge bedingte.

Die Subgruppenanalyse der phosphorylierten Form und des Aktivierungsstatus zeigte, dass sich der Aktivierungsstatus analog zu dem Phosphorylierungsstatus verhielt und in der Tumordinvasionsfront am größten war – im Vergleich zum benignen Referenzgewebe um 64% ( $p < 0,0001$ ) größer. Im Tumorgewebe war bei low-Gleason Karzinomen signifikant ( $p = 0,0003$ ) mehr (um 23%) mTOR aktiviert als bei high-Gleason-Karzinomen, wobei die Absolut-Mengen von mTOR vergleichbar waren ( $p = 0,5678$ ).

In der gedachten Tumorprogression war somit eine steigende Tendenz der mTOR-Expressionen und ein abnehmender Trend der p-mTOR-Expression bzw. des Aktivitätsindex zu sehen, welche durch den eintretenden p-mTOR-Verlust mit Tumorprogression erklärt werden könnte (Muller et al. 2013). Somit ist das Prostatakarzinom durch eine Überexpression und nicht durch eine vermehrte Phosphorylierung von mTOR charakterisiert (Aufderklamm et al. 2011b).

Demzufolge scheint nicht die mTOR-Überexpression ein Frühereignis der Tumorentwicklung zu sein (Schanz 2015), sondern vielmehr die durch Phosphorylierung indizierte mTOR-Aktivierung, welche vor allem in der Tumordinvasionsfront signifikant erhöht vorzufinden war und im Zuge der Tumorprogression wieder bis auf das Niveau des benignen Prostatagewebes abnahm.

Diese Ergebnisse könnten wie folgt erklärt werden: Zu Beginn der Tumorprogression läuft die gesteigerte Expression von pro-proliferativen Proteinen und Wachstumssignalen noch in einer weitestgehend geordneten Art und Weise ab (Aufderklamm et al. 2011b) – die Aktivierung des Signalweges geschieht konventionell über Phosphorylierung. Im weiteren Verlauf der Tumorprogression treten gehäufte Mutationen auf, welche eine Entdifferenzierung ermöglichen (Gerlinger et al. 2012; Lee et al. 2011; Robbins et al. 2011). Durch wachstumsliberalisierende Mutationen könnten Abläufe in den Signalwegen dergestalt verändert werden, dass die Tumore nicht mehr auf den gut regulierten und somit auch umständlichen Weg der Phosphorylierung angewiesen sind, sondern dem Bestreben nach überschießender Proliferation unter anderem über eine gesteigerte mTOR-Proteinexpression nachgehen.

## 4.3 Proteinexpressionscharakteristika des 4E-BP1 Komplexes

### 4.3.1 Expressionscharakteristika des 4E-BP1 Proteins

Das 4E-Binding-Protein 1 spielt eine essenzielle Rolle in der Proteinsynthese, dem Zellüberleben und -wachstum (Topisirovic et al. 2004) und steht bei der Entstehung vieler Tumorerkrankungen im Mittelpunkt des Interesses (Armengol et al. 2007). 4E-BP1 bindet und inaktiviert den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E (EIF4E), welcher andernfalls an die CAP-Struktur der mRNA binden und die Proteinbiosynthese initiieren würde (Jia et al. 2012). Hohe 4E-BP1- und niedrige p-4EB-P1-Konzentrationen vermitteln somit antiproliferative Eigenschaften.

Einige Studien konnten zeigen, dass beim PCA 4E-BP1 im Karzinomgewebe verstärkt exprimiert wird. So wurden bei Jendrossek et al. in 80% der Fälle verstärkte 4E-BP1-Expressionen im PCA ermittelt (Jendrossek et al. 2008), Kremer et al. wiesen hoch signifikante Überexpressionen im PCA-Gewebe nach (Kremer et al. 2006). Auch Aufderklamm et al. kamen zu dem gleichen hochsignifikanten Expressionsunterschied (Aufderklamm et al. 2011a).

Diese in der Literatur beschriebenen und primär paradox erscheinenden Resultate – das Vorhandensein erhöhter 4E-BP1-Expressionen und somit vermehrter antiproliferativer Proteine in Tumoren – waren auch mit den Ergebnissen dieser Studie kongruent.

Im Tumorgewebe war im Vergleich zum Normalgewebe eine signifikant höhere ( $p < 0,0001$ ) 4E-BP1 Expression festzustellen. Auch bei differenzierterer Betrachtung der Gewebe konnte diese Aussage bestätigt werden. Eine hochsignifikante ( $p < 0,0001$ ) Überexpression von 4E-BP1 war sowohl im low- als auch im high-Gleason PCA Gewebe im Vergleich zu benignem bzw. zu an Tumor angrenzendem Gewebe zu finden. Dabei ist zu erwähnen, dass low-Gleason Tumore tendenziell geringere Proteinexpressionen als high-Gleason Tumore aufwiesen ( $p = 0,2369$ ).

Bei expliziter Begutachtung der Tumordinvasionsfront war festzustellen, dass die low-Gleason Tumordinvasionsfront eine signifikant höhere ( $p = 0,0149$ ) Proteinexpression aufwies als die high-Gleason Tumordinvasionsfront. Der nicht signifikante Unterschied zwischen den Primärtumoren wurde somit bei Betrachtung ihrer Tumordinvasionsfronten signifikant.

Dass es sich, wie bei Aufderklamm et al. postuliert und durch die Ergebnisse von Schanz bekräftigt, bei der 4E-BP1- Überexpression um ein Frühereignis handele (Aufderklamm et al. 2011a, Schanz 2015), konnte diese Studie nur bedingt bestätigen. So konnten innerhalb des Prostanormalgewebes keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden ( $p = 0,9994$ ).

Hingegen waren diese lediglich zwischen den Geweben der verschiedenen Tumorinvasionsfronten festzustellen.

Bei der Korrelation der 4E-BP1-Expression mit patientenbezogenen Daten waren keine signifikanten Assoziationen festzustellen. Dennoch zeigte sich der Trend, dass höhere Gleason-Stadien ( $p=0,2639$ ) und organüberschreitende Tumore ( $p=0,3458$ ) mit tendenziell geringeren 4E-BP1-Expressionen einhergingen als niedrigere Gleason-Stadien und organbegrenzte Tumore.

Es lässt sich somit zusammenfassend festhalten, dass trotz einer 4E-BP1-Überexpression im Tumorgewebe, ähnlich wie bei Schanz, eine negative Korrelation zwischen 4E-BP1-Expression und Tumorstadium sowie Malignität zu erkennen war (Schanz 2015). Somit scheint eine erhöhte 4E-BP1-Konzentration im Tumorgewebe ein Indiz für eine geringere Malignität zu sein.

Diese Aussage lässt sich auch durch die Erkenntnisse von Graff et al. und Aufderklamm et al. bestätigen. Beide zeigten, dass eine 4E-BP1-Überexpression mit einem besseren Patientenüberleben bzw. mit einer längeren biochemischen rezidivfreien Zeit einhergeht (Graff et al. 2009, Aufderklamm et al. 2011a).

#### 4.3.2 Expressionscharakteristika des p-4E-BP1 Proteins

Die Studienlage zur lokoregionären Verteilung von p-4E-BP1 im Prostatakarzinom ist uneinheitlich. So postulierten 2006 Kremer et al., dass im malignen Prostatagewebe eine Überexpression von p-4E-BP1 vorzufinden sei (Kremer et al. 2006). Jendrossek et al. kamen zwei Jahre später zu einem gegenteiligen Ergebnis, wobei sie feststellten, dass im Prostatakarzinom lediglich 4E-BP1 und nicht p-4EBP1 erhöht sei (Jendrossek et al. 2008). Wiederum ein Jahr später veröffentlichten Dai et al., dass im PCA im Vergleich zu BPH und high grade PIN vermehrt p-4E-BP1 vorliege (Dai et al. 2009).

Verglich man in anderen Tumorentitäten die p-4E-BP1-Expression, so fiel auf, dass diese beim Mamma-Karzinom vor allem bei schlecht differenzierten Tumoren erhöht war und stark mit der Tumorgroße und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und Lokalrezidiven korrelierte (Rojo et al. 2007). Zhou et al. wiesen des Weiteren eine signifikante negative Korrelation zwischen der Höhe des exprimierten p-4E-BP1 und der krankheitsfreien Überlebenszeit nach (Zhou et al. 2004). Auch beim Ovarialkarzinom korrelierte die p-4E-BP1-Expression mit dem Tumorprogress und einer damit verbundenen schlechten Prognose (Castellvi et al. 2009).



#### 4.3.2.1 Expressionscharakteristika des p-4E-BP1 Proteins zwischen Tumor- und

##### Normalgewebe

Die Ergebnisse dieser Studie stellten sich korrespondierend zu denen von Jedrossek et al. (Jendrossek et al. 2008) dar, da im Tumorgewebe beim Vergleich zur Tumordinvasionsfront eine Überexpression für 4E-BP1, jedoch nicht für seine phosphorylierte Form festgestellt wurde.

Prostata-Normalgewebe wies im Vergleich zum Tumorgewebe signifikant höhere ( $p=0,0010$ ) p-4E-BP1-Konzentrationen auf. Erwähnenswert ist dabei die herausragende Position der Tumordinvasionsfront, wo im Vergleich zu allen anderen Geweben (benignes Normalgewebe, low-Gleason und high-Gleason Gewebe) signifikant höhere ( $p=0,0027$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ) Expressionen ermittelt wurden.

Genauso wie bei p-mTOR wurde in der gedachten Tumordprogressions-Sequenz mit steigender Malignität (angrenzendes Gewebe, low-, high-Gleason-Gewebe) ein starker Trend von abnehmenden p-4E-BP1-Expressionen gesehen, der lediglich zwischen low- und high-Gleason PCAs nicht signifikant war ( $p=0,1224$ ).

Es scheint anti-intuitiv, dass p-4E-BP1 gerade im high-Gleason-Gewebe am geringsten exprimiert war, wo die höchste Zell-Aktivität und somit auch die höchste p-4E-BP1-Expression zu erwarten gewesen wäre. Dieses Paradoxon könnte analog zu der p-mTOR-Expression erklärt werden und ebenfalls in Zusammenhang mit einer vermehrten Hypoxie im Zentrum fortgeschrittener Tumore stehen, was zu einer verminderten p-4E-BP1-Expression führen könnte (Evren et al. 2010). Eine alternative Erklärung könnte die Überlegung liefern, dass die mTOR-Signalkaskade einschließlich der downstream gelegenen Effektor-Proteine wie p-4E-BP1 lediglich in den Gewebearealen, welche entweder im Begriff sind, Tumor zu werden (Tumordinvasionsfront) oder es gerade geworden sind (low-Gleason), wie gewohnt abläuft.

Es scheint, als würden fortgeschrittene Tumore nicht mehr auf das korrekte Durchlaufen der Signalkaskade angewiesen sein, da sie durch Mutationen offenbar andere Wege gefunden haben, um dem Bestreben nach Proliferation nachzukommen (Robbins et al. 2011; Lee et al. 2011).

Ein denkbar einfacher Mechanismus dabei wäre die autonome Überexpression von EIF4E. Bei der Annahme, dass 4E-BP1 EIF4E im Verhältnis von 1:1 inhibiert, wäre es vollkommen irrelevant, wie viel antiproliferatives 4E-BP1 im Tumor exprimiert wird und wie viel 4E-BP1 durch Phosphorylierung von EIF4E gelöst wurde, solange das Verhältnis von EIF4E zu 4E-BP1 größer als eins ist. Ein derartiger Mechanismus wurde bereits in Mamma-Tumoren nachgewiesen (Armengol et al. 2007). Dysregulationen dieser Art in fortgeschrittenen Tumoren

könnten erklären, weswegen eine Targeted Therapie des mTOR-Komplexes beim PCA bisher zu keinen erfolgsversprechenden Ergebnissen gekommen ist (Armstrong et al. 2013; Kruczek et al. 2013).

#### 4.3.2.2 Expressionscharakteristika des p-4E-BP1 Proteins in der Tumorinvasionsfront

Die Tumorinvasionsfronten von low- und high-Gleason PCAs unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Dennoch war interessant, dass die Tumorinvasionsfront von high-Gleason PCAs eine tendenziell höhere ( $p=0,3669$ ) p-4E-BP1 Expression aufwies als die Tumorinvasionsfront von low-Gleason PCAs. Anders als beim weiter upstream gelegenen p-mTOR, ist dieser Trend hierbei gegenläufig zum Expressionsverhalten der angrenzenden Tumore. High-Gleason PCAs wiesen tendenziell niedrigere p-4E-BP1 Konzentrationen auf ( $p=0,1224$ ) als low Gleason PCAs. Auch wenn es sich hierbei um eine interessante, da gegenläufige Entwicklung des Expressionsverhaltens von Tumorinvasionsfront und angrenzendem Tumor handelt, muss darauf hingewiesen werden, dass es sich lediglich um zwei nicht signifikante entgegengesetzte Trends handelt. Weiteres siehe Kapitel 4.3.3 Aktivierungsstatus von E4-BP1 auf Proteinebene.

Darüber hinaus hat die extreme Überexpression von p-4E-BP1 in der Tumorinvasionsfront potenziell hohe diagnostische Wertigkeit. So könnte die p-4E-BP1-Expression zur prädiktiven Differenzierung zwischen benignem und an Tumor angrenzendem Gewebe genutzt werden. Armengol et al. stellten in einer Follow-up Studie von 76 Patienten mit Nadelbiopsien aus high grade PINs fest, dass diejenigen, welche später zu Karzinomen wurden, signifikant höhere p-4E-BP1-Expressionen aufwiesen als PINs mit niedrigen Expressionen. Daraus folgerten sie bereits 2007, dass die p-4E-BP1-Expression unabhängig von den weiter upstream gelegenen Veränderungen mit malignem Potenzial assoziiert seien und somit einen höchst relevanten Marker darstellen (Armengol et al. 2007). Auch Dai et al. stellten eine positive Korrelation zwischen der p-4E-BP1-Expression und T-Stadium sowie Fernmetastasen fest (Dai et al. 2009). Weiteres soll jedoch gesondert im Kapitel 4.6.1 Prädiktion eines angrenzenden PCAs diskutiert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich in dieser Studie (es sei nochmals angemerkt, dass keine Patienten mit Fernmetastasen oder hormonrefraktären PCAs Teil dieser Studie waren) eine progrediente Abnahme der p-4E-BP1-Expression im Zuge der Tumorevolution zeigte (Ereignisse von der Tumorinvasionsfront bis hin zum high-Gleason PCA). Die Ergebnisse von Kremer et al. und Dai. et al., welche im malignen Gewebe höhere p-4E-BP1-Konzentrationen als im benignen angrenzenden Gewebe fanden, konnten nicht bestätigt werden

(Dai et al. 2009; Kremer et al. 2006). Gleiches galt für Aufderklamm et al., welche postulierten, dass eine 4E-BP1-Konzentration bei Tumorprogression zugunsten seiner phosphorylierten Form abnehme (Aufderklamm et al. 2011a).

### 4.3.3 Aktivierungsstatus von 4E-BP1 auf Proteinebene

Der Aktivierungsstatus von 4E-BP1 wird durch den Anteil des phosphorylierten 4E-BP1 am unphosphorylierten 4E-BP1 dargestellt.

Für das Mammakarzinom liegen Berichte vor, dass ein erhöhter Aktivierungsstatus mit einem höheren histologischen Grad und Lymphknotenmetastasen assoziiert war (Armengol et al. 2007). Dies scheint nicht verwunderlich, da eine erhöhte Ratio für ein vermehrtes Vorhandensein des pro-proliferativen p-4E-BP1 spricht, welches den EIF4E aus der inhibierenden Verbindung mit 4E-BP1 entlässt und die CAP abhängige Translation disinhibiert (Jia et al. 2012).

Übergreifend betrachtet, war die Aktivität im Prostata-Normalgewebe hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) um 156% höher als im Tumorgewebe. Bei differenzierter Betrachtung der Gewebe-Untergruppen fiel auf, dass in der Tumordinvasionsfront die höchste 4E-BP1 Aktivität zu verzeichnen war. Auch wenn diese um 29% höher als im benignen Referenzgewebe war, war dieser Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,1062$ ). Zwischen low- und high-Gleason Karzinomen zeigte sich ein nur marginaler Unterschied im Aktivierungsstatus von 4E-BP1 ( $p = 0,9601$ ), wobei dieser im low-Gleason PCA Gewebe um 4,5% größer war.

Signifikante Unterschiede bestanden jedoch innerhalb der Tumordinvasionsfront. Der bereits bei der p-4E-BP1-Expression beobachtete nicht signifikante Trend wurde bei Betrachtung des Aktivitätsindex signifikant ( $p = 0,0257$ ). An high-Gleason PCAs angrenzende Gewebe wiesen dabei signifikant um 63% höhere Aktivitäten auf. Eine Erklärung hierfür wäre, dass hochgradige Gleason Tumore ein aggressives Wachstum aufweisen und die Tendenz haben, sich schneller auszubreiten (Gleason 1992). Dies erfordert gerade an der Tumordinvasionsfront eine erhöhte metabolische Aktivität, welche dort im Sinne einer gesteigerten mTOR-System Aktivierung erhöht zu sein scheint. Da in der Invasionsfront von high-Gleason-PCAs im Gegensatz zu den Zentren von high-Gleason-PCAs die Wahrscheinlichkeit einer Hypoxie und einer damit verbundenen mTOR Unterdrückung (Arsham et al. 2003) und einem potenziellen mTOR-Verlust (Muller et al. 2013) gering ist, scheint das gesteigerte Wachstumsbedürfnis in der Tumordinvasionsfront über eine Aktivierung der mTOR-Signalkaskade abzulaufen. Dies drückt sich letztendlich in einer vermehrten Expression von p-4E-BP1 und damit in einer

erhöhten 4E-BP1-Aktivität in der Tumorinvasionsfront aus. Wachstumsliberalisierende Mutationen scheinen in der Tumorinvasionsfront noch nicht ausreichend vorzuliegen, ein Impuls zur gesteigerten Proliferation hingegen schon. Somit muss die mTOR-Signalkaskade durchschritten werden, um dem Bestreben nach Wachstum und Proliferation nachkommen zu können. Ein niedrigeres Wachstumsbestreben von low-Gleason-PCAs und ein höheres von high-Gleason-PCAs in der Tumorinvasionsfront scheint sich somit eins zu eins in der 4E-BP1-Aktivität widerzuspiegeln.

Aufderklamm et al. postulierten, dass die 4E-BP1-Expression im Tumorgewebe im Verlauf der Tumorprogression abnehme, da es vermehrt in der phosphorylierten Form vorliege (Aufderklamm et al. 2011a). In dieser Studie konnte diese Annahme jedoch eindeutig widerlegt werden, da die 4E-BP1-Konzentration auch noch im weit fortgeschrittenen Stadium signifikant höher war als im Prostata-Normalgewebe - ein Fakt, den auch bereits Graff et al. feststellten. Jedoch entgegen der Ergebnisse von Graff et al. und Aufderklamm et al. konnte hier auch gezeigt werden, dass der phosphorylierte Anteil an 4E-BP1 im Laufe der Tumorevolution nicht zu- sondern ebenfalls abnimmt (Aufderklamm et al. 2011a; Graff et al. 2009). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Art der Signalkaskaden-Aktivierung vor allem in der Tumorinvasionsfront benötigt wird, um Wachstum zu initiieren. Analog zum mTOR-Aktivitätsindex scheint es, als hätten diese wachstums- und proliferations-induzierenden Mechanismen im Zuge der Tumorevolution stark an Bedeutung verloren.

#### 4.3.4 **Zusammenschau der lokoregionären Expressionscharakteristika des 4E-BP1 Proteins**

Das Verhalten von 4E-BP1 im Tumor- und Normalgewebe glich dem von mTOR. Dabei waren im Normalgewebe verglichen zum Tumorgewebe signifikant niedrigere ( $p < 0,0001$ ) 4E-BP1-Konzentrationen bei gleichzeitig signifikant erhöhtem ( $p < 0,0001$ ) Phosphorylierungsstatus und Aktivitätsindex (155% größer) nachweisbar.

In der Tumorinvasionsfront war ein signifikant höherer ( $p = 0,0027$ ) Phosphorylierungsstatus im Vergleich zum benignem Vergleichsgewebe zu sehen, wobei keine sonstigen signifikanten Unterschiede dieser Gewebe vorlagen. Der Aktivierungsstatus der Tumorinvasionsfront war mit 172% bzw. 184% signifikant höher ( $p < 0,0001$ ) als im low- bzw. im high-Gleason Gewebe. Innerhalb des Tumorgewebes waren zwischen low- und high-Gleason-PCAs keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Dies ist am besten im Aktivitätsindex zu sehen, der

im low-Gleason-PCA-Gewebe lediglich um 4,5% größer war als im high-Gleason-Gewebe ( $p=0,9601$ ).

