

Aus dem Labor für Tumorimmunologie
LIFE Zentrum
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschäftsführer: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Zimmermann

**Neue Zielantigene sowie prognostische Marker
für das Nierenzellkarzinom**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Martin Eder

Lenggries

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Siebels

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2014

Teile dieser Arbeit trugen zu der folgenden Publikation bei:

Riesenberg R., Weiler C., Spring O., **Eder M.**, Buchner A., Popp T., Castro M., Kammerer R., Takikawa O., Hatz R., Stief C., Hofstetter A., Zimmermann W., Expression of indoleamine 2,3- dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long term survival of renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* 13:6993-7002 (2007)

Eidesstattliche Versicherung

Eder, Martin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Lenggries, 26.06.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

*In Dankbarkeit gewidmet,
meinen Eltern für die Wurzeln und Richtung,
meiner Frau und meinen Kindern
für die Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Liebe
sowie meinem Lebenstraum für meine Zukunft*

1	Einleitung	8
1.1	Epidemiologische Daten zum Nierenzellkarzinom.....	8
1.2	Risikofaktoren für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms.....	8
1.3	Symptome und Diagnostik.....	8
1.4	Staging	9
1.4.1	Die TNM-Einteilung des RCCs	9
1.4.2	UICC-Klassifikation der RCCs nach Storkel.....	9
1.5	Prognose	10
1.6	Aktuelle therapeutische Ansätze beim RCC.....	11
1.6.1	Chirurgische Therapie	11
1.6.2	Tumorimmuntherapie.....	11
1.6.2.1	Zielantigen-gerichtete Therapeutika	13
1.6.2.2	Tumor-Vakzine und adoptiver T-Zelltransfer	15
1.6.3	Tumorprofiling.....	15
1.7	Aufgabenstellung	16
2	Material	17
2.1	Geräte	17
2.2	Einmalartikel	17
2.3	Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien.....	17
2.4	Kits	17
2.5	Oligonukleotide	18
3	Methoden	19
3.1	Aufarbeitung des Gewebematerials von Patienten	19
3.2	Bestimmung des Gewebetyps und Staging	19
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	19
3.3.1	RNA-Isolierung aus humanen Nierengeweben	19
3.3.2	Qualitätskontrolle der RNA	20
3.3.2.1	RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie	20
3.3.2.2	Kapillargelelektrophorese	20
3.3.3	Reverse Transkription der RNA in cDNA.....	20
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion	22
3.3.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	24
3.3.6	Quantitative RT-PCR	25
3.4	Statistische Methoden	26
3.4.1	Normierung der Daten	26
3.4.2	Vergleich aller Gewebeproben miteinander.....	26
3.4.3	Follow-up der Patienten.....	26
4	Ergebnisse	27
4.1	RNA-Qualitätskontrolle.....	27
4.2	Zusammensetzung des Patientenkollektivs	29
4.2.1	Geschlecht und Alter	29
4.2.2	Klassifizierung der RCC-Gewebe	29
4.3	Reverse Transkription	30
4.4	Auswahl von Kandidatengenprodukten als Zielantigene.....	30
4.4.1	Vorarbeiten	30
4.4.2	Internetrecherche.....	31

4.4.3	Qualitätskontrolle der verwendeten Oligonukleotide	31
4.5	Verwendung von externen Expressionsdaten	32
4.6	Expression der Kandidatengene in.....	32
	Normalnieren- und RCC-Gewebeproben	32
4.7	Überlebensdauer der Tumorpatienten	34
4.7.1	Allgemeines	34
4.7.2	β -Aktin	34
4.7.3	CA9	35
4.7.4	SLC6A3	35
4.7.5	PTHLH	36
4.7.6	FGF11.....	37
5	Diskussion	38
5.1	Wert der Kandidatengene als Zielantigene und	38
	prognostische Marker	38
5.1.1	CA9	38
5.1.2	SLC6A3	39
5.1.3	PTHLH	40
5.1.4	FGF11.....	41
5.2	Ausblick	42
6	Zusammenfassung	44
7	Literaturverzeichnis	47
8	Abkürzungsverzeichnis	52
9	Danksagung	54
10	Lebenslauf	55