Lediglich im Verhalten ihrer Tumorinvasionsfronten unterscheiden sich beide Proteine, wobei der mTOR-Aktivitätsindex dem signifikanten Trend der an sie grenzenden Ursprungstumoren entsprach (low-Gleason-Tumore wiesen eine 25%ig signifikant höhere Aktivität auf [ $p=0,0493$ ]), während der 4E-BP1-Aktivitätsindex einen signifikant gegenläufigen Trend zeigte ( $p=0,0216$ ). Dabei wiesen an high-Gleason-Tumore angrenzende Gewebe eine um 62% höhere Aktivität auf als Gewebe, welche an low-Gleason-Tumore angrenzten.

Dies könnte auf die Rolle des p-4E-BP1 als „Nadelöhr-Protein“ hinweisen, da dieses unter geregelten physiologischen Verhältnissen den letzten entscheidenden Engpass und Kontrollposten zur Wachstumsregulation darstellt (Armengol et al. 2007) und somit das Bestreben nach Wachstum in der Tumorinvasionsfront letztlich stärker zu sein scheint als das Bestreben, die Eigenschaften der an sie angrenzenden Tumore zu repräsentieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass genau wie bei mTOR die Hyperphosphorylierung und Aktivierung ein sehr frühes Frühereignis zu sein scheint, welche im Verlauf der Tumorevolution schnell wieder abnimmt. Ein wichtiger Unterschied scheint die Stärke der Aktivierungen zu sein. Waren bei mTOR nur moderat erhöhte Aktivierungen zwischen Tumorinvasionsfront und Tumorgewebe zu sehen (37%), so war die Aktivierung bei 4E-BP1 2,81-fach stärker (177%).

Dies scheint ein Hinweis darauf zu sein, dass die signifikanten Tendenzen, welche in der Tumorinvasionsfront upstream bereits bestanden, weiter downstream wesentlich stärker ausgeprägt waren. Ein potenzierender Effekt scheint vorzuliegen.

#### **4.4 Expressionscharakteristika von mTOR und 4E-BP1 auf mRNA Niveau**

Es erfolgte eine Re-Evaluation der mRNA Daten, welche von Werner erhoben wurden (Werner 2014), da diese der Arbeit zugrundeliegend mTOR- und 4E-BP1-mRNA-Expressionen als relative, prozentuale Überexpressionen und nicht als absolute Überexpressionen zum Housekeeping-Gen HPRT 1 ermittelt wurden. So erfolgte eine erneute Auswertung der mRNA Daten unter der Verwendung der absoluten Überexpressionen.

Da im Verlauf der Diskussion eine Signalkaskaden-Regulations-Analyse erfolgen soll, (s. Kapitel 4.5 Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf mRNA und Proteinebene) und die mRNA-Daten dabei die Grundlage bilden, sollen diese neu ausgewerteten Daten im Folgenden kurz diskutiert werden.

Die mRNA-Expressions-Daten wurden unter Verwendung des Housekeeping-Gens HPRT-1 erhoben. Dieses diente zur Beurteilung der basalen Zellaktivität im PCA und wurde in der Arbeit von Ohl et al. (Ohl et al. 2005) als valide beschrieben. Es fand daher auch in der Arbeit von Werner Anwendung (Werner 2014).

##### **4.4.1 Expressionscharakteristika von mTOR auf mRNA Niveau**

Für die mTOR-mRNA-Expressionen liegen in der Literatur keine direkten Vergleichsarbeiten vor. Lediglich in einer Studie von Lin et al. 2015 wurde die AKT, eine den mTOR-Komplex aktivierende Kinase untersucht (Lin et al. 2015).

###### 4.4.1.1 Expressionscharakteristika von mTOR mRNA im Prostataraum

In dieser Studie zeigten sich beim Vergleich der mTOR-Expressionen zwischen Tumor- und Normalgewebe keinerlei signifikante Unterschiede ( $p=0,8852$ ) – auch ein Trend ließ sich nicht ausmachen. So konnte die Überexpression auf Proteinebene im Malignen, wie sie von Kremer et al., Jendrossek et al. und Aufderklamm et al. (Aufderklamm et al. 2011b; Jendrossek et al. 2008; Kremer et al. 2006) sowie auch in dieser Studie beschrieben wurde, auf mRNA Ebene nicht nachgewiesen werden.

Lin et al. konnten jedoch bei der Untersuchung von AKT bereits auf mRNA-Ebene geringgradige, dennoch signifikante Überexpressionen im PCA Gewebe sowohl im Vergleich zu benignem- ( $p=0,039$ ) als auch zu BPH-Gewebe ( $p=0,041$ ) feststellen (Lin et al. 2015). Sie ermittelten jedoch wesentlich größere Veränderungen in den nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchungen auf Proteinebene.

Bei differenzierter Betrachtung der Untergruppen dieser Studie waren ebenfalls keine Signifikanzen, jedoch zumindest gelegentlich Tendenzen auszumachen. So war beim Vergleich von benignem Prostatagewebe mit Gewebe der Tumorinvasionsfront zu sehen, dass im letzteren tendenziell niedrigere mTOR-mRNA-Konzentrationen gemessen wurden als im benignen Gewebe. Dieser Trend war jedoch nicht signifikant ( $p=0,4539$ ) und konnte weder mit dem gegenläufigen, nicht signifikanten Trend auf Proteinebene noch mit der von Schanz postulierten Annahme, dass hohe mTOR-Expressionen ein Frühereignis der Tumorentwicklung darstellen würden, in Einklang gebracht werden (Schanz 2015).

Innerhalb des Tumorgewebes waren die Expressionen in high-Gleason PCAs im Vergleich zu low-Gleason PCAs höher, wenn auch abermals nicht signifikant ( $p=0,0825$ ). Eine Parallele war somit zur mTOR-Proteinexpression in dieser Studie zu sehen, wobei high-Gleason PCAs ebenfalls höhere, jedoch nicht signifikant höhere ( $p=0,4266$ ) Expressionen aufwiesen als low-Gleason PCAs. Aufgrund dieser Daten kann auf mRNA-Ebene von einem mTOR-Verlust, wie bei Muller et al. für p-mTOR beschrieben (Muller et al. 2013), keine Rede sein. Dies wird durch die Aussage unterstrichen, dass im high-Gleason PCA-Gewebe die höchsten mTOR-mRNA- und im low-Gleason-PCA Gewebe die niedrigsten mTOR-mRNA-Spiegel bestimmt wurden. Bei Begutachtung der Tumorinvasionsfront waren tendenziell höhere mRNA-Expressionen in der Tumorinvasionsfront von low-Gleason PCAs ( $p=0,1229$ ) nachzuweisen, wobei betont werden muss, dass lediglich drei Gewebeproben vorhanden waren, die der Tumorinvasionsfront eines high-Gleason PCAs entstammten. Somit ist dieser beschriebene Trend zu hinterfragen, auch wenn er in das Bild einer mTOR-Überexpression als Tumor-Frühereignis passen würde.

#### 4.4.1.2 Expressionscharakteristika von mTOR-mRNA hinsichtlich klinisch, pathologischer

##### Eigenschaften

Bei der patientenzentrierten Auswertung ließ sich eine fast signifikante positive Korrelation zwischen dem PSA-Wert und der mTOR-mRNA Expression feststellen, die bei Dichotomisierung im Median signifikant wurde ( $p=0,0309$ ). Gleiches ließ sich auch auf Proteinebene feststellen.

Des Weiteren wiesen sowohl organüberschreitende Tumore ( $T \geq 3$ ) als auch höhergradige Gleason-Tumore (Gleason  $\geq 8$ ) deutliche ( $p=0,0705$ ) bzw. signifikant ( $p=0,0175$ ) höhere mTOR-mRNA-Expressionen auf als nicht organüberschreitende Tumore ( $T \leq 3$ ) bzw. niedriggradige Gleason Tumore (Gleason  $\leq 8$ ). Auf Proteinebene waren diese Unterschiede nur noch als Tendenz hinsichtlich des Gleason-Scores nachweisbar.

Somit lässt sich zusammenfassend festhalten, dass auch bei fehlendem signifikanten Unterschied der mRNA-Expression sowohl zwischen Tumor- und Normalgewebe als auch bei weiterem Untergruppenvergleich analog zur Proteinexpression ein bestehender Trend zu erkennen war, dass fortgeschrittene, undifferenzierte Tumore tendenziell höhere Mengen von mTOR-mRNA exprimierten als gut differenzierte Tumore. Damit korrespondieren die Ergebnisse mit denen von Lin et al., bei denen – auch wenn wesentlich explizierter – ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Malignität und erhöhter AKT- Expressionen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte (Lin et al. 2015).

#### 4.4.2 Expressionscharakteristika von 4E-BP1 auf mRNA Niveau

##### 4.4.2.1 Expressionscharakteristika von 4E-BP1 mRNA im Prostataraum

Wurden die 4E-BP1-Expressionen von Tumor- und Normalgewebe verglichen, konnte weder ein signifikanter ( $p=0,7854$ ) Unterschied noch ein Trend festgestellt werden. Eine Überexpression im Malignen wie für die 4E-BP1-Proteinexpression nachgewiesen und auch in mehreren Studien bestätigt (Aufderklamm et al. 2011a; Jendrossek et al. 2008; Kremer et al. 2006), schien somit auf mRNA-Ebene noch nicht vorzuliegen.

Bei der differenzierteren Untersuchung der Untergruppen hingegen waren Signifikanzen festzustellen, wobei im Tumorgewebe die 4E-BP1 mRNA-Konzentration im low-Gleason PCA-Gewebe signifikant geringer ( $p=0,0227$ ) war als im high-Gleason PCA-Gewebe. Auf Proteinebene hingegen war dieser Unterschied nicht mehr zu finden. Im Gegensatz dazu waren dort tendenziell höhere Werte im low-Gleason PCA-Gewebe zu finden – wenn auch nicht signifikant ( $p=0,4791$ ).

Wie auch bei der Proteinexpression waren im Normalgewebe zwischen benignem und angrenzendem Gewebe keine Unterschiede feststellbar, wobei die mRNA-Expressions-Niveaus zwischen denen von low- und high-Gleason PCAs lagen.

In der Tumordinvasionsfront war analog zu der 4E-BP1-Proteinexpression die mRNA-Expression auch in an low-Gleason PCA angrenzendem Gewebe höher ( $p=0,4014$ ) als die Expression von an high-Gleason PCAs angrenzendem Gewebe. Das Verhalten der Expressions-Eigenschaften der Tumordinvasionsfronten war damit aber tendenziell genau gegenläufig zum mRNA-Expressionsverhalten der an sie angrenzenden Tumore. Es muss abermals betont werden, dass das Expressionsverhalten der Gewebe der high-Gleason Tumordinvasionsfront



lediglich von dem Verhalten dreier Gewebeproben bestimmt wurde und dies nur einen Trend darstellt.

#### 4.4.2.2 Expressionscharakteristika von 4E-BP1 mRNA hinsichtlich klinisch, pathologischer Eigenschaften

Bei der patientenzentrierten Auswertung zeigten organbegrenzte Tumore deutlich geringere ( $p=0,0798$ ) mRNA-Expressionen auf als organüberschreitende. Auch niedrige Gleason-Scores gingen mit signifikant niedrigeren ( $p=0,0245$ ) 4E-BP1-mRNA-Expressionen als hohe Gleason-Scores (Gleason  $\geq 8$ ) einher. Interessanterweise waren auf Proteinebene für beide Beobachtungen genau gegenläufige Trends zu beobachten ( $p=0,03458$  bzw.  $p=0,2639$ ). Hinsichtlich des im Median dichotomisierten PSA-Wertes waren keine nennenswerten Expressionsunterschiede festzustellen.

Somit lässt sich zusammenfassend darstellen, dass generell niedrige 4E-BP1 mRNA-Expressionen mit einem weniger fortgeschrittenen Karzinomstadium assoziiert waren. Jedoch waren die Expressionsunterschiede, welche auf Proteinebene vorlagen, auf mRNA- Ebene oft nur als Tendenzen wiederzuerkennen. Somit scheint der mRNA-Regulation kein großer Anteil an der Regulation der mTOR Kaskade zuzukommen (Schwanhausser et al. 2011). Weiteres siehe Kapitel 4.5.4 Regulation der mTOR-Signalkaskade – Bestimmung des lokoregionären Regulationsniveaus.

## **4.5 Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf mRNA und Proteinebene**

Im Folgenden sollen Korrelationen von mTOR und 4E-BP1 zuerst gesondert auf mRNA- Ebene betrachtet werden, bevor ein Vergleich und Bezug der Parameter und ihrer phosphorylierten Formen auf Proteinebene erfolgt. Abschließend werden Korrelationen und Interaktionen von mRNA zur Proteinebene dargestellt und diskutiert, um die Frage genauer beantworten zu können, auf welcher Ebene die mTOR-Signalkaskade im Prostataraum – unter Beachtung lokoregionärer Besonderheiten – reguliert wird. Jawoll gut so

Es soll hierbei betont werden, dass im Gegensatz zu den vorherigen Kapiteln, bei denen untereinander die Gesamtmengen an exprimierter mRNA bzw. an exprimiertem Protein im Prostataraum hinsichtlich lokoregionärer Besonderheiten „eindimensional“ diskutiert wurden, im Folgenden das konsistente „zweidimensionale“ Expressionsverhalten der einzelnen Patienten untereinander betrachtet werden soll. Es soll dabei verglichen werden, ob bei Patienten mit erhöhten Expressionen eines Parameters auch erhöhte Expressionen eines anderen Parameters vorliegen. Abschließend sollen bei Betrachtung des gesamten Patientenkollektives, also bei Zusammenführung dieser Daten, signifikante Korrelationen, Interaktionen und Assoziationen aufgezeigt werden. Eine Diskussion und Erklärung der Korrelationen für „zweidimensionale“ Zusammenhänge – die bei Betrachtung der intraindividuellen Korrelationen entstanden - unter Zuhilfenahme der „eindimensionalen“ Gesamtmengen an exprimiertem Protein/mRNA scheint somit nicht korrekt zu sein.

### **4.5.1 Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf mRNA-Ebene**

Werden die Expressionen von mTOR-mRNA und 4E-BP1-mRNA miteinander verglichen, so zeigte sich bei übergreifender Betrachtung aller Prostata-Gewebeproben, dass eine signifikante ( $p=0,0482$ ) positive Korrelation bestand.

Verglich man Prostata-Normalgewebe mit Tumorgewebe, so wurde ersichtlich, dass nur im Normalgewebe eine signifikante ( $p=0,0019$ ) positive Korrelation zwischen den Niveaus der mTOR- und 4E-BP1-mRNA-Expressionen bestand, welche im Tumorgewebe jedoch fehlte ( $p=0,6029$ ).

Beim weiteren Untergruppenvergleich wurde ersichtlich, dass nur noch in der Tumordinvasionsfront eine signifikante ( $p=0,0035$ ) positive Korrelation bestand. Weder im benignen ( $p=0,2307$ ) noch im low-, noch im high-Gleason PCA-Gewebe waren weitere

signifikante Interaktionen aufzuzeigen. Dabei war zu beobachten, dass im benignen und im low-Gleason PCA-Gewebe zumindest noch ein positiver Trend zu erkennen war, welcher bei high-Gleason PCA-Gewebe ins Negative umschlug.

Daraus ließe sich ableiten, dass im am Tumor angrenzenden Gewebe die am besten regulierten Prozesse auf mRNA-Ebene ablaufen, um für die nachfolgenden translatorischen Abläufe auf Proteinebene möglichst optimal regulierte Ausgangsbedingungen zu schaffen. Es gibt den Anschein, dass gerade Gewebe der Tumordinvasionsfront darauf angewiesen ist, die Proteinbiosynthese bestmöglich zu organisieren.

Man könnte mutmaßen, dass im benignen Prostatagewebe zu wenig proliferative Prozesse ablaufen, als dass dieses Gewebe auf eine strenge Taktung der Transkriptionsprozesse angewiesen wäre. Tumorgewebe scheint darüber hinaus auch nicht auf eine maximale Organisation der Proteinbiosynthese angewiesen zu sein. Insbesondere die tendenziell negative Korrelation von mTOR- und 4EBP1-mRNA im high-Gleason PCA-Gewebe scheint Hinweise zu geben, dass im fortgeschrittenen Tumor die Regulation der Proliferation nicht vordergründig von der mRNA-Expression abzuhängen scheint. Vielmehr scheinen andere, gegebenenfalls leichter zu regulierende Ebenen benutzt zu werden, um den Wachstumsimpulsen nachzukommen (Gleason 1992).

#### **4.5.2 Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf Proteinebene**

Analysierte man zuerst die Proteinexpressionen übergreifend in allen Prostata-Gewebeproben, so waren zwischen fast allen Parametern signifikante Korrelationen zu beobachten. Lediglich fehlten signifikante Korrelationen zwischen den Expressionen von p-mTOR und 4E-BP1 sowie zwischen mTOR und p-4E-BP1. Im letzten Fall war jedoch eine fast signifikante ( $p=0,0667$ ) positive Korrelation zu erkennen.

##### 4.5.2.1 Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf Proteinebene im gesamten Prostataraum

Bei Betrachtung des gesamten Prostatariums scheinen zwischen den einzelnen Proteinparametern starke und signifikante Korrelationen vorzuliegen. Eine Regulation der mTOR-Signalkaskade auf Proteinebene, wie durch Sheridan et al. und Schwanhauser et al. postuliert, scheint sich somit zu bestätigen (Sheridan et al. 2015; Schwanhauser et al. 2011). Dabei muss jedoch betont werden, dass aufgrund der signifikanten Korrelationen, welche

bereits auf mRNA-Niveau bestanden haben, alleine durch diese Ergebnisse noch nicht gesagt werden kann, dass die Regulation der mTOR-Signalkaskade ausschließlich auf Proteinebene stattfindet. Lediglich kann durch die starken Assoziationen untereinander bekräftigt werden, dass sich die Signalkaskaden-Regulation durch signifikante Zusammenhänge auf Translationsebene widerspiegelt.

#### 4.5.2.2 Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf Proteinebene zwischen Tumor- und Normalgewebe

Bei Betrachtung der Untergruppen zeigte sich die Anzahl der bestehenden Korrelationen stark reduziert. Bestanden gewebeübergreifend sieben signifikante Korrelationen, so lagen im Normalgewebe nur noch drei bzw. im Tumorgewebe nur noch zwei signifikante Korrelationen vor. Nichtsdestotrotz ließen sich daraus weitere Schlussfolgerungen ziehen.

Im Normalgewebe wie auch im Tumorgewebe waren positive Korrelationen zwischen der mTOR-Expression und der 4EBP1 ( $p=0,0276$  bzw.  $p<0,0001$ ) bzw. der p-mTOR und der p-4E-BP1-Expression ( $p=0,0014$  bzw.  $p=0,0040$ ) zu erkennen. Bereits Dai et al. wiesen signifikante positive Korrelationen im Tumorgewebe zwischen der p-mTOR und der p-4E-BP1-Expression nach (Dai et al. 2009). Somit bestand sowohl im Benigen als auch im Malignen eine signifikante positive Korrelation beider Schlüsselproteine sowie ihrer phosphorylierten Formen. In beiden Gewebeentitäten scheint infolgedessen eine synchron geregelte Expression von dem mTOR- und dem 4E-BP1-Protein vorzuliegen. Im Normalgewebe bestand darüber hinaus eine positive Korrelation zwischen der mTOR- und der p-4E-BP1-Expressionen ( $p<0,0001$ ), welche jedoch im Tumorgewebe nicht existierte, auch wenn eine starke Tendenz erkennbar war ( $p=0,0820$ ).

Diese als De-Regulation zu deutende Erkenntnis im Tumorgewebe könnte wie folgt dargelegt werden: Im Normalgewebe besteht nicht nur zwischen der Expression von mTOR und 4E-BP1 eine signifikante Korrelation, sondern auch zu seiner phosphorylierten Form. Wird im Normalgewebe vermehrt mTOR exprimiert, so wird nicht nur im gleichen Zuge vermehrt 4E-BP gebildet, sondern dieses gleich auch vermehrt phosphoryliert und somit aktiviert. Mit einer vermehrten mTOR-Expression wird somit das klar definierte Ziel verfolgt, Wachstum zu induzieren. Im Tumorgewebe scheint dieser logische Zusammenhang nicht so stark zu sein bzw. zu fehlen. Zwar kommt es im Zuge einer vermehrten mTOR-Bildung auch zu einer vermehrten Bildung von 4E-BP1, dieses wirkt jedoch antiproliferativ, da nur die phosphorylierte Form - welche jedoch nicht signifikant vermehrt gebildet wird - die CAP abhängige Translation initiiert. Wie bereits erwähnt, könnte eine autonome Überexpression von

EIF4E im high-Gleason-Tumoren, die bei Mamma-Tumoren bereits von Armengol nachgewiesen wurde, eine mögliche Erklärung hierfür sein (Armengol et al. 2007).

Darüber hinaus bestand eine negative Assoziation im Tumorgewebe des mTOR-Aktivitätsindex mit der 4E-BP1-Expression ( $p=0,0651$ ) sowie eine positive Interaktion beider Aktivitätsindices ( $p=0,1566$ ), welche im Normalgewebe nicht zu finden war ( $p=0,9409$  bzw.  $p=0,1566$ ). Somit scheinen im Tumorgewebe, vor allem im low-Gleason-Gewebe, pro-proliferative Assoziationen vorzuliegen, welche nicht im Normalgewebe vorhanden und somit als tumorspezifische Regulationen zu werten sind.

#### 4.5.2.3 Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf Proteinebene bei Subgruppenanalyse

Bei weiterer Subgruppenanalyse und somit bei der genauen Analyse der lokoregionären Regulation ließ sich folgendes festhalten:

Im benignen Gewebe korrelierte die mTOR-Expression sowohl positiv mit der 4E-BP1-Expression ( $p=0,0307$ ) als auch mit der p-4E-BP1-Expression ( $p=0,0376$ ). In der Tumorinvasionsfront bestand lediglich eine signifikante Korrelation zwischen der mTOR- und der p-4E-BP1-Expression, wobei diese deutlich stärker war ( $p=0,0005$  vs.  $p=0,0376$ ).

Somit wird in der Tumorinvasionsfront mit steigender mTOR-Expression an Stelle des antiproliferativen 4E-BP1 direkt vermehrt die wachstumsliberalisierende phosphorylierte Form gebildet. Als Besonderheit scheint in der Tumorinvasionsfront die Kinaseaktivität des p-mTORs sehr groß zu sein.

Sowohl im low- als auch im high-Gleason PCA-Gewebe waren positive signifikante Korrelationen zwischen der mTOR- und der 4E-BP1-Expression vorzufinden. Diese Korrelationen lagen bereits im Normalgewebe vor und schienen sowohl für das Prostatagewebe als auch für das PCA charakteristisch zu sein. Die einzige Ausnahme stellte dabei die Tumorinvasionsfront dar, wo der Einfluss des proliferationshemmenden 4E-BP1 inadäquat zu sein scheint und keine signifikanten Interaktionen der Parameter nachgewiesen werden konnten (s. oben).

Die Unterschiede innerhalb des Tumorgewebes waren wie auch bei der Proteinexpression nicht groß. Lediglich der mTOR-Aktivitätsindex nahm eine Sonderstellung ein.

So korrelierten im high-Gleason Gewebe die Expressionen von p-mTOR und p-4E-BP1 positiv signifikant ( $p=0,0255$ ), wobei im low-Gleason Gewebe nur ein gleichartiger Trend ersichtlich war ( $p=0,1776$ ). Da dieser Trend sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe signifikant vorlag ( $p=0,0014$  bzw.  $p=0,0040$ ) und sich die Signifikanzniveaus innerhalb des Tumors nicht

drastisch voneinander unterscheiden, kann es gut sein, dass die fehlende Signifikanz im low-Gleason Gewebe lediglich ein Resultat der reduzierten Kollektivgröße ist.

Im low-Gleason Gewebe hingegen korrelierte der mTOR-Aktivitätsindex negativ mit der 4E-BP1-Expression und positiv mit dem 4E-BP1-Aktivitätsindex ( $p=0,0006$  bzw.  $0,0326$ ). Letzterer war im high-Gleason Gewebe gerade nicht mehr signifikant ( $p=0,0655$ ) und dürfte sich ebenfalls durch die verringerte Probengröße bei der Subgruppenanalyse erklären lassen.

Somit unterschieden sich low- und high-Gleason Gewebe letztendlich nur durch die ausschließlich im low-Gleason Gewebe vorhandene signifikante negative Korrelation des mTOR-Aktivitätsindex mit der 4E-BP1-Expression. Wird viel mTOR aktiviert, so wird im gleichen Zug das antiproliferative 4E-BP1 reduziert. Somit deutet diese Assoziation genauso wie die Assoziation in der Tumordinvasionsfront von mTOR zu p-4E-BP1 auf eine geregelte mTOR-Kaskade hin, welche das Ziel verfolgt, Wachstum zu induzieren. jawoll

Die negative signifikante Korrelation des mTOR-Aktivitätsindex mit der 4E-BP1-Expression sowie die positive signifikante Korrelation des mTOR- und des 4E-BP1-Aktivitätsindex scheinen low-Gleason PCA- vom benignen Gewebe zu unterscheiden, da dort die Trends genau gegenläufig waren.

#### 4.5.2.4 Lokoregionäre Regulationsunterschiede der mTOR Signalkaskade auf Proteinebene - Zusammenfassung

Somit lässt sich für die Interaktionen auf Proteinebene folgendes zusammenfassen:

- Den Prostataraum übergreifend betrachtet, lagen zwischen fast allen Proteinen signifikante direkte Korrelationen vor, was für eine starke, direkte Interaktion untereinander spricht. Dies macht es sehr wahrscheinlich, dass die Regulation der mTOR-Signalkaskade vor allem auf der Proteinebene stattfindet.
- Je kleiner die Gruppen wurden, desto weniger Signifikanzen lagen vor – fast signifikante Trends blieben jedoch in der Regel bestehen. Diese verschwindenden Signifikanzen sind vermutlich primär auf die reduzierte Gruppengröße zurückzuführen und weniger auf eine nicht mehr vorhandene reale Assoziation.
- Normal- und Tumorgewebe unterschieden sich vor allem durch die negativen Assoziationen des mTOR-Aktivitätsindex zur 4E-BP1-Expression sowie durch die positive Assoziation des mTOR-Aktivitätsindex zum 4E-BP1-Aktivitätsindex, welche im Normalgewebe nicht zu erkennen waren. Diese pro-proliferativen Assoziationen liegen somit nur im Tumorgewebe vor.

- Die Tumorinvasionsfront scheint sich durch eine fehlende positive Korrelation von mTOR zu 4E-BP1 auszuzeichnen, wobei nur eine signifikante Korrelation zu der phosphorylierten Form des 4E-BP1 bestand. Dieser Vorgang deutet auf eine Wachstumsoptimierung hin.
- Low- und high-Gleason Gewebe unterschieden sich letztendlich lediglich durch eine signifikante Assoziation des mTOR-Aktivitätsindex zur 4E-BP1-Expression, welche nur im low-Gleason Gewebe vorhanden war. Dies deutet auf einen geregelteren Wachstumsablauf in low-Gleason Karzinomen hin. Dabei war für high-Gleason Karzinome auffällig, dass entgegen des bizarren Eindrucks bei Betrachtung der Gesamtmenge an exprimierten Protein ein strukturierter Eindruck bei Betrachtung der Korrelationen auf Proteinebene entstand. Dies deutet auf ein gezieltes Herunterfahren der mTOR-Signalkaskade hin.

#### 4.5.3 Regulation der mTOR Signalkaskade – Interaktion zwischen mRNA- und Proteinebene

Sowohl bei Analyse des Gesamtkollektives als auch bei den Untergruppenanalysen, welche in gewohnter Art erfolgten, wurde deutlich, dass im Gegensatz zu den Analysen auf mRNA-Ebene bzw. auf Proteinebene keinerlei signifikante Korrelationen zwischen der mRNA- und der Proteinexpression zu ermitteln waren.

So waren bereits Schwanhausser et al. und Sheridan et al. der Ansicht, dass die Regulation der Proteinexpression hauptsächlich auf Ebene der Translation stattfindet (Sheridan et al. 2015; Schwanhausser et al. 2011).

Es muss indessen betont werden, dass trotz fehlender signifikanter Korrelationen einige fast signifikante Tendenzen und somit Interaktionen zu erkennen waren, welche teilweise durch Dichotomisierung signifikant wurden. Die dabei entstandenen Signifikanzen dürfen jedoch als weniger gewichtig angesehen werden als signifikante direkte Korrelationen. Dichotomisiert wurden die mRNA- und die Proteinexpression im Median, die mRNA-Expression darüber hinaus zusätzlich im 25%- und 75%-Quartil. Dabei waren für einige mRNA-Protein-Interaktionen Signifikanzen zu ermitteln, welche jedoch bei direkter Korrelation der Parameter insignifikant mit zum Teil hohen p-Werten waren. Daher sollen im Folgenden nur Korrelationen mit  $p < 0,25$  diskutiert werden, die nach Dichotomisierung Signifikanzen zeigten.

#### 4.5.3.1 Interaktion zwischen mRNA- und Proteinebene im gesamten Prostataraum

Gewebeübergreifend waren sowohl negative Korrelationen der mTOR-mRNA-Expression zur p-mTOR-Expression ( $p=0,0905$ ) als auch zum mTOR-Aktivitätsindex ( $p=0,1239$ ) zu beobachten. Dies kann als Anzeichen dafür gewertet werden, dass im Prostataraum – auch wenn sicherlich nicht primär dominierend – generell Interaktionen zwischen mRNA und Proteinexpression vorliegen.

#### 4.5.3.2 Interaktion zwischen mRNA- und Proteinebene zwischen Tumor- und Normalgewebe

Sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe interagierte die Expression der mTOR-mRNA negativ mit dem p-4E-BP1-Aktivitätsindex – beides jedoch auf einem sehr schwachen Signifikanzniveau im Normalgewebe ( $p=0,3254$ ) bzw. im Tumorgewebe ( $p=0,2927$ ). Diese wurden daher als vernachlässigbare Interaktion bewertet.

Als wichtiger und signifikanter waren im Tumorgewebe die negative Interaktion der mTOR-mRNA mit der p-mTOR- ( $p=0,2410$ ) als auch die negative Interaktion der 4E-BP1-mRNA mit der p-4E-BP1-Proteinexpression ( $p=0,1200$ ) anzusehen, welche jeweils im Normalgewebe nicht existierten.

Somit waren die mRNA-Expressionen und die korrespondierenden Phosphorylierungsstatus ihrer Proteine miteinander negativ assoziiert. Dazu passt die Beobachtung, dass auf Proteinebene die p-mTOR- und die p-4E-BP1-Expression positiv miteinander korrelieren ( $p=0,0040$ ).

Daraus ließe sich die These aufstellen, dass ein hoher Gehalt von mTOR- bzw. 4E-BP1-mRNA in Tumorgewebe mit weniger Proliferation assoziiert war, während im Normalgewebe keinerlei derartige Assoziationen vorzuliegen scheinen.

#### 4.5.3.3 Interaktion zwischen mRNA- und Proteinebene im Normalgewebe

Im benignen Gewebe bestand sowohl eine negative Interaktion der 4E-BP1-mRNA zur p-4E-BP1 Proteinexpression ( $p=0,9856$ ) als auch eine positive Interaktion zur 4E-BP1-Aktivität ( $p=0,9533$ ). Diese wurden jedoch aufgrund ihrer hohen p-Werte ( $\geq 0,25$ ) als für nicht beachtenswert eingestuft. Demzufolge lagen im benignen Gewebe keine als relevant eingestuft Interaktionen vor.

In der Tumordinvasionsfront bestanden von mTOR- und 4E-BP1-mRNA signifikante Interaktionen zur 4E-BP1-Aktivität ( $p=0,4390$  bzw.  $p=0,6461$ ). Diese wurden jedoch ebenfalls aufgrund ihrer hohen p-Werte ( $> 0,25$ ) als irrelevant eingestuft. Dafür bestand eine fast



signifikante Korrelation der mTOR-mRNA mit der p-4E-BP1-Expression ( $p=0,0765$ ). Diese wurde jedoch trotz Dichotomisierungen nicht signifikant.

Zusammenfassend lassen sich somit sowohl im benignen Gewebe als auch in der Tumordinvasionsfront keine relevanten Interaktionen zwischen mRNA- und Proteinebene nachweisen.

#### 4.5.3.4 Interaktion zwischen mRNA- und Proteinebene im Tumorgewebe

Im Tumorgewebe bestand sowohl im low-Gleason PCA ( $p=0,1203$ ) als auch im high-Gleason PCA-Gewebe ( $p=0,0822$ ) eine Interaktion zwischen mTOR-mRNA und mTOR- bzw. p-mTOR Protein. Dabei war interessanterweise zu beobachten, dass diese Korrelation im low-Gleason Gewebe positiv, im high-Gleason Gewebe jedoch negativ ausfiel. Dies könnte folgende Schlussfolgerungen erlauben: Low-Gleason Tumore mit geringer mTOR-mRNA-Expressionen zeigen niedrigere mTOR bzw. p-mTOR-Proteinexpressionen auf. Jedoch zeigen High-Gleason Tumore mit einer niedrigen mTOR-mRNA-Expression hingegen eine vermehrte mTOR- bzw. p-mTOR-Proteinkonzentration auf.

Diese gegenläufige Bewegung von low- und high-Gleason Tumoren hinsichtlich der p-mTOR-Expression könnte man bei Gewebeproben-übergreifender Betrachtung durch eine signifikant höhere Menge ( $p=0,0003$ ) an phosphoryliertem mTOR im low-Gleason-Gewebe im Gegensatz zum high-Gleason Gewebe zu erklären versuchen. Es muss jedoch im Hinterkopf behalten werden, dass direkte Korrelationen (mRNA- und Protein-Expression entstammen jeweils einer Probe) nicht durch Gewebeproben-übergreifende Betrachtungen von Expressionsverhalten erklärt werden und somit lediglich als Hinweis gewertet werden könnten. Es bedarf daher weiterer, alternativer Erklärungsansätze.

Da sich in beiden Fällen keine logische Erklärung für diese Interaktionen bietet, könnte entweder argumentiert werden, dass diese Signifikanzen der Interaktion, welche bei direkter Korrelation nicht bestanden, ebenfalls nur Artefakte der Stochastik seien. Alternativ könnte die Erkenntnis der fehlenden logischen Regulationsmechanismen hingenommen werden und als höchstwahrscheinlich im Zuge einiger Mutationen im Verlauf der Tumorevolution aufgetretenen Dysregulationen angesehen werden (Robbins et al. 2011). High-Gleason Tumore könnten befähigt worden sein, andere Wege zu beschreiten, um gegebenenfalls effektiver dem Wachstumsbestreben nachkommen zu können (Graff et al. 2009). Dabei sollte folgendes bedacht werden: 4E-BP1 besitzt sieben Phosphorylierungsstellen (Proud 2004). mTOR scheint als Kinase bei den Phosphorylierungen von 4E-BP1 eine sehr wichtige Stellung einzunehmen und ggf. sogar hauptverantwortlich dafür zu sein (Petroulakis et al. 2006). Es gibt jedoch noch

andere Kinasen wie die MAP Kinasen (ERK1/2), Proteinkinase C und Casein Kinase II und gegebenenfalls noch weitere unbekannte Kinasen, welche 4E-BP1 womöglich auch an Stellen phosphorylieren können (Gingras et al. 1999), die dieser immunhistochemischen Untersuchung entgangen sind. Auch die Rolle anderer 4E-BP-Formen wie 4E-BP2 und 4E-BP3 ist nicht genau bekannt – auch nicht, ob diese in 4E-BP1 negativen Tumoren hochreguliert sein könnten.

Eine alternative Erklärung für das paradoxe Verhalten von high-Gleason Tumoren hinsichtlich der Aktivierung der mTOR-Signalkaskade könnte sein, dass diese EIF4E hochreguliert haben und so nicht mehr auf Phosphorylierung des 4E-BP1 angewiesen sind (Armengol et al. 2007). Eine solche Hochregulation von EIF4E konnte bereits in fortgeschrittenem PCA gezeigt werden (Graff et al. 2009).

Für low-Gleason Tumore, welche sowohl geringere mTOR-mRNA als auch mTOR-Proteinkonzentrationen aufweisen, scheint die Kaskade hingegen intakt zu sein. Da dieser Zusammenhang jedoch nicht im benignen Gewebe zu finden war, scheint diese transkriptionstranslativ-assoziative Assoziation ein Mechanismus zu sein, über den speziell low-Gleason Tumore eine höhere mTOR-Proteinkonzentration erlangen können.

#### 4.5.3.5 Interaktion zwischen mRNA- und Proteinebene - Zusammenfassung

Somit lässt sich über die Regulation der Signalkaskade in Abhängigkeit der mRNA-Proteininteraktionen folgendes festhalten:

- Zu keinem Zeitpunkt bestanden signifikante Korrelationen, lediglich signifikante Interaktionen nach Dichotomisierung
- Weder im benignen Gewebe noch in der Tumordinvasionsfront ließen sich signifikante Trends ausmachen.
- Low-Gleason Tumorgewebe wiesen signifikante pro-proliferative Assoziationen zwischen mRNA- und Proteinexpression auf, die in high-Gleason Tumoren jedoch anti-proliferativ waren. Dies ist wahrscheinlich durch eine Dysregulation der Signalkaskade zu erklären.

#### 4.5.4 Regulation der mTOR Signalkaskade – Bestimmung des lokoregionären Regulationsniveaus

##### 4.5.4.1 Bestimmung des Regulationsniveaus der mTOR Signalkaskade

Mit der Frage nach der Regulationsebene der mTOR-Signalkaskade im Prostatakarzinom beschäftigten sich bereits andere Gruppen (Sheridan et al. 2015; Hsieh et al. 2012; Furic et al. 2010).

Der 2015 veröffentlichte Bericht von Sheridan et al. war dabei besonders detailliert und darüber hinaus von hoher Relevanz, da die downstream Parameter YB-1 (Y-box binding protein-1) und MTA1 (chromatin remodeling protein metastasis associated-1) der mTOR- Signalkaskade analysiert wurden (Sheridan et al. 2015). Diese Proteine können normalen Prostatazellen das nötige Potenzial verleihen, welches erforderlich ist, um ein invasives PCA zu werden (Hsieh et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass YB-1 und MTA1 zwar häufig Alterationen auf DNA und RNA Niveau zeigen, diese Unterschiede in der DNA- oder mRNA-Expression jedoch nicht zur Unterscheidung zwischen Normal- und Tumorgewebe herangezogen werden konnten (Sheridan et al. 2015). Jedoch war nachzuweisen, dass die YB-1 Protein-Expression - ähnlich wie in dieser Studie die mTOR-Protein-Expression – schrittweise von normalem Prostatagewebe über PINs bis zum Karzinom kontinuierlich anstieg. Die MTA1-Protein-Expression – ähnlich wie die 4E-BP1-Protein-Expression in dieser Studie – zeigte keine Expressionsunterschiede zwischen normalem Prostatagewebe und PINs, war jedoch im Tumor deutlich vermehrt exprimiert (Sheridan et al. 2015).

Da in 12 von 15 Datensets mit über 1000 Patienten keine Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene gefunden werden konnten, waren Sheridan et al. der Meinung, dass die Proteinexpression der PI3K-AKT-mTOR-Signalkaskade nicht der auf der Ebene der mRNA-Transkription, sondern hauptsächlich auf Ebene der Translation reguliert wird (Sheridan et al. 2015). Da diese Signalkaskade auf Proteinebene im PCA häufig Alterationen aufzeigt (Muller et al. 2013; Robbins et al. 2011; Lee et al. 2011; Taylor et al. 2010; Kaper et al. 2006), scheint es naheliegend zu sein, dass diese Regulationen und Dysregulationen darstellen (Hsieh et al. 2012; Furic et al. 2010).

Auch Schwanhausser et al. sind der Ansicht, dass aufgrund der Tatsache, dass die Genexpression ein Multi-Step-Prozess sei, welcher Transkription, Translation und mehrere offene weitere Variablen wie die mRNA- und Protein-Halbwertszeit beinhalte und die zelluläre Regulation der Proteinexpression mehrheitlich auf dem Niveau der Translation kontrolliert werde (Schwanhausser et al. 2011). Dass die Phosphorylierung und somit die Aktivierung

dieser Proteine zur weiteren Steuerung und zur Feinregulation der Signalkaskade eine Schlüsselstelle einnimmt, scheint darüber hinaus außer Frage zu stehen (Zhou und Huang 2010, Laplante, Sabatini 2009, Inoki et al. 2006).