1 Einleitung

1.1 Epidemiologische Daten zum Nierenzellkarzinom

Im Jahr 2002 waren in Deutschland bei Männern etwa 4,9 % aller Krebsneuerkrankungen Nierenkarzinome, bei Frauen 3,2 %. Die Mortalität von an Nierenzellkarzinomen Erkrankten stieg in den letzten 20 Jahren in Deutschland trotz verbesserter Früherkennung durch hochwertige Ultraschallgeräte und häufigere Routineuntersuchungen leicht an. Der Quotient aus Mortalität und Inzidenz ergibt bei Frauen eine Schätzung für die Letalität von 38 %, bei den Männern von 45 %. Der Häufigkeitsgipfel liegt im 50. bis 70. Lebensjahr (www.krebsdaten.de).

1.2 Risikofaktoren für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms

Als Risikofaktoren für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms (*renal cell carcinoma* [RCC]) werden sowohl die Exposition mit Cadmium, Teer und Holzschutzmitteln als auch mit petrochemischen Substanzen diskutiert. „Intrinsische“ Risikofaktoren stellen *Adipositas per magna*, Nierenadenome, polyzystische Nierenerkrankungen, Dialysepflichtigkeit sowie Nikotinabusus dar. Nierenadenome und polyzystische Nierenerkrankungen basieren häufig auf einer genetischen Prädisposition. Bisher wurden mehrere Gene und chromosomale Loci beschrieben, die mit der Entstehung des RCC verknüpft sind (Bertolotto et al. 2011).

1.3 Symptome und Diagnostik

Das RCC ist ein Tumor, der erst sehr spät klinisch in Erscheinung tritt. Die klassische Trias aus Flankenschmerz, Hämaturie und tastbarem Tumor ist nur in 5-9 % der Fälle zu beobachten. In diesen ist die Krankheit bereits weit fortgeschritten und der Tumor hat Metastasen gebildet. Der größte Anteil an detektierten Neuerkrankungen wird bei Routine-Sonographie-Kontrollen des Abdomens diagnostiziert. Nach Beobachtung einer suspekten Raumforderung der Niere erfolgt die computertomographische bzw. magnetresonanztomographische Abklärung. Erhärtet sich hier der Verdacht auf ein Malignom, wird zum Ausschluss von Skelettmastasen eine Knochenszintigraphie durchgeführt. Nach abgeschlossenem *Staging* erfolgt bei potentieller Operabilität die operative Tumorextirpation, heute hauptsächlich organerhaltend durch Nierenteilresektion. In einem intraoperativ angefertigten Schnellschnitt kann die Diagnose gesichert werden.

1.4 Staging

1.4.1 Die TNM-Einteilung des RCCs

Die pathomorphologische Einteilung des RCCs (*Staging*) erfolgt nach der TNM-Klassifikation maligner Tumoren von 2002 und unterscheidet:

- lokal begrenzte pT1-Karzinome bis zu einer Größe von 7 cm, begrenzt auf die Niere
- Karzinome kleiner 4 cm (pT1a)
- Karzinome größer 4 cm (pT1b)
- lokal begrenzte pT2-Karzinome mit einer Größe über 7 cm
- lokal fortgeschrittene pT3-Karzinome mit Fettkapseldurchbruch bzw. ipsilateralem Nebennierenbefall (pT3a)
- makroskopische Ausbreitung in der *Vena renalis* oder bis in die *Vena cava* unterhalb des Zwerchfells (pT3b)
- makroskopische Ausbreitung in der *Vena cava* oberhalb der Zwerchfells (pT3c)
- lokal fortgeschrittene pT4-Karzinome mit einer Infiltration über die Gerota-Faszie hinaus.

Bei Befall eines regionären Lymphknotens wird der Lymphknotenstatus als pN1 bezeichnet. Bei mehr als einer regionären Lymphknotenmetastase wird der Status als pN2 bezeichnet. Sind keine Fernmetastasen vorhanden, so spricht man von M0 im Gegensatz zu M1 beim Vorhandensein von Fernmetastasen. Das *Grading* beschreibt die Differenzierung des Tumors und reicht von G1 (differenziert) bis G4 (undifferenziert).

1.4.2 UICC-Klassifikation der RCCs nach Storkel.

Neben der klassischen TNM-Klassifizierung können Nierentumoren histopathologisch in klarzellige (70 – 80 % der RCCs), chromophobe (ca. 5 % der RCCs) und papilläre (10 – 15 % der RCCs) Subgruppen unterteilt werden. In diesem Zusammenhang konnten Mutationen des Chromosoms im Abschnitt 3p bei klarzelligem RCC, oft eine Trisomie 17 sowie eine Trisomie oder Tetrasomie 7 und multiple chromosomale Lücken bei chromophoben RCCs nachgewiesen werden (Tabelle 1).

Mit dieser zusätzlichen Einteilung kann der Verlauf der Erkrankung grob abgeschätzt werden. Die beste Überlebensprognose haben Patienten mit chromophobem und papillärem RCC. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit klarzelligem RCC beträgt 62 %, mit chromophobem RCC 92 % und mit papillärem RCC 82 – 90 % (Thoenes et al. 1988, Amin et al. 1997, Montironi et al. 1999, Zambrano et al. 1999). Einschränkend ist hier aber die große Streuung der Überlebensrate innerhalb der jeweiligen Gruppen festzustellen.

Tabelle 1: Häufige genetische Veränderungen beim RCC nach Storkel (Storkel et al. 1997)

Einteilung	Häufigkeit	Genetik
Klarzelliges Nierenkarzinom	ca. 70 %	Deletion auf Chromosom3p, etwa 50 % somatische Mutation im von Hippel-Lindau-Gen
Papilläres Nierenkarzinom	ca. 10 – 15 %	Trisomie der Chromosomen 3q, 7, 12, 16, 17, 20 und Verlust des Y-Chromosoms
Chromophobes Nierenkarzinom	ca. 5 %	Monosomie multipler Chromosomen (1, 2, 6, 10, 13, 17, 21) und Hypodiploidie
Sammelrohr-Karzinome	ca. 1 %	unbekannt
Unklassifizierte Nierenkarzinome	ca. 10 %	unbekannt

Die Unterschiede in der chromosomalen Struktur sowie das Auftreten unterschiedlicher Differenzierungstypen der RCCs legen den Verdacht nahe, dass die Tumoren anhand ihres Genexpressionsmusters unterschieden werden können. Dieser Verdacht wird durch eine Reihe von *Gene-expression-profiling*-Studien belegt. Methodisch wurde dieses Vorgehen erst durch die Etablierung der Oligonukleotid- oder cDNA-Microarray-Analysen ermöglicht. In einem einzigen Ansatz kann die Expression vieler tausend Gene untersucht werden. Die erhaltenen Daten werden nach vordefinierten Kriterien Software-gestützt gefiltert (*Clustering*). So können, je nach Problemstellung, z.B. Vorgaben hinsichtlich der Expressionshöhe gemacht werden: Von der Software können dann alle Gene ausgewählt werden, die im Nierenkarzinom z.B. doppelt so hoch wie in den Referenzgeweben exprimiert sind. In einem nächsten Schritt könnten dann alle Gene gewählt werden die nicht in weiteren Referenzgeweben (z.B. Muskulatur) exprimiert werden. Nach mehreren dieser Auswahlsschritte erhält man letztendlich eine Anzahl von interessanten Genen, die für potentielle Marker- oder Therapietargets kodieren (Young et al. 2001, Skubitz and Skubitz 2002, Higgins et al. 2003, Takahashi et al. 2003, Liou et al. 2004).