In dieser Studie lassen sich folgende differenzierten Angaben über die Regulationsmechanismen in Abhängigkeit der lokoregionären Verteilung treffen:

#### 4.5.4.2 Bestimmung des Regulationsniveaus – Unterschiede zwischen Tumor- und

##### Normalgewebe

- mRNA- Expressionsunterschiede bestanden beim Vergleich von Normal- zu Tumorgewebe nicht.
- Es bestanden auch keinerlei Korrelationen der mRNA-Expressionen untereinander.
- Bei übergreifender Betrachtung der Gesamtmengen an exprimiertem Protein waren für die Parameter mTOR und 4E-BP1, für ihre phosphorylierten Formen als auch für ihre Aktivitätsindices signifikante Unterschiede zwischen Tumor und Normalgewebe zu beobachten. Dabei waren jeweils höhere Aktivitäten im Normalgewebe und höhere Expressionen der unphosphorylierten Proteine im Tumorgewebe festzustellen. Dies könnte einerseits den Eindruck einer Dysregulation im Tumorgewebe erwecken, andererseits könnte geschlussfolgert werden, dass durch die große Menge unphosphorylierter Proteine schon ein geringer prozentualer Anteil phosphorylierter Proteine ausreicht, um einen Wachstumsimpuls zu generieren.
- Bei der Korrelation der Proteinexpressionen unterschieden sich Normal- und Tumorgewebe kaum. Lediglich hinsichtlich der tendenziellen positiven Korrelationen beider Aktivitätsindices sowie der tendenziellen negativen Korrelation des mTOR-Aktivitätsindex mit der 4E-BP1-Proteinexpression, welche ausschließlich im Tumorgewebe bestanden, waren Unterschiede zu erkennen. Diese dürfen aufgrund ihrer geringen Stärke jedoch nicht zu hoch bewertet werden.
- Ebenfalls bestanden ausschließlich im Tumorgewebe negative (nicht signifikante) Interaktionen zwischen mTOR- bzw. 4E-BP1-mRNA und ihren phosphorylierten Proteinformen.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass im Normalgewebe die Regulation der mTOR-Signalkaskade auf dem Niveau der Translation, vor allem aber auf dem Niveau der posttranslationalen Modifikation in Gestalt von Phosphorylierungen stattfindet, was in einer deutlich gesteigerten Expression pro-proliferativer Proteine mündet. Dahingegen waren im Tumorgewebe auch leichte Einflüsse des Transkriptionsniveaus zu festzustellen. Letztendlich

scheint hier jedoch die Regulation vor allem auf das Translationsniveau eine wichtige Rolle zu spielen. Tumorgewebe scheint hauptsächlich durch eine Hochregulation der Menge an unphosphorylierten Proteinformen charakterisiert zu sein, sodass ein relativ geringer Anteil an aktiviertem Protein (v.a. mTOR) ausreichend scheint, um eine große absolute Menge an aktiviertem Protein zu generieren. Hinsichtlich der großen Menge an anti-proliferativ wirkendem 4E-BP1 ist ein gleichartiger Erklärungsversuch nicht zielführend, andere Mechanismen (z.B. eine autonome Überexpression von EIF4E oder das Beschreiten alternativer Wachstumswege) müssen wahrscheinlich vorliegen, um diesen inhibitorischen Effekt auszugleichen.

Da bei gewebeübergreifender Betrachtung im Tumorgewebe - vor allem bei 4E-BP1 - stark verminderte Protein-Aktivitäten beobachtet wurden, Interaktionen auf Proteinebene jedoch auch vorhanden waren, könnte dies als Indiz für eine gezielte Drosselung der mTOR-Signalkaskaden Endstrecke gewertet werden und die These des Beschreitens alternativer Wachstumswege unterstützen.

Für weitere Aussagen scheint eine genauere Unterscheidung zwischen low- und high-Gleason Tumoren (s. Kapitel 4.5.4.4 Bestimmung des Regulationsniveaus – Unterschiede im Tumorgewebe) sinnvoll.

#### 4.5.4.3 Bestimmung des Regulationsniveaus – Unterschiede im Normalgewebe

- mRNA- Expressionsunterschiede bestanden im Prostatanormalgewebe nicht.
- Als einzige Ausnahme im gesamten Prostataraum korrelierte die mTOR-mRNA- mit der 4E-BP1-mRNA-Expression in der Tumorinvasionsfront. Es scheint, als würde in der Tumorinvasionsfront die Signalkaskade bereits auf mRNA-Ebene für eine effektive Proteinproduktion optimal abgestimmt sein.
- Bei übergreifender Betrachtung bestanden keine Unterschiede zwischen der Proteinexpression der Mutterproteine, jedoch lagen stark erhöhte Expressionen ihrer phosphorylierten Formen bzw. ihres Aktivitätsindex in der Tumorinvasionsfront vor.
- Bei der Korrelation der Proteinexpressionen fiel eine starke Kinaseaktivität in der Tumorinvasionsfront und somit eine sehr starke Korrelation von mTOR- zur p-4E-BP1-Expression auf. Die als wachstumshemmend anzusehende Korrelation von mTOR zu 4E-BP1, welche sonst in allen anderen Geweben vorlag, war in der Tumorinvasionsfront nicht aufzuweisen. Dies deutet auf eine sofortige Phosphorylierung des entstehenden und antiproliferativ wirkenden 4E-BP1 hin.

- Transkriptive-translative Assoziationen fehlten in beiden Untergruppen des Normalgewebes.

Aus diesen Ergebnissen könnte geschlossen werden, dass im benignen Gewebe die Regulation der mTOR-Signalkaskade vorwiegend auf Translationsebene stattfindet. Den nicht übermäßigen Wachstumsimpulsen kann anscheinend durch den physiologischen Ablauf der mTOR-Signalkaskade nachgegangen werden, ohne dabei andere Regulationsebenen mit einbeziehen zu müssen.

Hingegen scheinen in der Tumordinvasionsfront auf fast allen Ebenen Anpassungen im Sinne von „Wachstumsprozess-Optimierungen“ der konventionellen Signalkaskade an die hohen Proliferationsimpulse vorzuliegen, ohne dabei offensichtlich aberrante Signal-Wege zu benutzen. So werden bereits auf mRNA-Niveau Abstimmungen der produzierten Mengen mTOR- und 4E-BP1 mRNA gefunden. Die größte Besonderheit scheint jedoch die Existenz einer stark erhöhten Expression der phosphorylierten Parameter und somit das Vorhandensein eines sehr hohen Aktivitätsindex zu sein. In der Tumordinvasionsfront scheint die Signalkaskaden-Steuerung neben einer guten Organisation der Translation vor allem über posttranslationale Modifikationen im Sinne von aktivierenden Phosphorylierungen reguliert zu werden.

#### 4.5.4.4 Bestimmung des Regulationsniveaus – Unterschiede im Tumorgewebe

- Auf mRNA-Niveau lagen für mTOR tendenzielle, für 4E-BP1 signifikant höhere Expressionen im high- als im low-Gleason Gewebe vor.
- Dennoch konnten weder für low- noch für high-Gleason PCAs Korrelationen zwischen der mTOR- und 4E-BP1-Expression nachgewiesen werden
- Bei Betrachtung der Proteinexpressionen waren für die 4E-BP1-Expression keine signifikanten Unterschiede innerhalb des Tumorgewebes zu sehen, während low-Gleason Tumore sowohl signifikant mehr p-mTOR exprimierten, als auch einen signifikant höheren Aktivitätsindex aufwiesen.

Somit scheinen sich die differenzierten low-Gleason Karzinome in ihrem Proteinexpressionsverhalten dem Gewebe der Tumordinvasionsfront zu ähneln.

- Bei der Korrelation der Proteinexpressionen untereinander war ersichtlich, dass nur low-Gleason Tumore eine negative Korrelation des mTOR-Aktivitätsindex zum antiproliferativ wirkenden 4E-BP1 aufwiesen.

- Darüber hinaus bestand eine starke positive Interaktion der mTOR-mRNA und der korrespondierenden phosphorylierten Proteinform. Im high-Gleason Gewebe war sowohl diese als auch die Interaktion von mTOR-mRNA- mit mTOR-Protein negativ. Aktuell lässt sich diese Beobachtung unter Zusammenschau der bisherigen Erkenntnisse über Karzinomentstehungen und -proliferation nicht erklären.

Somit scheint die Regulation der mTOR-Signalkaskade in low-Gleason Karzinomen durch direkte Interaktionen auf Proteinebene, jedoch auch zu einem Teil durch transkriptional-translationale Interaktionen erklärbar zu sein. Für die Proliferation scheint aber vor allem die Aktivierung, d.h. Phosphorylierung von mTOR, genauso essenziell zu sein wie für Gewebe der Tumordinvasionsfront, da diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Geweben festgestellt werden konnten. Hinsichtlich des Expressions- und Aktivierungsverhaltens von 4E-BP1 ähneln low-Gleason Karzinome hingegen eher dem der high-Gleason Gewebe, welche sehr hohe 4E-BP1 Konzentrationen, aber sehr niedrige Aktivitätsindices aufweisen. Damit scheint es, als wäre low-Gleason Gewebe immunhistochemisch ein „Mischgewebe“, welches sowohl Eigenschaften der Tumordinvasionsfront als auch Eigenschaften von high-Gleason-PCAs aufweist.

Niedrige Aktivitätsindices und viel antiproliferativ wirkendes Protein vermitteln den Eindruck, als hätte die Regulation der mTOR-Kaskade nur geringen Einfluss auf die Proliferationseigenschaften im high-Gleason Karzinom. Diese scheinen herunterreguliert zu sein, was durch das Vorhandensein von antiproliferativen transkriptional-translationalen Assoziationen unterstrichen wird. Zwar bestanden auf individuellem Niveau auch Hinweise auf zumindest einige wachstumsfördernde Assoziationen auf translationaler Ebene, jedoch scheinen andere im Rahmen dieser Studie verborgen gebliebene Mechanismen eine wichtigere Stellung einzunehmen. Eine Regulation der mTOR-Signalkaskade wird offenbar nicht vorrangig benötigt, um dem Proliferationsbestreben nachkommen zu können.

## 4.6 Klinische Bedeutung der Proteinexpressionen

### 4.6.1 Prädiktion eines angrenzenden PCAs

Bei der Suche nach einem möglichen prädiktiven Marker für die Vorhersage eines bei der Stanzbiopsie verfehlten Karzinoms hat diese Studie womöglich wegweisende Erkenntnisse ermittelt, welche die Diagnostik des Prostatakarzinoms gegebenenfalls ein Stück voranbringen könnte.

Bei der Analyse der Proteinexpressionen stellte sich heraus, dass sowohl die p-mTOR- als auch die p-4E-BP1-Expression in der Tumorinvasionsfront signifikant höher waren als im benignem Prostatagewebe. Dabei erwies sich - für sich alleine betrachtet - vor allem p-mTOR als besonders wertvoll, da es im Vergleich zur p-4E-BP1-Expression ein besseres Signifikanzniveau aufwies. Dies stellten bereits auch Armengol et al. fest (Armengol et al. 2007).

So war bei p-mTOR die Differenz der medianen Expressionen (83,00) deutlich größer und das Signifikanzniveau ( $p < 0,0001$ ) wesentlich besser als im Falle des p-4E-BP1 (Differenz 40,25 Signifikanzniveau  $p = 0,0027$ ).

Dass sowohl die p-mTOR- als auch die p-4E-BP1-Expressionen in der Tumorinvasionsfront ähnlich groß – teilweise sogar größer waren – als bei low-Gleason-PCAs, könnte mehrere Ursachen haben, die im Folgenden kurz diskutiert werden sollen.

- Bei den Geweben der Tumorinvasionsfront könnte es sich nicht um benignes Gewebe, sondern ebenfalls um Tumorgewebe gehandelt haben. Diese Ursache ist jedoch kaum denkbar, da die Gewebe von einem erfahrenen Pathologen gewissenhaft überprüft wurden und die Dignität in der Regel zweifellos beurteilbar war. Diese Möglichkeit scheidet daher aus.
- Bei den Geweben könnte es sich um PINs gehandelt haben, wobei die Literatur berichtet, dass high-grade PINs vergleichbar hohe, wenn nicht sogar höhere p-mTOR-Expressionen aufweisen als die vorhandenen Tumore selbst (Sutherland et al. 2014; Evren et al. 2010; Dai et al. 2009; Brown et al. 2008; Kremer et al. 2006). Das Risiko eines solch vorliegenden Falles wurde ebenfalls durch das Konsultieren eines erfahrenen Pathologen ausgeschlossen.
- Letztendlich und somit am wahrscheinlichsten könnte die molekulare Umgebung eines Karzinoms bereits Veränderungen des Mikromilieus aufzeigen, welche karzinomtypisch sind, sich jedoch nicht in der Histologie widerspiegeln. Somit scheint es, als seien histologische Veränderungen nur die Spitze des Eisberges – immunologische und



zelluläre Veränderungen jedoch schon wesentlich früher vorhanden und nachweisbar. Dabei wurde die Existenz solcher Marker bereits in anderen Geweben demonstriert (Merseburger et al. 2006b; Waalkes et al. 2010) und von Schanz auch für das Prostatakarzinom nachgewiesen (Schanz 2015).

Die sich daraus ergebenden Konsequenzen könnten von großer Tragweite sein.

- So könnte hinterfragt werden, ob die bisherige Definition eines Karzinoms überdacht werden müsste. Ab wann ist ein Karzinom ein Karzinom und ist das Überschreiten der Basalmembran ein ausreichendes Kriterium zur sicheren Ermittlung der Invasivität?
- So könnte die Frage aufgeworfen werden, ob ein lichtmikroskopisch erhobener R0 Status für eine sichere vollständige Tumorentfernung ausreichend ist, ob histologisch benignes jedoch an Tumor angrenzendes Gewebe die Tendenz aufweist, auch nach Entfernung des Ursprungstumors bald zu entarten und ob in Zukunft eine neue, eine immunhistochemische Definition eines R0 Status implementiert werden sollte. Letztendlich bedarf es prospektiver Follow-up-Studien, um diese Fragen genauer untersuchen und beantworten zu können.
- Die Erkenntnisse hätten eine große Tragweite für die Beurteilung von Stanzbiopsien, da sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität von negativen Biopsien wesentlich erhöht werden könnten. Dabei könnten hohe Färbescores einer histologischen unauffälligen Stanzbiopsie die Wiederholung oder sogar gegebenenfalls eine operative Therapie rechtfertigen, niedrige Färbescores hingegen das Vorliegen eines benachbarten Karzinoms ausschließen bzw. unwahrscheinlich machen. Von zusätzlicher, den Patienten belastende, Diagnostik könnte abgesehen werden und damit einerseits Patientenleid vermieden, andererseits Ressourcen des Gesundheitssystems gespart werden.

Darüber hinaus war es möglich, anhand der Färbeergebnisse Aussagen über das Stadium der angrenzenden Läsionen zu treffen. Dabei waren höhere Färbescores mit niedrigeren Gleason-Stadien assoziiert. Es bedarf aber in diesem Fall weiterer prospektiver Studien und gegebenenfalls eine Kombination aus mehreren Parametern, um alleine anhand von Färbeergebnissen valide das Stadium des Tumors vorhersagen und anhand dessen einen entsprechenden therapeutischen Pfad einschlagen zu können. So berichten bereits Armengol et al., dass anhand der p-4E-BP1-Expression in high-grade PINs gezeigt werden kann, welche Patienten ein hohes Risiko haben, ein PCA zu entwickeln und welche nicht (Armengol et al. 2007). Weitere solche Studien sind erforderlich und wünschenswert.

#### 4.6.2 Therapeutische Konsequenzen der Studienergebnisse

Es ist bekannt, dass für die Tumorgenese das mTOR-System eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese spielt (Laplante und Sabatini 2012). Aus diesem Grunde war das mTOR-System schon länger im Blickpunkt vieler Studien.

Diese Studie konnte nachweisen, dass im PCA eine mTOR-Überexpression vorzufinden war, was durch frühere Studien untermauert wurde (Aufderklamm et al. 2011b; Jendrossek et al. 2008; Kremer et al. 2006).

##### 4.6.2.1 Klinischer Einsatz und Probleme von mTOR-Inhibitoren beim PCA

mTOR-Inhibitoren wie Everolimus und Temsirolimus finden bereits bei der Therapie von einer Vielzahl von Malignomen wie dem klarzelligem Nierenzellkarzinom (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF 2015), dem subependymalen Riesenzell-Astrozytom, Mantelzellymphomen, Mammakarzinomen und progressiven neuroendokrinen Pankreastumoren (Meng, Zheng 2015; Ramirez-Fort et al. 2014) klinische Verwendung. Es war somit naheliegend, auch mTOR-Inhibitoren bei der Therapie des PCAs einzusetzen, jedoch blieben die erhofften Erfolge aus (Rathkopf et al. 2015; Armstrong et al. 2013; Amato et al. 2008; Kruczek et al. 2013). Dies könnte dabei mehrere Ursachen haben: mTOR-Inhibitoren kamen oft nur in Monotherapie zum Einsatz (Kruczek et al. 2013; Armstrong et al. 2013; Templeton et al. 2013; Amato et al. 2008), wobei normalerweise eine Chemotherapie meist eine Kombinationstherapie darstellt und ggf. einer Singletherapie bevorzugt wird.

Auch wenn mTOR-Inhibitoren mit z.B. Doxatrel oder Gefitinib kombiniert wurden, zeigte dies kaum bessere Resultate (Courtney et al. 2015; Rathkopf et al. 2015). Letztendlich musste gefragt werden, ob die anvisierten Targets im Karzinom überhaupt noch exprimiert waren. Jedoch führte keine dieser Studien prätherapeutische immunhistochemische Untersuchungen durch, um diese Frage zu klären – meist handelte es sich lediglich um randomisiert ausgewählte Patienten. Dies könnte somit eine Erklärung für die fehlende Effektivität der Therapie sein. Denn gerade in fortgeschrittenen Tumoren haben oft Mutationen im PCA zu einer Art Multidrug Resistenz geführt (Lee et al. 2011).

##### 4.6.2.2 Problemlösungsansätze beim Einsatz von mTOR-Inhibitoren beim PCA

Diese Studie konnte zeigen, dass explizit bei fortgeschrittenen Tumoren – bei denen in den zuvor genannten Studien bevorzugt mTOR-Inhibitoren Verwendung fanden – es zu einer Herunterregulation der mTOR-Aktivität gekommen war und das anvisierte Target somit nur noch minimale Aktivität aufwies. Auch Schanz und Brown et al. konnten nachweisen, dass die

Aktivierung des mTOR-Systems ein Frühereignis in der Tumorentstehung darstellt (Brown et al. 2008; Schanz 2015), welche im Laufe der Tumorevolution wieder abnimmt. Somit stellen höchst wahrscheinlich unselektierte fortgeschrittene Tumore ein ungünstiges Target-Klientel für mTOR-Inhibitoren dar. Vielmehr konnte belegt werden, dass diese Art von Targeted Therapie in der Lage war, PINs zurück zu drängen (Majumder et al. 2004), wobei gerade in diesen Geweben nachweislich hohe mTOR-Aktivitäten vorherrschten (Evren et al. 2010) und somit das Target intakt war (Brown et al. 2008).

Dennoch stellt sich gerade im frühen Krankheitsstadium die Frage, ob die Anwendung von mTOR-Inhibitoren gerechtfertigt ist, da diese recht häufig mit Nebenwirkungen wie Fatigue, Myelosuppression, Stomatitis, metabolischen Entgleisungen, Pneumonien etc. (Chavez-MacGregor und Gonzalez-Angulo 2012; Paplomata et al. 2013) vergesellschaftet sind. Daher entsteht der Eindruck, als würde dies eine Übertherapie darstellen.

Somit lässt sich festhalten, dass obwohl low-Gleason PCAs ein potenzielles Ziel von mTOR-Inhibitoren darstellen würden, in diesem Krankheitsstadium andere therapeutische Maßnahmen überlegen sind und wesentlich besser toleriert werden (Stenzl et al. 2009).

Nichtsdestotrotz scheint die Immunhistochemie eine wichtige Rolle in der Patientenselektion, gerade bei fortgeschrittenen Tumoren, zu spielen. Vaishampayan et al. konnten demonstrieren, dass Patienten mit negativer p-AKT ein wesentlich besseres Ansprechen auf eine Targeted Therapie zeigten (30-48 Wochen progressfreie Zeit) als Patienten, die eine positive p-AKT Färbung aufwiesen (Progress in 9 Wochen) (Vaishampayan et al. 2015). Auch Templeton et al. zeigten, dass ein PTEN-Verlust mit einem längeren progressfreien Überleben einherging (Templeton et al. 2013).

Es sollte somit zukünftig das Ziel eines individualmedizinischen Settings bei der Therapie des PCAs, gerade im fortgeschrittenen Stadium, angestrebt werden, um Nebenwirkungen zu vermeiden und auch Ressourcen des Gesundheitssystems einzusparen. Weitere klinische immunhistochemisch unterstützte Studien zur Targeted Therapie sind somit erstrebenswert.

#### 4.6.3 Prognostische Konsequenzen der Studienergebnisse

Da diese Studie ein retrospektives Design hatte und keine Follow-up Untersuchungs-Daten vorlagen, konnte leider keine Angabe über die prognostische Konsequenz der Ergebnisse gemacht werden.

In anderen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass geringe 4E-BP1-Expressionen bzw. hohe Expressionen von p-4E-BP1 mit einem biochemischen Rezidiv assoziiert waren (Aufderklamm et al. 2011a; Graff et al. 2009).

Stelloo et al. und Muller et al. postulierten, dass die Expression von p-mTOR mit einem besseren Patienten Outcome assoziiert sei. Sutherland et al., Muller et al. Zhou et al. und Kinkade et al. stellten jedoch Gegenteiliges fest (Stelloo et al. 2016; Sutherland et al. 2014; Muller et al. 2013; Kinkade et al. 2008; Zhou et al. 2004).

Somit sind weitere prospektive Studien zur Klärung dieser Sachverhalte wünschenswert.

## 4.7 Limitationen der vorliegenden Arbeit

### 4.7.1 TMA-Technik und immunhistochemische Färbungen

Auch wenn diese TMA-Technik vielseitige Vorteile aufweist und sie ermöglicht, diverse Gewebe relativ schnell und kostengünstig hinsichtlich der Expression von Proteinen und somit Biomarkern zu untersuchen, existieren dennoch Nachteile. Diese gilt es zu bedenken, da sie die Ergebnisse der Arbeit beeinflusst haben könnten. Einerseits gilt es zu beachten, dass sich die entnommenen Gewebestanden des Donor-Paraffinblocks nicht immer hundertprozentig mit dem Recipient-Paraffinblock verbunden haben, sodass einige Gewebestanden nach dem Schneiden mit dem Microtom verloren gegangen waren. Dies hat zu einer Reduktion der Stichproben geführt. Andererseits muss bedacht werden, dass das PCA multifokal wächst und oft eine große intratumorale Heterogenität aufweist (Brocks et al. 2014; Merseburger et al. 2006a). Es ist daher unmöglich, dass eine einzelne randomisiert entnommene Gewebestanze eines PCAs die Gesamtheit des genetischen Profils des PCAs repräsentieren kann (Gerlinger et al. 2012). Wie in dieser Arbeit geschehen, bedarf es immer mehrerer Entnahmeorte aus einer Probe, um die heterogene Landschaft des PCAs besser bilden zu können. Dennoch bleibt weiterhin zu bezweifeln, ob auch durch multiple randomisierte Entnahmen von Gewebezylindern eine hundertprozentig zuverlässige Charakterisierung gelingen mag. Hingegen waren beispielsweise für Ki-67 drei bis vier Probeentnahmen ausreichend, um ein repräsentatives Tumor-Proteinprofil zu erstellen (Rubin et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte dies jedoch nur in ca. 25% der Fälle realisiert werden. Zumindest gelang es in über 95% der Fälle, mindestens zwei Gewebezylinder aus dem Tumorareal zu entnehmen.

Darüber hinaus stellt die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der TMAs generell eine Limitation der Objektivität der Arbeit dar. Zwar wurde mit großer Sorgfalt vor der Berechnung des Färbescores der Dots eine Färbeskala erstellt, welche stets parallel zu dem auszuwertenden Dot auf dem Bildschirm sichtbar war und somit eine gute Referenz darstellte. Dennoch darf nicht vergessen werden, dass die Fläche der verschiedenen stark gefärbten Zellen nur abgeschätzt werden konnte. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurde eine verblindete Reevaluation durchgeführt. Bei Abweichungen von kleiner 10% wurde der Mittelwert gebildet, anderenfalls erfolgte eine Wiederholung der Färbescore-Bestimmung.

#### 4.7.2 **Patientenkollektiv**

Obwohl die Erstellung des Patientenkollektivs stark durch die Operabilität und der konsekutiven Gewebe-Asservierung abhing, betrug die Altersverteilung des Patientenkollektivs im Median 66 Jahre und entsprach somit dem Erkrankungsgipfel der Gesamtbevölkerung, welcher zwischen 60 und 75 Jahren liegt (Kaatsch et al. 2013).

Da fortgeschrittene Tumore oft nicht mehr operativ therapiert werden, stellte es sich als schwierig dar, Gewebe dieser Patientengruppe zu rekrutieren:

So war der Anteil von Patienten mit histologisch benignem Gewebe, welches an einen high-Gleason Tumor angrenzte, zu denen sowohl mRNA- als auch Proteindaten vorlagen, mit 4% (3/67 Patienten) sehr gering.

Der Anteil von Tumor-Patienten mit positiver Lymphknotenmetastasierung betrug lediglich 10% (7/67 Tumorpatienten). Darüber hinaus fanden keine Patienten mit hämatogener Metastasierung Eingang ins Patientenkollektiv. Es ist somit unmöglich, über weit fortgeschrittene, kastrationsresistente Prostatakarzinome in der vorliegenden Arbeit Aussagen zu treffen.

Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns war es des Weiteren unmöglich, zu prognostischen Aspekten Angaben zu machen.

## 5 Zusammenfassung

PCAs zeigen sich häufig innerhalb des Prostataräumes multifokal und histologisch heterogen. Aktuelle Daten machen eine molekulare und damit tumorbiologische und klinisch relevante Heterogenität dieses Gesamttumors wahrscheinlich. Über solche Heterogenitäten des PCAs ist allerdings bisher noch wenig bekannt. Eigene Daten aus Heterogenität-Untersuchungen im Prostataräum zeigen auf Proteinebene erstaunliche Ergebnisse. Auch liegen erste Daten bereits über Veränderungen auf mRNA Niveau vor. Es ist jedoch noch nicht erfasst, ob und inwieweit sich solche Expressionen auf Proteinniveau widerspiegeln und inwieweit die Heterogenität des PCAs sich auf den unterschiedlichen Zellregulationsebenen manifestiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war, an einem umfassend charakterisierten Kollektiv potenzielle Heterogenitäten im mTOR-Signalling – einem onkologischen General-Signalweg – auf dem Niveau der Proteinebene zu erheben und diese Daten der mRNA-Ebene gegenüberzustellen, um so Erkenntnisse über Regulationsebenen der Signalkaskade im Prostataräum zu erlangen.

Grundlage der Studien bildete ein Kollektiv von 126 Patienten, die sich einer radikalen Prostatektomie (38x T $\leq$ 2 bzw. 29x T $>$ 2; 32x bzw. 35x Gleason Score  $<8/\geq 8$ ) und 21 Patienten, die sich benigner Prostatachirurgie unterzogen hatten. In einem vorhergegangenen Projekt wurden aus Tumorgewebe und angrenzenden histologischen Normalgewebe Gewebeproben auf die mRNA-Expression von mTOR und 4E-BP1 untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden zu den Entnahmeorten korrespondierende Gewebeproben aus den parallelen Paraffinpräparaten entnommen, zu einem TMA zusammengefasst und immunhistochemisch quantitativ die Expressionen von mTOR, p-mTOR, 4E-BP1 und p-4E-BP1 dargestellt. Dabei wurde sowohl den lokoregionären Expressionsunterschieden im Prostataräum als auch ihrem Bezug zu den histologischen Grenzen der Tumoreale Bedeutung zugemessen.

Auf mRNA-Ebene waren zwischen Tumor- und Normalgewebe keine signifikanten Korrelationen zu erkennen. Lediglich high-Gleason PCA Gewebe wies signifikant höhere 4E-BP1- und tendenziell höhere mTOR-mRNA-Konzentrationen auf als low-Gleason Gewebe. Ausschließlich in der Tumordinvasionsfront war eine signifikante Korrelation zwischen der Expression beider Parameter festzustellen, was auf eine streng getaktete Regulation der Signalkaskade in diesem Gewebe hindeutet.

Auf Proteinebene verhielten sich die mTOR- und 4E-BP1-Expressionen sehr ähnlich. Tumorgewebe wies in beiden Fällen signifikant höhere Expressionen als Normalgewebe auf, wobei diese vom benignen zum malignen Gewebe kontinuierlich anstiegen. Die

phosphorylierten Proteine, sowie die Aktivitätsindices waren in der Tumordinvasionsfront signifikant höher als im Tumorgewebe. Ein abnehmender Trend der Expression der p-Proteine war von Tumordinvasionsfront zu high-Gleason Gewebe zu sehen. Somit scheint die Phosphorylierung der Proteinparameter ein Frühereignis der Tumorgenese zu sein.

Signifikante direkte Korrelationen zwischen den Proteinparametern bestanden sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe. Die im Tumorgewebe positiven Korrelationen der Aktivitätsindices fehlten im Normalgewebe. Die Tumordinvasionsfront fiel sowohl durch die fehlende - sonst ubiquitär vorhandene – positive Korrelation von mTOR und 4E-BP1, als auch durch die stärkste positive Korrelation zu dem pro-proliferativ wirkenden p-4E-BP1 auf. Bei der Korrelation von mRNA- und Proteinexpression bestanden auch bei Untergruppenvergleichen keine signifikanten Korrelationen. Transkriptionstranslatorische Interaktionen scheinen für die Signalkaskadenregulation eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Somit lässt sich festhalten, dass Gewebe der Tumordinvasionsfront auf eine gute Organisation der mTOR- Signalkaskade angewiesen zu sein scheint, was durch positive Korrelationen auf mRNA- und Proteinebene und durch stark erhöhte Aktivitätsindices zu sehen war. Geringe Aktivitätsindices von mTOR und 4E-BP1 auf Proteinebene sowie negative transkriptionstranslatorische Assoziationen im high-Gleason Gewebe geben einen Hinweis, dass bei fortgeschrittenen PCAs andere Regulationsmechanismen von Bedeutung zu sein scheinen.

Die Prädiktion eines Karzinoms durch Analyse einer an Tumor angrenzenden histologisch benignen Gewebeprobe könnte aufgrund signifikant höherer Expressionen sowohl durch die p-mTOR- als auch durch die p-4E-BP1-Färbung gelingen. Somit scheint die molekulare Tumorgrenze die histologische Tumorgrenze bei Weitem zu überschreiten, was zur Veri- oder Falsifikation von negativen Stanzbiopsien großen klinischen Nutzen haben könnte.

Dass mTOR-Inhibitoren bei der Therapie des fortgeschrittenen PCAs oft keinen Effekt zeigen ist bekannt. Diese Studie zeigt, dass der häufige herunterregulierte mTOR-Metabolismus im fortgeschrittenen Tumorgewebe ein Grund dafür sein könnte. Weitere Studien an prätherapeutisch selektierten p-mTOR positiven Patienten wären wünschenswert um einen potenziellen therapeutischen Benefit von mTOR- Inhibitoren in dieser Kohorte zu überprüfen. Der Einsatz von mTOR-Inhibitoren bei niedriggradigen Tumoren, welche generell hohe mTOR-Aktivitäten zeigten, scheint in Anbetracht der damit assoziierten Nebenwirkungen und der alternativen Therapieregime jedoch ungerechtfertigt.



## 6 Literaturverzeichnis

Abigail, A. (2007): Sirolimus-eluting coronary stents: a review. In *Vasc Health Risk Manag* 3 (2), pp. 191–201.

Acosta-Jaquez, Hugo A.; Keller, Jennifer A.; Foster, Kathryn G.; Ekim, Bilgen; Soliman, Ghada A.; Feener, Edward P. et al. (2009): Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. In *Molecular and cellular biology* 29 (15), pp. 4308–4324. DOI: 10.1128/MCB.01665-08.

Agarwal, Stuti; Bell, Catherine M.; Taylor, Shirley M.; Moran, Richard G. (2015): p53 Deletion or Hot-spot Mutations Enhance mTORC1 Activity by Altering Lysosomal Dynamics of TSC2 and Rheb. In *Molecular cancer research: MCR*. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0159.

Al Olama, AA.; Kote-Jarai, Z.; Berndt, S. I.; Conti, D. V.; Schumacher, Fredrick; Han, Ying et al. (2014): A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. In *Nature genetics* 46 (10), pp. 1103–1109. DOI: 10.1038/ng.3094.

Albertsen, C.; Hanley J.; Gleason D., Barry M. (1998): Competing Risk Analysis of Men Aged 55 to 74 Years at Diagnosis Managed Conservatively for Clinically Localized Prostate Cancer. In *JAMA* 280 (11), p. 975. DOI: 10.1001/jama.280.11.975.

Amato, Robert J.; Jac, Jaroslaw; Mohammad, Taqi; Saxena, Somya (2008): Pilot study of rapamycin in patients with hormone-refractory prostate cancer. In: *Clinical genitourinary cancer* 6 (2), S. 97–102. DOI: 10.3816/CGC.2008.n.015.

Armengol, Gemma; Rojo, Federico; Castellvi, Josep; Iglesias, Carmela; Cuatrecasas, Miriam; Pons, Berta et al. (2007): 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. In: *Cancer research* 67 (16), S. 7551–7555. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0881.

Armstrong, Andrew J.; Shen, Tong; Halabi, Susan; Kemeny, Gabor; Bitting, Rhonda L.; Kartcheske, Patricia et al. (2013): A phase II trial of temsirolimus in men with castration-resistant metastatic prostate cancer. In *Clinical genitourinary cancer* 11 (4), pp. 397–406. DOI: 10.1016/j.clgc.2013.05.007.

Arsham, Andrew M.; Howell, Jessica J.; Simon, M. Celeste (2003): A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (32), S. 29655–29660. DOI: 10.1074/jbc.M212770200.

Aufderklamm, S.; Hennenlotter, J.; Gakis, G. A.; Vogel, U.; Gerber, V.; Knapp, J. et al. (2011a): Clinical utility of 4E-binding protein in prostate cancer diagnostics and its relevance as a prognostic marker. In: 52. Jahrestagung südwestdeutsche Gesellschaft für Urologie e.V. Tübingen, 2011.

Aufderklamm, S.; Hennenlotter, J.; Schilling, D.; Gakis, G. A.; Vogel, U.; Kühs, U. et al. (2011b): Beim Prostatakarzinom ist die Aktivierung des mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Systems durch Überexpression des Proteins charakterisiert – nicht durch Hyperphosphorylierung. In: 52. Jahrestagung südwestdeutsche Gesellschaft für Urologie e.V. Tübingen.

Avdulov, Svetlana; Li, Shunan; van Michalek; Burrichter, David; Peterson, Mark; Perlman, David M. et al. (2004): Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. In *Cancer cell* 5 (6), pp. 553–563. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.05.024.

Ayuso, María I.; Hernández-Jiménez, Macarena; Martín, María E.; Salinas, Matilde; Alcázar, Alberto (2010): New hierarchical phosphorylation pathway of the translational repressor eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) in ischemia-reperfusion stress. In *The Journal of biological chemistry* 285 (45), pp. 34355–34363. DOI: 10.1074/jbc.M110.135103.

Balk, S. P. (2003): Biology of Prostate-Specific Antigen. In *Journal of Clinical Oncology* 21 (2), pp. 383–391. DOI: 10.1200/JCO.2003.02.083.

Basualto-Alarcón, C.; Jorquera, G.; Altamirano, F.; Jaimovich, E.; Estrada, M. (2013): Testosterone signals through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy. In *Medicine and science in sports and exercise* 45 (9), pp. 1712–1720. DOI: 10.1249/MSS.0b013e31828cf5f3.

Bertz, J.; Dahm, S.; Haberland, J.; Kraywinkel, K.; Kurth, B.-M.; Wolf, U. (2010): Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 ; eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI.

Bitting, Rhonda L.; Armstrong, Andrew J. (2013): Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer. In *Endocrine-related cancer* 20 (3), pp. R83-99. DOI: 10.1530/ERC-12-0394.

Bjurlin, Marc A.; Wysock, James S.; Taneja, Samir S. (2014): Optimization of prostate biopsy: review of technique and complications. In *The Urologic clinics of North America* 41 (2), pp. 299–313. DOI: 10.1016/j.ucl.2014.01.011.

Bono, J. S. de; Oudard, S.; Ozguroglu, M.; Hansen, S.; Machiels, J-P.; Kocak, I.; Gra G. (2010): Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. In *Lancet* 376, pp. 1147–1154.

Bratt O. (2002): Hereditary prostate cancer: clinical aspects. In *The Journal of Urology* (168), pp. 906–913.

Brocks, David; Assenov, Yassen; Minner, Sarah; Bogatyrova, Olga; Simon, Ronald; Koop, Christina et al. (2014): Intratumor DNA methylation heterogeneity reflects clonal evolution in aggressive prostate cancer. In: *Cell reports* 8 (3), S. 798–806. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.06.053.

Brown, E. J.; Albers, M. W.; Shin, T. B.; Ichikawa, K.; Keith, C. T.; Lane, W. S.; Schreiber, S. L. (1994): A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. In *Nature* 369 (6483), pp. 756–758. DOI: 10.1038/369756a0.

Brown, Robert E.; Zotalis, George; Zhang, Ping L.; Zhao, Bihong (2008): Morphoproteomic confirmation of a constitutively activated mTOR pathway in high grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 1 (4), S. 333–342.

Brugarolas, J.; Lei, K.; Hurley, R. L.; Manning, B. D.; Reiling, J. H.; Hafen, E. et al. (2004): Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor

suppressor complex. In: *Genes & development* 18 (23), S. 2893–2904. DOI: 10.1101/gad.1256804.

Budanov, Andrei V.; Karin, Michael (2008): p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. In *Cell* 134 (3), pp. 451–460. DOI: 10.1016/j.cell.2008.06.028.

Carracedo, Arkaitz; Ma, Li; Teruya-Feldstein, Julie; Rojo, Federico; Salmena, Leonardo; Alimonti, Andrea et al. (2008): Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. In *The Journal of clinical investigation* 118 (9), pp. 3065–3074. DOI: 10.1172/JCI34739.

Castellvi, Josep; Garcia, Angel; Ruiz-Marcellan, Carmen; Hernandez-Losa, Javier; Peg, Vicente; Salcedo, Mayte et al. (2009): Cell signaling in endometrial carcinoma: phosphorylated 4E-binding protein-1 expression in endometrial cancer correlates with aggressive tumors and prognosis. In: *Human Pathology* 40 (10), S. 1418–1426. DOI: 10.1016/j.humpath.2008.12.019.

Chavez-MacGregor, Mariana; Gonzalez-Angulo, Ana Maria (2012): Everolimus in the treatment of hormone receptor-positive breast cancer. In: *Expert opinion on investigational drugs* 21 (12), S. 1835–1843. DOI: 10.1517/13543784.2012.726218.

Chiang, Gary G.; Abraham, Robert T. (2005): Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. In *The Journal of biological chemistry* 280 (27), pp. 25485–25490. DOI: 10.1074/jbc.M501707200.

Choo, Andrew Y.; Yoon, Sang-Oh; Kim, Sang Gyun; Roux, Philippe P.; Blenis, John (2008): Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (45), pp. 17414–17419. DOI: 10.1073/pnas.0809136105.

Chresta, Christine M.; Davies, Barry R.; Hickson, Ian; Harding, Tom; Cosulich, Sabina; Critchlow, Susan E. et al. (2010): AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. In *Cancer research* 70 (1), pp. 288–298. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1751.

Cohen, Ronald J.; Shannon, Beverley A.; Phillips, Michael; Moorin, Rachael E.; Wheeler, Thomas M.; Garrett, Kerryn L. (2008): Central zone carcinoma of the prostate gland: a distinct tumor type with poor prognostic features. In *The Journal of Urology* 179 (5), pp. 1762–7; discussion 1767. DOI: 10.1016/j.juro.2008.01.017.

Colman, Ricki J.; Anderson, Rozalyn M.; Johnson, Sterling C.; Kastman, Erik K.; Kosmatka, Kristopher J.; Beasley, T. Mark et al. (2009): Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. In *Science (New York, N.Y.)* 325 (5937), pp. 201–204. DOI: 10.1126/science.1173635.

Compans, R. W.; Cooper, M. D.; Koprowski, H.; Melchers, F.; Oldstone, M. B. A.; Olsnes, S. et al. (Eds.) (2004): *TOR*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Current Topics in Microbiology and Immunology).

Corradetti, Michael N.; Inoki, Ken; Bardeesy, Nabeel; DePinho, Ronald A.; Guan, Kun-Liang (2004): Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. In *Genes & development* 18 (13), pp. 1533–1538. DOI: 10.1101/gad.1199104.

Courtney, Kevin D.; Manola, Judith B.; Elfiky, Aymen A.; Ross, Robert; Oh, William K.; Yap, Jeffrey T. et al. (2015): A phase I study of everolimus and docetaxel in patients with castration-resistant prostate cancer. In: *Clinical genitourinary cancer* 13 (2), S. 113–123. DOI: 10.1016/j.clgc.2014.08.007.

Crawford, E.David (2003): Epidemiology of prostate cancer. In *Urology* 62 (6), pp. 3–12. DOI: 10.1016/j.urology.2003.10.013.

Dai, Bo; Kong, Yun Yi; Ye, Ding Wei; Ma, Chun Guang; Zhou, XiaoYan; Yao, Xu Dong (2009): Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in prostate cancer and its association with patient clinicopathological characteristics. In: *BJU International* 104 (7), S. 1009–1016. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2009.08538.x.

D'Amico, A. V. (1998): Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. In *JAMA* 280 (11), p. 969. DOI: 10.1001/jama.280.11.969.