1.4.3 Prognose

Die Prognose korreliert mit dem Stadium der Erkrankung, dem histopathologischen Subtyp sowie dem Ort der Metastasierung. Das RCC metastasiert in die Lunge, Leber, Skelett, Nebennieren, die kontralaterale Niere sowie in das Gehirn. Diese Abfolge repräsentiert in absteigender Reihenfolge die Häufigkeit des Auftretens der jeweiligen Metastasen. Patienten mit Lungenmetastasen haben eine bessere Prognose als Patienten mit z.B. Lebermetastasen.

Bestimmte klinische Laborparameter erlauben auch eine Abschätzung der Prognose. So haben Patienten mit erhöhten Erythropoetin-Spiegeln eine bessere Prognose als Patienten mit niedrigen Spiegeln. Konträr verhält es sich mit einer erhöhten Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit (BKS), einer erhöhten Laktat-Dehydrogenase-Serumkonzentration, einem erniedrigten Hämoglobinwert sowie einer Thrombozytose oder Neutropenie

1.5 Aktuelle therapeutische Ansätze beim RCC

Es gilt derzeit als anerkannte Lehrmeinung, dass konventionelle Therapiestrategien wie Bestrahlung, Hormon- oder Chemotherapie sowie die konventionelle unspezifische Immuntherapie kaum einen Benefit für das Langzeitüberleben von Patienten mit RCC bringen. So gilt das RCC als weitgehend strahlungs- und chemoresistent, so dass sich der Einsatz der Strahlentherapie auf die palliative Anwendung gegen Knochen- und Hirnmetastasen beschränkt. Ursache für die Chemoresistenz könnte unter anderem eine Überexpression des *Multi-drug-resistance*-Proteins P-Glykoprotein sein (Mickisch 1994).

1.5.1 Chirurgische Therapie

Die Tumornephrektomie in Verbindung mit ipsilateraler Adrenalektomie und lokoregionärer Lymphadenektomie bei Durchbruch der Nierenkapsel stellt derzeit die Standardtherapie beim RCC dar. Als Ziel der chirurgischen Intervention muss aufgrund der eingeschränkten chemotherapeutischen Möglichkeiten die Entfernung des Primärtumors sowie aller Metastasen gelten.

Als untersuchte Alternative steht das weniger radikale, zum Teil nierenerhaltende, Vorgehen mit unterschiedlichen Zugangswegen bei kleineren peripher gelegenen Tumoren zur Verfügung. Ca. 30 % der Patienten entwickeln nach einer Nephrektomie oder Nierenteilresektion lokale Rezidive oder Fernmetastasen. Das Ziel der Behandlung beschränkt sich also bei diesem Teil der Patienten auf einen palliativen Ansatz, da das metastasierte RCC als nicht heilbar gilt. Ziel ist eine Verlängerung des Überlebens von durchschnittlich zehn bis 12 Monaten bei metastasierter Erkrankung in Verbindung mit guter Lebensqualität.

1.5.2 Tumorimmuntherapie

Die bis vor wenigen Jahren gängige unspezifische Immuntherapie mit den Zytokinen IL-2 und/oder Interferon- α (IFN α) mit/ohne dem Chemotherapeutikum 5-FU hat nur sehr geringe Ansprechraten von 5 - 10% (Schendel et al. 1997, Atzpodien et al. 2001, Ravaud et al. 2003). Verantwortlich könnten eventuell *Immune-escape*-Mechanismen sein.