Dengjel, Joern; Kratchmarova, Irina; Blagoev, Blagoy (2009): Receptor tyrosine kinase signaling: a view from quantitative proteomics. In *Molecular bioSystems* 5 (10), pp. 1112–1121. DOI: 10.1039/b909534a.

Deuse, Tobias; Bara, Christoph; Barten, Markus J.; Hirt, Stephan W.; Doesch, Andreas O.; Knosalla, Christoph et al. (2015): The Mandela study: A multicenter, randomized, open-label, parallel group trial to refine the use of everolimus after heart transplantation. In *Contemporary clinical trials*. DOI: 10.1016/j.cct.2015.09.009.

Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V (Ed.) (2009): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms.

Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (2015): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms. (Leitlinienprogramm Onkologie). In: AWMF Registernummer: 043/0170. Online verfügbar unter <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien.7.0.html>, zuletzt geprüft am 10.03.2017.

DeYoung, Maurice Phillip; Horak, Peter; Sofer, Avi; Sgroi, Dennis; Ellisen, Leif W. (2008): Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. In *Genes & development* 22 (2), pp. 239–251. DOI: 10.1101/gad.1617608.

Dibble, Christian C.; Asara, John M.; Manning, Brendan D. (2009): Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. In *Molecular and cellular biology* 29 (21), pp. 5657–5670. DOI: 10.1128/MCB.00735-09.

Djavan, B.; Ravery O.B.; Zlotta V.; Dobronski, A.; Dobrovits P., Fakhari M.; Seitz M. et al. (2001): Prospective evaluation of prostate cancer detected on biopsies 1,2,3 and 4: When should we stop? In *The Journal of Urology* 166 (5), pp. 1679–1683. DOI: 10.1016/S0022-5347(05)65652-2.

Dumstorf, Chad A.; Konicek, Bruce W.; McNulty, Ann M.; Parsons, Stephen H.; Furic, Luc; Sonenberg, Nahum; Graff, Jeremy R. (2010): Modulation of 4E-BP1 function as a critical determinant of enzastaurin-induced apoptosis. In *Molecular cancer therapeutics* 9 (12), pp. 3158–3163. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0413.

Efeyan, Alejo; Sabatini, David M. (2010): mTOR and cancer: many loops in one pathway. In *Current opinion in cell biology* 22 (2), pp. 169–176. DOI: 10.1016/j.ceb.2009.10.007.

Elkholi, Rana; Chipuk, Jerry E. (2014): How do I kill thee? Let me count the ways: p53 regulates PARP-1 dependent necrosis. In *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 36 (1), pp. 46–51. DOI: 10.1002/bies.201300117.

Epstein, J.; Allsbrook, W.; Amin, M.; Egevad, L., ISUP Grading Committee (2009): The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. In *The American Journal of Surgical Pathology* 29 (9), pp. 1228–1242.

Evren, Sevan; Dermen, Arthur; Lockwood, Gina; Fleshner, Neil; Sweet, Joan (2010): Immunohistochemical examination of the mTORC1 pathway in high grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinomas (PCa): a tissue microarray study (TMA). In: *The Prostate* 70 (13), S. 1429–1436. DOI: 10.1002/pros.21178.

Evren, Sevan; Dermen, Arthur; Lockwood, Gina; Fleshner, Neil; Sweet, Joan (2011): mTOR-RAPTOR and 14-3-3sigma immunohistochemical expression in high grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinomas: a tissue microarray study. In: *Journal of clinical pathology* 64 (8), S. 683–688. DOI: 10.1136/jclinpath-2011-200083.

Farhat, Ghada N.; Taioli, Emanuela; Cauley, Jane A.; Zmuda, Joseph M.; Orwoll, Eric; Bauer, Douglas C. et al. (2009): The association of bone mineral density with prostate cancer risk in the Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study. In *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18 (1), pp. 148–154. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0415.

Feng, Zhaohui; Hu, Wenwei; Stanchina, Elisa de; Teresky, Angelika K.; Jin, Shengkan; Lowe, Scott; Levine, Arnold J. (2007): The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. In *Cancer research* 67 (7), pp. 3043–3053. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4149.

Feng, Zhaohui; Zhang, Haiyan; Levine, Arnold J.; Jin, Shengkan (2005): The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (23), pp. 8204–8209. DOI: 10.1073/pnas.0502857102.

Fosså, S.; Nilssen, Y.; Kvåle, R.; Hernes, E.; Axcrona, K.; Møller, B. (2014): Treatment and 5-year survival in patients with nonmetastatic prostate cancer: the Norwegian experience. In *Urology* 83 (1), pp. 146–152. DOI: 10.1016/j.urology.2013.08.081.

Freedland, S. J.; La Mangold; Walsh, P. C.; Partin, A. W. (2005): The prostatic specific antigen era is alive and well: prostatic specific antigen and biochemical progression following radical prostatectomy. In: *The Journal of Urology* 174 (4 Pt 1), 1276-81; discussion 1281; author reply 1281.

Furic, Luc; Rong, Liwei; Larsson, Ola; Koumakpayi, Ismael Herve; Yoshida, Kaori; Brueschke, Andrea et al. (2010): eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (32), S. 14134–14139. DOI: 10.1073/pnas.1005320107.

Ganley, Ian G.; Du Lam, H.; Wang, Junru; Ding, Xiaojun; Chen, She; Jiang, Xuejun (2009): ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. In *The Journal of biological chemistry* 284 (18), pp. 12297–12305. DOI: 10.1074/jbc.M900573200.

Gemeinsamer Bundesausschusses: Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Früherkennung von Krebserkrankungen, revised 7/24/2014. In *Bundesanzeiger AT* 31.12.2014 B4.

Gerlinger, M.; Swanton, C. (2010): How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. In *British journal of cancer* 103 (8), pp. 1139–1143. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605912.

Gerlinger, Marco; Rowan, Andrew J.; Horswell, Stuart; Larkin, James; Endesfelder, David; Gronroos, Eva et al. (2012): Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. In: *The New England journal of medicine* 366 (10), S. 883–892. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205.

Ghosh, Arindam P.; Marshall, Christopher B.; Coric, Tatjana; Shim, Eun-Hee; Kirkman, Richard; Ballestas, Mary E. et al. (2015): Point mutations of the mTOR-RHEB pathway in renal cell carcinoma. In *Oncotarget* 6 (20), pp. 17895–17910.

Giberti, C.; Chiono, L.; Gallo, F.; Schenone, M.; Gastaldi, E. (2009): Radical retropubic prostatectomy versus brachytherapy for low-risk prostatic cancer: a prospective study. In *World journal of urology* 27 (5), pp. 607–612. DOI: 10.1007/s00345-009-0418-9.

Gingras, A.-C.; Gygi, Steven P.; Raught, B.; Polakiewicz, R. D.; Abraham, R.T.; Hoekstra, M. F. et al. (1999): Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. In: *Genes & development* 13 (11), S. 1422–1437

Gingras, A. C.; Raught, B.; Gygi, S. P.; Niedzwiecka, A.; Miron, M.; Burley, S. K. et al. (2001): Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. In *Genes & development* 15 (21), pp. 2852–2864. DOI: 10.1101/gad.912401.

Gingras, A.-C.; Raught, B.; Sonenberg, N. (2004): mTOR Signaling to Translation. In R. W. Compans, M. D. Cooper, H. Koprowski, F. Melchers, M. B. A. Oldstone, S. Olsnes et al. (Eds.): *TOR*, vol. 279. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Current Topics in Microbiology and Immunology), pp. 169–197.

Gleason, D. F. (1992): Histologic grading of prostate cancer: a perspective. In: *Human Pathology* 23 (3), S. 273–279.

Goode, N.; Hughes, K.; Wodgett, J. R.; Parker, P. J. (1992): Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isoforms. In *The Journal of biological chemistry* 267, pp. 16878–16882.

Graff, J. R.; Konicek, B. W.; McNulty, A. M.; Wang, Z.; Houck, K.; Allen, S. et al. (2000): Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. In *The Journal of biological chemistry* 275 (32), pp. 24500–24505. DOI: 10.1074/jbc.M003145200.

Graff, Jeremy R. (2002): Emerging targets in the AKT pathway for treatment of androgen-independent prostatic adenocarcinoma. In *Expert Opin Ther Targets* 6 (1), pp. 103–113.

Graff, Jeremy R.; Konicek, Bruce W.; Lynch, Rebecca L.; Dumstorf, Chad A.; Dowless, Michele S.; McNulty, Ann M. et al. (2009): eIF4E Activation Is Commonly Elevated in Advanced Human Prostate Cancers and Significantly Related to Reduced Patient Survival. In: *Cancer Res* 69 (9), S. 3866–3873. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3472.

Gravina, Giovanni Luca; Marampon, Francesco; Petini, Foteini; Biordi, Leda; Sherris, David; Jannini, Emmanuele A. et al. (2011): The TORC1/TORC2 inhibitor, Palomid 529, reduces tumor growth and sensitizes to docetaxel and cisplatin in aggressive and hormone-refractory prostate cancer cells. In *Endocrine-related cancer* 18 (4), pp. 385–400. DOI: 10.1530/ERC-11-0045.

Grimm, Peter; Billiet, Ignace; Bostwick, David; Dicker, Adam P.; Frank, Steven; Immerzeel, Jos et al. (2012): Comparative analysis of prostate-specific antigen free survival outcomes for patients with low, intermediate and high risk prostate cancer treatment by radical therapy. Results from the Prostate Cancer Results Study Group. In *BJU international* 109 Suppl 1, pp. 22–29. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2011.10827.x.

Grönberg H.; Damber L.; Damber J.E (1996): Familial prostate cancer in sweden: A nationwide register cohort study. In *Cancer* (Jan 1; 77(1)), pp. 138–143.

Guertin, David A.; Sabatini, David M. (2007): Defining the role of mTOR in cancer. In *Cancer cell* 12 (1), pp. 9–22. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.05.008.

Guertin, David A.; Stevens, Deanna M.; Thoreen, Carson C.; Burds, Aurora A.; Kalaany, Nada Y.; Moffat, Jason et al. (2006): 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. In *Developmental cell* 11 (6), pp. 859–871. DOI: 10.1016/j.devcel.2006.10.007.

Guo, Huifang; German, Peter; Bai, Shanshan; Barnes, Sean; Guo, Wei; Qi, Xiangjie et al. (2015): The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. In *Journal of Genetics and Genomics* 42 (7), pp. 343–353. DOI: 10.1016/j.jgg.2015.03.003.

Haas, G. P.; Sakr, W. A. (1997): Epidemiology of prostate cancer. In *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 47 (5), pp. 273–287. DOI: 10.3322/canjclin.47.5.273.

Haese, Alexander; de la Taille, Alexandre; van Poppel, Hendrik; Marberger, Michael; Stenzl, Arnulf; Mulders, Peter F A et al. (2008): Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. In *European urology* 54 (5), pp. 1081–1088. DOI: 10.1016/j.eururo.2008.06.071.

Hall, M. N. (2008): mTOR-what does it do? In *Transplantation proceedings* 40 (10 Suppl), pp. S5-8. DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.10.009.

Halvorsen, O.J; Haukaas S.A; Akslen, L.A (2003): Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer. In *Clin Cancer Res* 9 (4), pp. 1474–1479.

Hamidullah; Kumar, Rajeev; Saini, Karan Singh; Kumar, Amit; Kumar, Sudhir; Ramakrishna, E. et al. (2015): Quercetin-6-C-β-d-glucopyranoside, natural analog of quercetin exhibits anti-prostate cancer activity by inhibiting Akt-mTOR pathway via aryl hydrocarbon receptor. In *Biochimie*. DOI: 10.1016/j.biochi.2015.10.012.

- Han, J.; Song, J.; Li, X.; Zhu, M.; Guo, W.; Xing, W. et al. (2015): Ligustrazine Suppresses the Growth of HRPC Cells through the Inhibition of Cap- Dependent Translation Via Both the mTOR and the MEK/ERK Pathways. In *Anticancer Agents Med Chem* 15 (6), pp. 764–772.
- Hara, Kenta; Maruki, Yoshiko; Long, Xiaomeng; Yoshino, Ken-ichi; Oshiro, Noriko; Hidayat, Sujuti et al. (2002): Raptor, a Binding Partner of Target of Rapamycin (TOR), Mediates TOR Action. In *Cell* 110 (2), pp. 177–189. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00833-4.
- Hardt, Molly; Chantaravisoot, Naphat; Tamanoi, Fuyuhiko (2011): Activating mutations of TOR (target of rapamycin). In *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 16 (2), pp. 141–151. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01482.x.
- Harrington, Laura S.; Findlay, Greg M.; Gray, Alex; Tolkacheva, Tatiana; Wigfield, Simon; Rebholz, Heike et al. (2004): The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. In *The Journal of cell biology* 166 (2), pp. 213–223. DOI: 10.1083/jcb.200403069.
- Hay, Nissim; Sonenberg, Nahum (2004): Upstream and downstream of mTOR. In *Genes & development* 18 (16), pp. 1926–1945. DOI: 10.1101/gad.1212704.
- Heidenreich, A.; Bastian, P.; Bellmunt, J.; Bolla, M.; Joniau, S.; Van der Kwast, T. et al. (2014): EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. In *European urology* 65 (2), pp. 467–479. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.11.002.
- Heidenreich, A.; Bolla, M., Joniau, S.; Mason, M. D.; Matveev, V.; Mottet; Schmid, H-P. et al. (Eds.) (2011): Guidelines on prostate cancer.
- Heni, Martin; Hennenlotter, Jorg; Scharpf, Marcus; Lutz, Stefan Z.; Schwentner, Christian; Todenhofer, Tilman et al. (2012): Insulin receptor isoforms A and B as well as insulin receptor substrates-1 and -2 are differentially expressed in prostate cancer. In: *PloS one* 7 (12), e50953. DOI: 10.1371/journal.pone.0050953.
- Holmström, B; Holmberg, E.; Egevad, L.; Adolfsson, J.; Johansson, J-E; Hugosson, J.; Stattin, P. (2010): Outcome of primary versus deferred radical prostatectomy in the National Prostate Cancer Register of Sweden Follow-Up Study. In *The Journal of Urology* 184 (4), pp. 1322–1327. DOI: 10.1016/j.juro.2010.06.008.
- Hsieh, Andrew C.; Liu, Yi; Edlind, Merritt P.; Ingolia, Nicholas T.; Janes, Matthew R.; Sher, Annie et al. (2012): The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. In: *Nature* 485 (7396), S. 55–61. DOI: 10.1038/nature10912.
- Huang, Jingxiang; Dibble, Christian C.; Matsuzaki, Mika; Manning, Brendan D. (2008): The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. In *Molecular and cellular biology* 28 (12), pp. 4104–4115. DOI: 10.1128/MCB.00289-08.
- Huang, Jingxiang; Manning, Brendan D. (2008): The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. In *The Biochemical journal* 412 (2), pp. 179–190. DOI: 10.1042/BJ20080281.
- Huang, Jingxiang; Manning, Brendan D. (2009): A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. In *Biochemical Society transactions* 37 (Pt 1), pp. 217–222. DOI: 10.1042/BST0370217.



- Humphrey, P. A. (2004): Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. In *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 17 (3), pp. 292–306. DOI: 10.1038/modpathol.3800054.
- Inoki, Ken; Corradetti, Michael N.; Guan, Kun-Liang (2005): Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. In *Nature genetics* 37 (1), pp. 19–24. DOI: 10.1038/ng1494.
- Inoki, Ken; Guan, Kun-Liang (2006): Complexity of the TOR signaling network. In *Trends in cell biology* 16 (4), pp. 206–212. DOI: 10.1016/j.tcb.2006.02.002.
- Inoki, Ken; Li, Yong; Xu, Tian; Guan, Kun-Liang (2003): Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. In *Genes & development* 17 (15), pp. 1829–1834. DOI: 10.1101/gad.1110003.
- Inoki, Ken; Ouyang, Hongjiao; Zhu, Tianqing; Lindvall, Charlotta; Wang, Yian; Zhang, Xiaojie et al. (2006): TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. In *Cell* 126 (5), pp. 955–968. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.055.
- Inoki, Ken; Zhu, Tianqing; Guan, Kun-Liang (2003): TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. In *Cell* 115 (5), pp. 577–590. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00929-2.
- Jablonska, Agnieszka; Polouliakh, Natalia (2014): In silico discovery of novel transcription factors regulated by mTOR-pathway activities. In *Frontiers in cell and developmental biology* 2, p. 23. DOI: 10.3389/fcell.2014.00023.
- Jacinto, Estela (2008): What controls TOR? In *IUBMB life* 60 (8), pp. 483–496. DOI: 10.1002/iub.56.
- Jacinto, Estela; Facchinetti, Valeria; Liu, Dou; Soto, Nelyn; Wei, Shiniu; Jung, Sung Yun et al. (2006): SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. In *Cell* 127 (1), pp. 125–137. DOI: 10.1016/j.cell.2006.08.033.
- Jacinto, Estela; Loewith, Robbie; Schmidt, Anja; Lin, Shuo; Ruegg, Markus A.; Hall, Alan; Hall, Michael N. (2004): Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. In *Nature cell biology* 6 (11), pp. 1122–1128. DOI: 10.1038/ncb1183.
- Jendrossek, Verena; Henkel, Marco; Hennenlotter, Jorg; Vogel, Ulrich; Ganswindt, Ute; Muller, Ilka et al. (2008): Analysis of complex protein kinase B signalling pathways in human prostate cancer samples. In: *BJU International* 102 (3), S. 371–382. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2008.07703.x.
- Jhanwar-Uniyal, Meena; Gillick, John L.; Neil, Jayson; Tobias, Michael; Thwing, Zachary E.; Murali, Raj (2015): Distinct signaling mechanisms of mTORC1 and mTORC2 in glioblastoma multiforme: a tale of two complexes. In *Advances in biological regulation* 57, pp. 64–74. DOI: 10.1016/j.jbior.2014.09.004.
- Jia, Yan; Polunovsky, Vitaly; Bitterman, Peter B.; Wagner, Carston R. (2012): Cap-dependent translation initiation factor eIF4E: an emerging anticancer drug target. In *Medicinal research reviews* 32 (4), pp. 786–814. DOI: 10.1002/med.21260.

- Johnson, Simon C.; Rabinovitch, Peter S.; Kaeberlein, Matt (2013): mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. In *Nature* 493 (7432), pp. 338–345. DOI: 10.1038/nature11861.
- Kaatsch, P.; Spix, C.; Hentschel, S.; Katalinic, A.; Luttmann, S.; Stegmaier, C. et al. (2013): Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010.
- Kaper, Fiona; Dornhoefer, Nadja; Giaccia, Amato J. (2006): Mutations in the PI3K/PTEN/TSC2 pathway contribute to mammalian target of rapamycin activity and increased translation under hypoxic conditions. In: *Cancer research* 66 (3), S. 1561–1569. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3375.
- Kelly, W. K.; Halabi, S.; Carducci, M.; George, D.; Mahoney, J.; Stadler, W. et al. (2012): Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial comparing docetaxel and prednisone with or without bevacizumab in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: CALGB 90401. In *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (13), pp. 1534–1540. DOI: 10.1200/JCO.2011.39.4767.
- Khaibullina, Alfia; Almeida, Luis E F; Wang, Li; Kamimura, Sayuri; Wong, Edward C C; Nouraie, Mehdi et al. (2015): Rapamycin increases fetal hemoglobin and ameliorates the nociception phenotype in sickle cell mice. In *Blood cells, molecules & diseases* 55 (4), pp. 363–372. DOI: 10.1016/j.bcmd.2015.08.001.
- Kim, Eunjung; Goraksha-Hicks, Pankuri; Li, Li; Neufeld, Thomas P.; Guan, Kun-Liang (2008): Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. In *Nature cell biology* 10 (8), pp. 935–945. DOI: 10.1038/ncb1753.
- Kim, J. E.; Chen, J. (2004): regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. In *Diabetes* 53 (11), pp. 2748–2756.
- Kinkade, Carolyn Waugh; Castillo-Martin, Mireia; Puzio-Kuter, Anna; Yan, Jun; Foster, Thomas H.; Gao, Hui et al. (2008): Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (9), S. 3051–3064. DOI: 10.1172/JCI34764.
- Kirby, M.; Hirst, C.; Crawford, E. D. (2011): Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. In *International journal of clinical practice* 65 (11), pp. 1180–1192. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2011.02799.x.
- Kirby, R.; Fitzpatrick, J. M. (2012): Optimising repeat prostate biopsy decisions and procedures. In *BJU international* 109 (12), pp. 1750–1754. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2011.10809.x.
- Kirsch, J.; May, C, A.; Lorke, D.; Winkelmann, A.; Schwab, W.; Herrmann, G.; Funk, R. (2011): Taschenlehrbuch Anatomie. 80 Tabellen. Stuttgart: Thieme.
- Kononen, J.; Bubendorf, L.; Kallioniemi, A.; Bärnlund, M.; Schraml, P.; Leighton, S. et al. (1998): Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. In *Nat Med* 4 (7), pp. 884–887.
- Koren, Itay; Reem, Eran; Kimchi, Adi (2010): DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. In *Current biology: CB* 20 (12), pp. 1093–1098. DOI: 10.1016/j.cub.2010.04.041.