Von Tumorzellen werden verschiedenste zum Teil tumorspezifische Antigene präsentiert, jedoch gelingt es dem Tumor, sich der körpereigenen Immunabwehr zu entziehen und zu wachsen, in Nachbarorgane zu infiltrieren und letztendlich zu metastasieren. Verschiedene Arbeiten konnten das Vorhandensein aller an der Immunabwehr beteiligter Zellen auch im RCC nachweisen. Jedoch fehlt diesen Zellen die Effektivität bzw. ihre Aktivität wird durch den Tumor modifiziert. Man spricht bei diesem Phänomen von *immune escape* des Tumors (Atkins et al. 2004, Lin et al. 2007).

Tabelle 2: Passive *Immune-escape*-Mechanismen

Passive <i>Immune-Escape</i>-Mechanismen	Effekt
MHC-I-Expression auf der Zelloberfläche niedrig oder nicht vorhanden	Mangelhafte oder fehlende Erkennung von Tumorantigenen durch T-Zellen
Expression nicht-klassischer MHC-I-Moleküle	Inhibition von T- und NK-Zellen
Mangelnde Expression inflammatorischer Zytokine	Fehlende Aktivierung von T-Zellen
Reduktion der Fas-Rezeptor-Expression	Reduktion der T-Zell vermittelten Apoptose

Tabelle 3: Aktive *Immune-Escape*-Mechanismen (Bhatia and Kumar 2014)

Aktive <i>Immune-Escape</i>-Mechanismen	Effekt
Expression von Fas-Liganden	Induktion der Apoptose in CD8 ⁺ T-Zellen
Expression vom anti-inflammatorischen Zytokinen	Inaktivierung von T-Zellen
Induktion von regulatorischen T-Zellen	Hemmung von T-Zellen
Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) oder Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO)	Hemmung von T-Zellen

Wegen der oben geschilderten Probleme bei der „traditionellen Immuntherapie“ bietet sich die Suche nach alternativen Therapieansätzen an, wodurch die Tumorimmuntherapie in den letzten Jahren einen deutlichen Aufschwung erlebte (Mellman et al. 2011). Hierbei bieten sich Zielantigen-gerichtete Immuntherapien an. Diese Immuntherapie kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, die abhängig von der Lage des Zielantigens ist. Bei zytosolischen Antigenen werden Antigenfragmente über MHC-Klasse-I extrazellulär präsentiert. Aktivierte, mit dem jeweiligen Antigen beladene dendritische Zellen wandern zu den das Tumorgebiet drainierende Lymphknoten. Hier erfolgt die Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen. Diese aktivierten T-Zellen verlassen den Lymphknoten, gelangen in die Blutbahn und verlassen diese in die peripheren Gewebe. Hier werden von den T-Zellen Tumorantigen präsentierende Tumoren erkannt und anschließend wird bei den erkannten Tumorzellen die Apoptosekaskade initiiert. Diese auf der zellvermittelten Immunität basierende Therapieoption ist in Abbildung 1 dargestellt. Bei auf der Zelloberfläche sitzenden Zielantigenen kann durch Zielantigen-Antikörper über eine durch Immunglobulin (Ig)-vermittelte Bindung über den Fc-Rezeptor an natürliche Killerzellen (NK)-Zellen die Apoptose eingeleitet werden. In 1B ist diese Möglichkeit der Antikörper-vermittelten Immunreaktion dargestellt (Yang et al. 2003).