Kozakowski, Nicolas; Hartmann, Caroline; Klingler, Hans Christoph; Susani, Martin; Mazal, Peter R.; Scharrer, Anke; Haitel, Andrea (2014): Immunohistochemical expression of PDGFR, VEGF-C, and proteins of the mTOR pathway before and after androgen deprivation therapy in prostate carcinoma: significant decrease after treatment. In *Targeted oncology* 9 (4), pp. 359–366. DOI: 10.1007/s11523-013-0298-1.

Kramer, Mario W.; Merseburger, Axel S.; Hennenlotter, Jorg; Kuczyk, Markus (2007): Tissue microarrays in clinical urology--technical considerations. In *Scandinavian journal of urology and nephrology* 41 (6), pp. 478–484. DOI: 10.1080/00365590701430737.

Kremer, Celeste L.; Klein, Rob R.; Mendelson, Jenny; Browne, Walden; Samadzadeh, Linda K.; Vanpatten, Kristie et al. (2006): Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression. In: *The Prostate* 66 (11), S. 1203–1212. DOI: 10.1002/pros.20410.

Kruck, S.; Bedke, J.; Hennenlotter, J.; Ohneseit, P. A.; Kuehs, U.; Senger, E. et al. (2010): Activation of mTOR in renal cell carcinoma is due to increased phosphorylation rather than protein overexpression. In: *Oncology reports* 23 (1), S. 159–163.

Kruczek, K.; Ratterman, M.; Tolzien, K.; Sulo, S.; Lestingi, T. M.; Nabhan, C. (2013): A phase II study evaluating the toxicity and efficacy of single-agent temsirolimus in chemotherapy-naïve castration-resistant prostate cancer. In *British journal of cancer* 109 (7), pp. 1711–1716. DOI: 10.1038/bjc.2013.530.

Kumar, G.; Rudbeck, L. (Eds.) (2009): *Education Guide Immunohistochemical (IHC) Staining Methods*. Updated and Expanded Fifth Editi. Dako. Available online at [http://www.dako.com/08002\\_ihc\\_staining\\_methods\\_5ed.pdf](http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf).

Kupelian, P.; Potters, L.; Khuntia, D.; Ciezki, JP.; Reddy, CA.; Am Reuther et al. (2004): Radical prostatectomy, external beam radiotherapy <72 Gy, external beam radiotherapy > or =72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1-T2 prostate cancer. In *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (58 (1)), pp. 25–33.

Kupelian, PA.; Elshaikh, M.; Reddy, CA.; Zippe, C.; Klein, EA. (2002): Comparison of the efficacy of local therapies for localized prostate cancer in the prostate-specific antigen era: a large single-institution experience with radical prostatectomy and external-beam radiotherapy. In *J Clin Oncol* 15;20 (16), pp. 3376–3385.

Kuramoto, T.; Senzaki, H.; Koike, H.; Yamagiwa, K.; Tamura, S.; Fujimoto, T.; Inagaki, T. (2013): Cholestatic jaundice as a paraneoplastic manifestation of prostate cancer. In *Case reports in urology*, p. 303727. DOI: 10.1155/2013/303727.

Laplante, Mathieu; Sabatini, David M. (2009): mTOR signaling at a glance. In *Journal of cell science* 122 (Pt 20), pp. 3589–3594. DOI: 10.1242/jcs.051011.

Lazaris-Karatzas, A.; Montine, K. S.; Sonenberg, N. (1990): Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. In *Nature* 345 (6275), pp. 544–547. DOI: 10.1038/345544a0.

Lee, Alvin J. X.; Endesfelder, David; Rowan, Andrew J.; Walther, Axel; Birkbak, Nicolai J.; Futreal, P. Andrew et al. (2011): Chromosomal instability confers intrinsic multidrug resistance. In: *Cancer research* 71 (5), S. 1858–1870. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3604.

Lee, Dung-Fang; Kuo, Hsu-Ping; Chen, Chun-Te; Hsu, Jung-Mao; Chou, Chao-Kai; Wei, Yongkun et al. (2007): IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor

- angiogenesis via the mTOR pathway. In *Cell* 130 (3), pp. 440–455. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.058.
- Limon, Jose J.; Fruman, David A. (2012): Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation. In *Frontiers in immunology* 3, p. 228. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00228.
- Lin, Hui-Ping; Lin, Ching-Yu; Huo, Chieh; Jan, Yee-Jee; Tseng, Jen-Chih; Jiang, Shih Sheng et al. (2015): AKT3 promotes prostate cancer proliferation cells through regulation of Akt, B-Raf, and TSC1/TSC2. In: *Oncotarget* 6 (29), S. 27097–27112. DOI: 10.18632/oncotarget.4553.
- Liu, Kangdong; Park, Chanmi; Li, Shengqing; Lee, Ki Won; Liu, Haidan; He, Long et al. (2012): Aloe-emodin suppresses prostate cancer by targeting the mTOR complex 2. In *Carcinogenesis* 33 (7), pp. 1406–1411. DOI: 10.1093/carcin/bgs156.
- Loeb, S.; Carter, B.; Sonja, I.; Ricker, W.; Schaeffer, E. (2011): Complications after prostate biopsy: data from SEER-Medicare. In *The Journal of Urology* 186 (5), pp. 1830–1834. DOI: 10.1016/j.juro.2011.06.057.
- Loeb, S.; Partin, A. W. (2011): Review of the Literature: PCA3 for Prostate Cancer Risk Assessment and Prognostication. In *Reviews in Urology* 13 (4), pp. 191–195.
- Long, Xiaomeng; Lin, Yenshou; Ortiz-Vega, Sara; Yonezawa, Kazuyoshi; Avruch, Joseph (2005): Rheb binds and regulates the mTOR kinase. In *Current biology: CB* 15 (8), pp. 702–713. DOI: 10.1016/j.cub.2005.02.053.
- Lotan, Tamara L.; Gurel, Bora; Sutcliffe, Siobhan; Esopi, David; Liu, Wennuan; Xu, Jianfeng et al. (2011): PTEN protein loss by immunostaining: analytic validation and prognostic indicator for a high risk surgical cohort of prostate cancer patients. In *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (20), pp. 6563–6573. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1244.
- Ma, L.; Shen, C.; Chai, J.; Yin, H.; Deng, H.; Feng, R. (2015): Extracellular signal-regulated kinase-mammalian target of rapamycin signaling and forkhead-box transcription factor 3a phosphorylation are involved in testosterone's effect on severe burn injury in a rat model. In *Shock (Augusta, Ga.)* 43 (1), pp. 85–91. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000244.
- Ma, Li; Chen, Zhenbang; Erdjument-Bromage, Hediye; Tempst, Paul; Pandolfi, Pier Paolo (2005): Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. In *Cell* 121 (2), pp. 179–193. DOI: 10.1016/j.cell.2005.02.031.
- Ma, Xiaojun; Blenis, John (2009): Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (5), pp. 307–318. DOI: 10.1038/nrm2672.
- Majumder, Pradip K.; Febbo, Phillip G.; Bikoff, Rachel; Berger, Raanan; Xue, Qi; McMahon, Louis M. et al. (2004): mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. In: *Nature medicine* 10 (6), S. 594–601. DOI: 10.1038/nm1052.
- Mamane, Y.; Petroulakis, E.; LeBacquer, O.; Sonenberg, N. (2006): mTOR, translation initiation and cancer. In *Oncogene* 25 (48), pp. 6416–6422. DOI: 10.1038/sj.onc.1209888.

- Mamane, Yael; Petroulakis, Emmanuel; Rong, Liwei; Yoshida, Kaori; Ler, Lian Wee; Sonenberg, Nahum (2004): eIF4E--from translation to transformation. In *Oncogene* 23 (18), pp. 3172–3179. DOI: 10.1038/sj.onc.1207549.
- Manning, Brendan D.; Cantley, Lewis C. (2007): AKT/PKB signaling: navigating downstream. In *Cell* 129 (7), pp. 1261–1274. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
- Maygarden, S.J; Novotny, D. B.; Moul, J. W.; Bae, V. L.; Ware, J. L. (1994): Evaluation of cathepsin D and epidermal growth factor receptor in prostate carcinoma. In *Mod Pathol.* 7 (9), pp. 930–936.
- Meikle AW; Smith JA; West DW. (1985): Familial factors affecting prostatic cancer risk and plasma sex steroid levels. In *Prostate* 6, pp. 121–128.
- Meng, Ling-Hua; Zheng, Xf Steven (2015): Toward rapamycin analog (rapalog)-based precision cancer therapy. In *Acta pharmacologica Sinica* 36 (10), pp. 1163–1169. DOI: 10.1038/aps.2015.68.
- Merseburger, A. S.; Anastasiadis, A. G.; Hennenlotter, J.; Schilling, D.; Simon, P.; Machtens, S. A. et al. (2006a): Tissue microarrays: applications in urological cancer research. In: *World journal of urology* 24 (5), S. 579–584. DOI: 10.1007/s00345-006-0103-1.
- Merseburger, A. S.; Hennenlotter, J.; Simon, P.; Muller, C. C.; Kuhs, U.; Knuchel-Clarke, R. et al. (2006b): Activation of the PKB/Akt pathway in histological benign prostatic tissue adjacent to the primary malignant lesions. In: *Oncology reports* 16 (1), S. 79–83.
- Montero, Juan Carlos; Chen, Xi; Ocaña, Alberto; Pandiella, Atanasio (2012): Predominance of mTORC1 over mTORC2 in the regulation of proliferation of ovarian cancer cells: therapeutic implications. In *Molecular cancer therapeutics* 11 (6), pp. 1342–1352. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0723.
- Morgan, Todd M.; Koreckij, Theodore D.; Corey, Eva (2009): Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. In *Current cancer drug targets* 9 (2), pp. 237–249.
- Mottet, N.; Bellmunt, J.; Bolla, M.; Joniau, S.; Mason, M.; Matveev, V. et al. (Eds.) (2011): EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer (59).
- Mulders, P.; Santis, M.; Powles, T.; Fizazi, K. (2015): Targeted treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer with sipuleucel-T immunotherapy. In *Cancer immunology, immunotherapy: CII* 64 (6), pp. 655–663. DOI: 10.1007/s00262-015-1707-3.
- Muller, Julia; Ehlers, Arne; Burkhardt, Lia; Sirma, Huseyin; Steuber, Thomas; Graefen, Markus et al. (2013): Loss of pSer2448-mTOR expression is linked to adverse prognosis and tumor progression in ERG-fusion-positive cancers. In: *International journal of cancer* 132 (6), S. 1333–1340. DOI: 10.1002/ijc.27768.
- Murakami, Mirei; Ichisaka, Tomoko; Maeda, Mitsuyo; Oshiro, Noriko; Hara, Kenta; Edenhofer, Frank et al. (2004): mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. In *Molecular and cellular biology* 24 (15), pp. 6710–6718. DOI: 10.1128/MCB.24.15.6710-6718.2004.

National Cancer Institut (2014): SEER Training: Morphology & Grade. Available online at <http://training.seer.cancer.gov/prostate/abstract-code-stage/morphology.html>, updated on 7/21/2014, checked on 6/30/2015.

Nocito, A.; Kononen, J.; Kallioniemi, O. P.; Sauter, G. (2001): Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. In *International journal of cancer. Journal international du cancer* 94 (1), pp. 1–5. DOI: 10.1002/ijc.1385.

Ocana, Alberto; Vera-Badillo, Francisco; Al-Mubarak, Mustafa; Templeton, Arnoud J.; Corrales-Sanchez, Verónica; Diez-Gonzalez, Laura et al. (2014): Activation of the PI3K/mTOR/AKT pathway and survival in solid tumors: systematic review and meta-analysis. In *PloS one* 9 (4), pp. e95219. DOI: 10.1371/journal.pone.0095219.

Ohl, F.; Jung, M.; Xu, C.; Stephan, C.; Rabien, A.; Burkhardt, M. et al. (2005): Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 83 (12), S. 1014–1024. DOI: 10.1007/s00109-005-0703-z.

Ozes, O. N.; Akca, H.; Mayo, L. D.; Gustin, J. A.; Maehama, T.; Dixon, J. E.; Donner, D. B. (2001): A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (8), pp. 4640–4645. DOI: 10.1073/pnas.051042298.

Paplomata, Elisavet; Zelnak, Amelia; O'Regan, Ruth (2013): Everolimus: side effect profile and management of toxicities in breast cancer. In: *Breast cancer research and treatment* 140 (3), S. 453–462. DOI: 10.1007/s10549-013-2630-y.

Park, E.; Kim, Eun Kyoung; Kim, Minkyung; Ha, Jung Min; Kim, Young Whan; Jin, Seo Yeon et al. (2015): Androgen Receptor-dependent Expression of Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 6 is Necessary for Prostate Cancer Cell Proliferation. In *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 19 (3), pp. 235–240. DOI: 10.4196/kjpp.2015.19.3.235.

Peltier, A.; Aoun, F.; Lemort, M.; Kwizera, F.; Paesmans, M.; van Velthoven, R. (2015): MRI-targeted biopsies versus systematic transrectal ultrasound guided biopsies for the diagnosis of localized prostate cancer in biopsy naïve men. In *BioMed research international*. DOI: 10.1155/2015/571708.

Peterson, Timothy R.; Laplante, Mathieu; Thoreen, Carson C.; Sancak, Yasemin; Kang, Seong A.; Kuehl, W. Michael et al. (2009): DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. In *Cell* 137 (5), pp. 873–886. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.046.

Petroulakis, E.; Mamane, Y.; Le Bacquer, O.; Shahbazian, D.; Sonenberg, N. (2006): mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. In: *British journal of cancer* 94 (2), S. 195–199. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602902.

Pisansky, T.; Zincke, H.; Suman, V.; Bostwick, D.; Earle, J.; Oesterling, Joseph E. (1996): Correlation of pretherapy prostate cancer characteristics with histologic findings from pelvic lymphadenectomy specimens. In *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 34 (1), pp. 33–39. DOI: 10.1016/0360-3016(95)02099-3.

- Porstmann, Thomas; Santos, Claudio R.; Griffiths, Beatrice; Cully, Megan; Wu, Mary; Leever, Sally et al. (2008): SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. In *Cell metabolism* 8 (3), pp. 224–236. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.07.007.
- Pourmand, Gholamreza; Ziaee, Abed-Ali; Abedi, Amir Reza; Mehraei, Abdolrasoul; Alavi, Hossein Afshin; Ahmadi, Ali; Saadati, Hamid Reza (2007): Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. In: *Urology journal* 4 (2), S. 95–100.
- Prins, G. S.: What is the prostate and what are its functions? In *Society of Andrology*.
- Proud, C. G. (2004): mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. In: *Biochemical and biophysical research communications* 313 (2), S. 429–436.
- Proud, Christopher G. (2007): Signaling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. In *The Biochemical journal* 403 (2), pp. 217–234. DOI: 10.1042/BJ20070024.
- Qian, David Z.; Rademacher, Brooks L S; Pittsenbarger, Janet; Huang, Chung-Ying; Myrthue, Anne; Higano, Celestia S. et al. (2010): CCL2 is induced by chemotherapy and protects prostate cancer cells from docetaxel-induced cytotoxicity. In *The Prostate* 70 (4), pp. 433–442. DOI: 10.1002/pros.21077.
- Ragde, H.; Kenny, G. M.; Murphy, G. P.; Landin, K. (1997): Rapid Communication Transrectal Ultrasound Microbubble Contrast Angiography of the Prostate. In *Prostate* 32, pp. 279–283.
- Ramirez-Fort, Marigdalia K.; Case, Emily C.; Rosen, Alyx C.; Cerci, Felipe B.; Wu, Shenhong; Lacouture, Mario E. (2014): Rash to the mTOR inhibitor everolimus: systematic review and meta-analysis. In: *American journal of clinical oncology* 37 (3), S. 266–271. DOI: 10.1097/COC.0b013e318277d62f.
- Rathkopf, Dana E.; Larson, Steven M.; Anand, Aseem; Morris, Michael J.; Slovin, Susan F.; Shaffer, David R. et al. (2015): Everolimus combined with gefitinib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: Phase 1/2 results and signaling pathway implications. In: *Cancer* 121 (21), S. 3853–3861. DOI: 10.1002/cncr.29578.
- Richie J.P.; Catalona, WJ.; Ahmann, FR.; Hudson, MA.; Scardino, PT.; Flanigan, RC. et al. (1993): Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. In *Urology* 42 (4), pp. 365–374.
- Richter, Joel D.; Sonenberg, Nahum (2005): Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. In *Nature* 433 (7025), pp. 477–480. DOI: 10.1038/nature03205.
- Robbins, Christiane M.; Tembe, Waibov A.; Baker, Angela; Sinari, Shripad; Moses, Tracy Y.; Beckstrom-Sternberg, Stephen et al. (2011): Copy number and targeted mutational analysis reveals novel somatic events in metastatic prostate tumors. In: *Genome research* 21 (1), S. 47–55. DOI: 10.1101/gr.107961.110.
- Roberts J.; Essenhugh DM (1986): Adenocarcinoma of prostate in-year-old body-builder. In *The Lancet* 328 (8509), p. 742. DOI: 10.1016/S0140-6736(86)90251-5.
- Roehrborn, C.; John P.; Sanders, J. (1996): Diagnostic yield of repeated transrectal ultrasound-guided biopsies stratified by specific histopathologic diagnoses and prostate-specific antigen levels. In *Urology* 47 (3), pp. 347–352. DOI: 10.1016/S0090-4295(99)80451-8.

- Rojo, Federico; Najera, Laura; Lirola, Jose; Jimenez, Jose; Guzman, Marta; Sabadell, M. Dolores et al. (2007): 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (1), S. 81–89. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1560.
- Rosenkrantz, A.; Taneja, S. (2015): Prostate MRI Can Reduce Overdiagnosis and Overtreatment of Prostate Cancer. In *Academic radiology*. DOI: 10.1016/j.acra.2015.02.006.
- Rousseau, D.; Gingras, A. C.; Pause, A.; Sonenberg, N. (1996): The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. In *Oncogene* 13 (11), pp. 2415–2420.
- Roux, Philippe P.; Ballif, Bryan A.; Anjum, Rana; Gygi, Steven P.; Blenis, John (2004): Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (37), pp. 13489–13494. DOI: 10.1073/pnas.0405659101.
- Rubin, Mark A.; Dunn, Rodney; Strawderman, Myla; Pienta, Kenneth J. (2002): Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. In: *The American journal of surgical pathology* 26 (3), S. 312–319.
- Ryan, C.; Smith, M.; Bono, J. de; Molina, A.; Logothetis, C.; Souza, P. et al. (2013): Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. In *The New England journal of medicine* 368 (2), pp. 138–148. DOI: 10.1056/NEJMoa1209096.
- Sancak, Yasemin; Peterson, Timothy R.; Shaul, Yoav D.; Lindquist, Robert A.; Thoreen, Carson C.; Bar-Peled, Liron; Sabatini, David M. (2008): The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. In *Science (New York, N.Y.)* 320 (5882), pp. 1496–1501. DOI: 10.1126/science.1157535.
- Sarbassov, D. D.; Guertin, David A.; Ali, Siraj M.; Sabatini, David M. (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. In *Science (New York, N.Y.)* 307 (5712), pp. 1098–1101. DOI: 10.1126/science.1106148.
- Sarbassov, Dos D.; Ali, Siraj M.; Sengupta, Shomit; Sheen, Joon-Ho; Hsu, Peggy P.; Bagley, Alex F. et al. (2006): Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. In *Molecular cell* 22 (2), pp. 159–168. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.03.029.
- Sato, T.; Nakashima, A.; Guo, L.; Coffman, K.; Tamanoi, F. (2010): Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. In *Oncogene* 29 (18), pp. 2746–2752. DOI: 10.1038/onc.2010.28.
- Schanz, Moritz Bastian (2015): Immunhistochemische Untersuchungen zur lokoregionären Verteilung von mTOR, p-mTOR und 4E-binding protein im Prostataraum tumortragender Prostataen mittels der Tissue Microarray-Technik, Universität Tübingen, Dissertation
- Schieke, Stefan M.; Phillips, Darci; McCoy, J. Philip; Aponte, Angel M.; Shen, Rong-Fong; Balaban, Robert S.; Finkel, Toren (2006): The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. In *The Journal of biological chemistry* 281 (37), pp. 27643–27652. DOI: 10.1074/jbc.M603536200.
- Schlemmer, H. P. (2008): MRT und MR-Spektroskopie der Prostata. In *Fortschr Röntgenstr* 180 (S 1). DOI: 10.1055/s-2008-1073420.



- Schmid, H.-P.; Oberpenning, F.; Pummer, K. (1999): Diagnosis and Staging of Prostatic Carcinoma: What Is Really Necessary? In *Urologia Internationalis* (63.1).
- Schneider, Abraham; Younis, Rania H.; Gutkind, Silvio (2008): Hypoxia-Induced Energy Stress Inhibits the mTOR Pathway by Activating an AMPK/REDD1 Signaling Axis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. In *Neoplasia* 10 (11).
- Schröder, Fritz H. (2014): Screening for prostate cancer: current status of ERSPC and screening-related issues. In *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progrès dans les recherches sur le cancer 202*, pp. 47–51. DOI: 10.1007/978-3-642-45195-9\_5.
- Schünke, M.; Schulte, E.; Schumacher, U.; Voll, M. (2009): Prometheus LernAtlas der Anatomie. 2., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (2).
- Schwanhausser, Bjorn; Busse, Dorothea; Li, Na; Dittmar, Gunnar; Schuchhardt, Johannes; Wolf, Jana et al. (2011): Global quantification of mammalian gene expression control. In: *Nature* 473 (7347), S. 337–342. DOI: 10.1038/nature10098.
- Selman, Steven H. (2011): The McNeal prostate: a review. In *Urology* 78 (6), pp. 1224–1228. DOI: 10.1016/j.urology.2011.07.1395.
- Shaw, Reuben J.; Cantley, Lewis C. (2006): Ras, PI(3)K and mTOR Signaling controls tumour cell growth. In *Nature* 441 (7092), pp. 424–430. DOI: 10.1038/nature04869.
- Sheridan, Christine Moore; Grogan, Tristan R.; Nguyen, Hao G.; Galet, Colette; Rettig, Matthew B.; Hsieh, Andrew C.; Ruggero, Davide (2015): YB-1 and MTA1 protein levels and not DNA or mRNA alterations predict for prostate cancer recurrence. In: *Oncotarget* 6 (10), S. 7470–7480. DOI: 10.18632/oncotarget.3477.
- Siddiqui, Nadeem; Sonenberg, Nahum (2015): Signaling to eIF4E in cancer. In *Biochemical Society transactions* 43 (5), pp. 763–772. DOI: 10.1042/BST20150126.
- Siegel, R.; Miller, K.; Jemal, A. (2015): Cancer statistics, 2015. In *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65 (1), pp. 5–29. DOI: 10.3322/caac.21254.
- Sikka, Arron; Kaur, Manjinder; Agarwal, Chapla; Deep, Gagan; Agarwal, Rajesh (2012): Metformin suppresses growth of human head and neck squamous cell carcinoma via global inhibition of protein translation. In *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 11 (7), pp. 1374–1382. DOI: 10.4161/cc.19798.
- Siu, M. K.; Tsai, Y-C; Chang, Y-S; Yin, J. J.; Suau, F.; Chen, W-Y; Liu, Y-N (2015): Transforming growth factor-beta promotes prostate bone metastasis through induction of microRNA-96 and activation of the mTOR pathway. In: *Oncogene* 34 (36), S. 4767–4776. DOI: 10.1038/onc.2014.414.
- Skvortsova, Ira; Skvortsov, Sergej; Stasyk, Taras; Raju, Uma; Popper, Bela-Andre; Schiestl, Bernhard et al. (2008): Intracellular signaling pathways regulating radioresistance of human prostate carcinoma cells. In *Proteomics* 8 (21), pp. 4521–4533. DOI: 10.1002/pmic.200800113.
- Solenthaler, M.; Lämmle, B. (1999): Schwere Blutungen, Lymphozytose und leukoerythroblastäres Blutbild--disseminierte intravasale Gerinnung bei metastasierendem Prostatakarzinom und chronisch lymphatischer Leukämie. In *Therapeutische Umschau. Revue thérapeutique* 56 (9), pp. 533–536. DOI: 10.1024/0040-5930.56.9.533.

- Sparks, C. A.; Guertin, D. A. (2010): Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. In *Oncogene* 29 (26), pp. 3733–3744. DOI: 10.1038/onc.2010.139.
- Stambolic, V.; MacPherson, D.; Sas, D.; Lin, Y.; Snow, B.; Jang, Y. et al. (2001): Regulation of PTEN Transcription by p53. In *Molecular cell* 8 (2), pp. 317–325. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00323-9.
- Stattin, P. (2000): Plasma Insulin-Like Growth Factor-I, Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins, and Prostate Cancer Risk: a Prospective Study. In *Journal of the National Cancer Institute* 92 (23), pp. 1910–1917. DOI: 10.1093/jnci/92.23.1910.
- Steelman, Linda S.; Bertrand, Fred E.; McCubrey, James A. (2004): The complexity of PTEN: mutation, marker and potential target for therapeutic intervention. In *Expert opinion on therapeutic targets* 8 (6), pp. 537–550. DOI: 10.1517/14728222.8.6.537.
- Steinberg GD; Carter BS; Beaty TH; Childs B; Walsh PC. (1990): Family history and the risk of prostate cancer. In *Prostate* (337-347), checked on 2/11/2015.
- Stelloo, Suzan; Sanders, Joyce; Nevedomskaya, Ekaterina; Jong, Jeroen de; Peters, Dennis; van Leenders, Geert J. L. H. et al. (2016): mTOR pathway activation is a favorable prognostic factor in human prostate adenocarcinoma. In: *Oncotarget* 7 (22), S. 32916–32924. DOI: 10.18632/oncotarget.8767.
- Stenzl, A.; Pelzer A.; Bischoff S.; Burkhardt A.; Cuno M.; Damms A. et al. (2009): Prostatakarzinom - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. In *Therapieempfehlungen des Südwestdeutschen Tumorzentrums – Comprehensive Cancer Center Tübingen*.
- Sutherland, Sarah I. M.; Pe Benito, Ruth; Henshall, Susan M.; Horvath, Lisa G.; Kench, James G. (2014): Expression of phosphorylated-mTOR during the development of prostate cancer. In: *The Prostate* 74 (12), S. 1231–1239. DOI: 10.1002/pros.22840.
- Tang, C. Y.; Shen, A.; Wei, X. F.; Li, Q. D.; Liu, R.; Deng, H. J. et al. (2015): Everolimus in de novo liver transplant recipients: a systematic review. In *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 14 (5), pp. 461–469.
- Taplin ME., Ho S-M (2001): The Endocrinology of Prostate Cancer. In *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (8), pp. 3467–3477.
- Taylor, Barry S.; Schultz, Nikolaus; Hieronymus, Haley; Gopalan, Anuradha; Xiao, Yonghong; Carver, Brett S. et al. (2010): Integrative genomic profiling of human prostate cancer. In *Cancer cell* 18 (1), pp. 11–22. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.05.026.
- Templeton, Arnoud J.; Dutoit, Valerie; Cathomas, Richard; Rothermundt, Christian; Bartschi, Daniela; Droge, Cornelia et al. (2013): Phase 2 trial of single-agent everolimus in chemotherapy-naive patients with castration-resistant prostate cancer (SAKK 08/08). In: *European urology* 64 (1), S. 150–158. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.03.040.
- Thomas, George V. (2006): mTOR and cancer: reason for dancing at the crossroads? In *Current opinion in genetics & development* 16 (1), pp. 78–84. DOI: 10.1016/j.gde.2005.12.003.
- Thompson, Ian M.; Tangen, Catherine M.; Paradelo, Jorge; Lucia, M. Scott; Miller, Gary; Troyer, Dean et al. (2009): Adjuvant radiotherapy for pathological T3N0M0 prostate cancer significantly reduces risk of metastases and improves survival: long-term followup of a

randomized clinical trial. In *The Journal of Urology* 181 (3), pp. 956–962. DOI: 10.1016/j.juro.2008.11.032.

Topisirovic, Ivan; Ruiz-Gutierrez, Melisa; Borden, Katherine L. B. (2004): Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. In: *Cancer research* 64 (23), S. 8639–8642. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2677.

Urano, Jun; Sato, Tatsuhiro; Matsuo, Tomohiko; Otsubo, Yoko; Yamamoto, Masayuki; Tamanoi, Fuyuhiko (2007): Point mutations in TOR confer Rheb-independent growth in fission yeast and nutrient-independent mammalian TOR signaling in mammalian cells. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (9), pp. 3514–3519. DOI: 10.1073/pnas.0608510104.

Vaishampayan, Ulka; Shevrin, Daniel; Stein, Mark; Heilbrun, Lance; Land, Susan; Stark, Karri et al. (2015): Phase II trial of carboplatin, everolimus and prednisone in metastatic castrate resistant prostate cancer pretreated with docetaxel chemotherapy: A Prostate Cancer Clinical Trial Consortium Study. In *Urology*. DOI: 10.1016/j.urology.2015.08.008.

Van der Kwast, T.; Bolla, M.; van Poppel, H.; van Cangh, P.; Vekemans, K.; Da Pozzo, L. et al. (2007): Identification of patients with prostate cancer who benefit from immediate postoperative radiotherapy: EORTC 22911. In *J Clin Oncol* (27), pp. 4178–4186.

Vickers, A.; Savage, C.; Bianco, F.; Mulhall, J.; Sandhu, J.; Guillonneau, B. et al. (2011): Cancer control and functional outcomes after radical prostatectomy as markers of surgical quality: analysis of heterogeneity between surgeons at a single cancer center. In *European urology* 59 (3), pp. 317–322. DOI: 10.1016/j.eururo.2010.10.045.

Visakorpi, T.; Hyytinen, E.; Koivisto, P.; Tanner, M.; Keinänen, R.; Palmberg, C. et al. (1995): In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. In *Nat Genet.* 4 (9), pp. 401–406.

Waalkes, S.; Simon, P.; Hennenlotter, J.; Knapp, J.; Tezval, H.; Serth, J. et al. (2010): Altered expression of Akt signaling pathway parameters in prostate needle biopsies derived from benign, adjacent and cancerous tissue. In: *Oncology reports* 23 (5), S. 1257–1260.

Walz, Jochen; Graefen, Markus; Chun, Felix K-H; Erbersdobler, Andreas; Haese, Alexander; Steuber, Thomas et al. (2006): High incidence of prostate cancer detected by saturation biopsy after previous negative biopsy series. In: *European urology* 50 (3), S. 498–505. DOI: 10.1016/j.eururo.2006.03.026.

Wang, Lifu; Harris, Thurl E.; Roth, Richard A.; Lawrence, John C. (2007): PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. In *The Journal of biological chemistry* 282 (27), pp. 20036–20044. DOI: 10.1074/jbc.M702376200.

Werner, Jan-Ole (2014): Evaluation der Bedeutung der mTOR- und 4E-BP1 Expression mittels quantitativer PCR vor dem Hintergrund einer potenziellen diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Bedeutung beim Prostatakarzinom, Universität Tübingen, Dissertation

Witjes, J.; Compérat, E.; Cowan, N. C.; Santis, M. de; Gakis, G.; Lebré, T. et al. (Eds.) (2014): *Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer*.

Wu, Y.; Chhipa, R. R.; Cheng, J.; Zhang, H.; Mohler, J. L.; Ip, C. (2010): Androgen receptor-mTOR crosstalk is regulated by testosterone availability: implication for prostate cancer cell survival. In *Anticancer Res* 30 (10), pp. 3895–3901.

Yin, M.; Bastacky, S.; Chandran, U.; Becich, M.; Dhir, R. (2008): Prevalence of incidental prostate cancer in the general population: a study of healthy organ donors. In *The Journal of Urology* 179 (3), pp. 892-5; discussion 895. DOI: 10.1016/j.juro.2007.10.057.

Young, Deborah A.; Nickerson-Nutter, Cheryl L. (2005): mTOR — beyond transplantation. In *Cancer / Immunomodulation* 5 (4), pp. 418–423. DOI: 10.1016/j.coph.2005.03.004.

Yu, Chia-Chun; Wu, Ping-Jung; Hsu, Jui-Ling; Ho, Yunn-Fang; Hsu, Lih-Ching; Chang, Yu-Jia et al. (2013): Ardisianone, a natural benzoquinone, efficiently induces apoptosis in human hormone-refractory prostate cancers through mitochondrial damage stress and survivin downregulation. In *The Prostate* 73 (2), pp. 133–145. DOI: 10.1002/pros.22548.

Zhande, R.; Mitchell, J. J.; Wu, J.; Sun, X. J. (2002): Molecular Mechanism of Insulin-Induced Degradation of Insulin Receptor Substrate 1. In *Molecular and cellular biology* 22 (4), pp. 1016–1026. DOI: 10.1128/MCB.22.4.1016-1026.2002.

Zhang, Hongbing; Bajraszewski, Natalia; Wu, Erxi; Wang, Hongwei; Moseman, Annie P.; Dabora, Sandra L. et al. (2007): PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. In *The Journal of clinical investigation* 117 (3), pp. 730–738. DOI: 10.1172/JCI28984.

Zhou, Hongyu; Huang, Shile (2010): The complexes of mammalian target of rapamycin. In *Current protein & peptide science* 11 (6), S. 409–424.

Zhou, Hongyu; Huang, Shile (2011): Role of mTOR Signaling in Tumor Cell Motility, Invasion and Metastasis. In *Current protein & peptide science* 12 (1), pp. 30–42.

Zhou, XiaoYan; Tan, Ming; Stone Hawthorne, Valerie; Klos, Kristine S.; Lan, Keng-Hsueh; Yang, Ying et al. (2004): Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. In *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (20), S. 6779–6788. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0112.

Zinzalla, Vittoria; Stracka, Daniele; Oppliger, Wolfgang; Hall, Michael N. (2011): Activation of mTORC2 by association with the ribosome. In *Cell* 144 (5), pp. 757–768. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.014.

## 7 Darstellung des Eigenanteils

Hiermit erkläre ich, Hannes von Sivers, dass ich diese Arbeit eigenständig verfasst habe und keine weiteren Literaturquellen und Hilfestellungen, als im Folgenden angegeben, benutzt habe. Dabei versichere ich, dass ich alle inhaltlichen bzw. wörtlich übernommenen Textpassagen auch als solche kenntlich gemacht habe.

Das Konzept dieser Arbeit wurde an der Universitätsklinik für Urologie Tübingen mit dem Schwerpunktbereich der Onko-Urologie entwickelt. Beteiligt daran waren Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl, Herr PD Dr. med. Tilman Todenhöfer, Herr Dr. med. Stefan Aufderklamm sowie Herr Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter.

Dabei wurde auf ein Basis-Patientenkollektiv zurückgegriffen, dass von Dr. med. Jan-Ole Werner (Werner 2014) erstellt wurde. In seiner Arbeit wurden mRNA Daten erhoben, welche den Grundstein dieser Arbeit darstellten. Die Erweiterung dieses Patientenkollektivs erfolgte zusammen mit Hilfe von Mara Schwabe, Doktorandin der Universität Tübingen.

Zur TMA-Erstellung wurde auf bestehende Paraffin-Blöcke der Universität Tübingen zurückgegriffen, zu denen bereits korrespondierende HE-Färbungen vorlagen.

Das Einzeichnen der Entnahmestellen für die Herstellung der TMA-Blöcke erfolgte zusammen mit Mara Schwabe, die histopathologische Überprüfung ihrer Richtigkeit durch Dr. med. Marcus Scharpf, Pathologisches Institut der Universitätsklinik Tübingen. Die histopathologische Begutachtung der Gewebe des erweiternden Kollektivs erfolgte durch damalige Mitarbeiter des Department of Pathology der Universität von Pittsburgh, USA.

Die Erstellung der TMA-Blöcke erfolgte zusammen mit Mara Schwabe, die darüber hinaus eigenständig die Färbescores der mTOR Expression vornahm. Alle weiteren Daten wurden alleine von mir erhoben. Das Schneiden der TMA-Blöcke und die Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte durch Frau Ursula Kühs, MTA im Uro-Onkologischen Labor der Universitätsklinik Tübingen.

Die statistische Auswertung sowie die Interpretation aller Daten geschah alleine durch mich, wobei grundsätzliche Hilfestellungen durch Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter sowie durch Herrn cand. inform. Tim Neumann erfolgten.

Diese Arbeit wurde von Herrn PD Dr. med. Tilman Todenhöfer und Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter betreut, welche Hilfestellungen bezüglich der Gliederung der Arbeit gaben und eine unterstützende Funktion bei der schriftlichen Ausführung der Arbeit einnahmen, indem sie Korrekturvorschläge einbrachten sowie inhaltliche Inspirationen bereithielten. Herr PD Dr.

med. Tilman Todenhöfer half ebenfalls bei der Ideenfindung zur Re-Evaluation der mRNA Daten.

## 8 Anhang

### 8.1 Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl, dem ärztlichen Direktor der Urologischen Klinik, bedanken: Für die Vergabe des Themas, für seine stetige Bereitschaft, bei Problemen und Fragen immer persönlich zu Verfügung zu stehen und für die Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Danken möchte ich nicht minder Herrn PD Dr. med. Tilmann Todenhöfer für den regen Informations- und Ideenaustausch im Rahmen seiner Betreuung, welcher auch von seinem zwischenzeitigen Kanada-Aufenthalt nicht gebremst werden konnte.

Herr Dr. med. Stefan Aufderklamm soll ebenfalls für die Betreuung meiner Dissertation an dieser Stelle Dank erfahren.

Bedanken möchte ich mich auch sehr bei Herrn Dr. med. Marcus Scharpf, Facharzt für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen, für die pathologische Beratung bei dem gemeinsamen stundenlangen Überprüfen der gecirclen Schnittpräparate. Auch für das mühsame Einscannen der immunhistochemisch gefärbten Schnitte soll ihm ein großer Dank ausgesprochen werden.

Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter muss ein ausgesprochen großer Dank zuteilwerden. Er war stets erreichbar und konnte fachlich kompetent mit seiner großen Expertise und vielen Anregungen und Hinweisen bei allen Schwierigkeiten weiterhelfen. Mit seinem überdurchschnittlich großen Engagement war er stets eine verlässliche Stütze der Dissertation.

Darüber hinaus möchte ich mich beim ganzen Team des Labors der Urologie der Universität Tübingens für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Frau Ursula Kühs sei dabei gesondert zu nennen und ihr für die gekonnte Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen zu danken.

Bei meiner Mitdotorandin und guten Freundin Mara Schwabe möchte ich mich für ihre Arbeit und ihre muntere Art bedanken, mit der sie unsere vielen gemeinsamen Stunden im Labor der Urologie und in den Archiven der Pathologie stets aufgeheitert hat.

Einen großen Dank auch an all die Korrekturlesenden, vor allem an meine Mutter, die dank ihrer akribischen Art trotz ihrer fachlichen Ferne auch zu vielen inhaltlichen klarstellenden

Verbesserungen beigetragen hat. Auch meiner Freundin Johanna Beermann sei für ihr konstruktives Korrekturlesen an dieser Stelle gedankt.

Ebenfalls soll meiner Familie für ihre technische, beratende und motivierende Hilfe gedankt sein.



## 8.2 Lebenslauf

### Angaben zur eigenen Person

Name: Hannes von Sivers  
Geburtsdatum: 10.05.1990  
Geburtsort: Freiburg i.Br.  
Nationalität: Deutsch

### Schulbildung

1996-2000 Grundschule – Lazarus von Schwendi Grundschule, Ehrenkirchen  
2000-2009 Kreisgymnasium Bad Krozingen  
2009 Erlangen der Hochschulreife – Abitur Note 1,0 „sehr gut“

### Universitäre Bildung

04/2011 – 07/2017 Studium der Humanmedizin – Eberhard Karls Universität Tübingen  
2013/03 Erstes Staatsexamen (Physikum) – Note 1,5 “sehr gut“  
2016/04 Zweites Staatsexamen – Note 1,0 “sehr gut”  
2017/05/30 Drittes Staatsexamen – Note 1,0 „sehr gut“  
2017/06 Erhalt der Approbation, Abschluss des Medizinstudiums – Note 1,17

### Famulaturen

09/2013 & 08/2014 4 Wochen – Allgemeinmedizin, Dr. Klingele, Hinterzarten  
04/2014 5 Wochen – Innere Medizin, Bundeswehrkrankenhaus Koblenz  
09/2014 5 Wochen – Allgemeinchirurgie, Bundeswehrkrankenhaus Hamburg  
03/2015 4 Wochen – Notaufnahme, Western Regional Hospital, Pokhara, Nepal

### Praktisches Jahr

05/2016 – 09/2016 Pädiatrie, Klinikum Esslingen  
09/2016 – 12/2016 Innere Medizin, Klinikum Esslingen  
12/2016 – 04/2017 Chirurgie, Karapitiya Teaching Hospital, Galle, Sri Lanka

### Wissenschaftliche Tätigkeit

07/2014-09/2017 Promotion in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen

### Berufliche Tätigkeit

2017/06 Beginn der Facharztausbildung für Innere Medizin im Bundeswehrkrankenhaus Koblenz