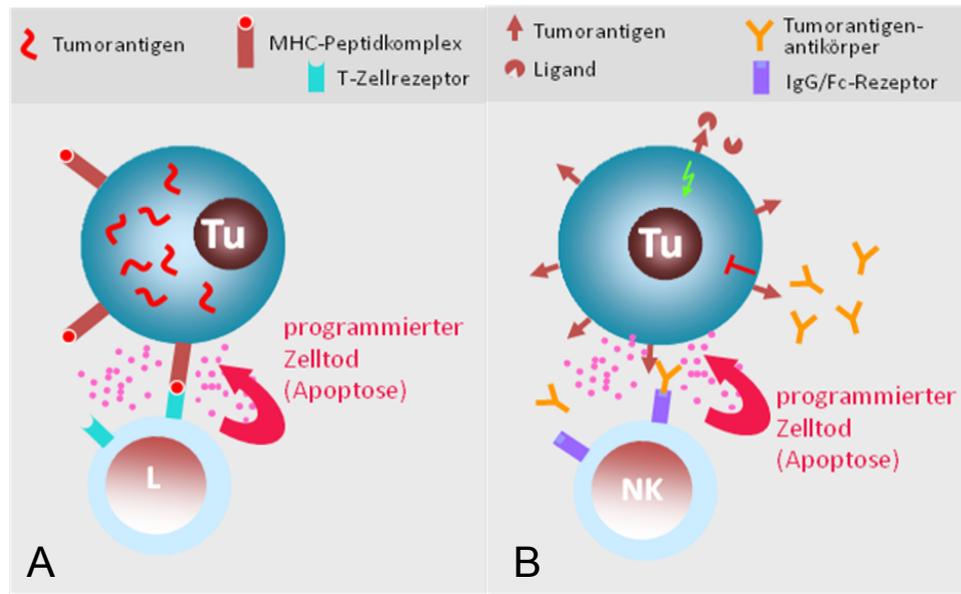


Abbildung 1: Schema der Zell- und antikörper-vermittelten Anti-Tumorimmunreaktion. (A) In der zellvermittelten Anti-Tumorimmunreaktion erkennen aktivierte mit dem jeweiligen Antigen beladene T-Lymphozyten (L) über antigenspezifische T-Zellrezeptoren durch MHC-I präsentierte Tumorpeptide. Dadurch werden die T-Zellen stimuliert. Diese sezernieren Effektormoleküle (lila Punkte) wie Perforin, die in der Tumorzelle Apoptose auslösen. (B) In der Antikörper-vermittelten Anti-Tumorimmunreaktion erkennen NK-Zellen, die über IgG am Fc-Rezeptor Tumorantigen-Antikörper gebunden haben, die von Tumorzellen auf der Zelloberfläche exprimierten Tumorantigene. Diese Antigen-Antikörperbindung bewirkt das Sezernieren von Effektormolekülen wie Perforin, die in der Tumorzelle Apoptose auslösen. Die Abbildung wurde von W. Zimmermann zur Verfügung gestellt.

Derzeitiger Forschungsansatz ist es, in das Wachstum von Tumorzellen durch gezielte Blockade wachstumsfördernder Proteine bzw. Signaltransduktionskaskaden einzugreifen. Erfolg versprechend sind hier die Neutralisation von Angiogenese-Faktoren wie Mitgliedern der VEGF-Familie oder die Inhibition der korrespondierenden Rezeptoren in Endothelzellen. In Studien konnte wiederholt die Wichtigkeit von Angiogenese-Faktoren bei der Tumorentstehung und Tumorweiterentwicklung des RCCs gezeigt werden (Takahashi et al. 2001, Young, Amin et al. 2001, Skubitz and Skubitz 2002, Takahashi, Yang et al. 2003).

Für einige dieser Faktoren und Rezeptoren konnten bereits Antikörper und niedermolekulare Inhibitoren hergestellt werden, welche in klinischen Studien in der Erprobung sind.

1.5.2.1 Zielantigen-gerichtete Therapeutika

Derzeit gibt es neun verschiedene von der *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* zugelassene monoklonale Antikörper, die jeweils gegen sechs tumorassoziierte Proteine gerichtet sind und ihre Wirksamkeit in der Behandlung solider und hämatologischer Tumoren mittels Studien bewiesen haben. Die Zielproteine sind: HER2/neu, EGFR, VEGF, CD20, CD52, CD33 (Mellman, Coukos et al. 2011). Als Beispiel soll Bevacizumab ein neutralisierender monoklonaler Antikörper für VEGF-A dienen. Durch Behandlung mit diesem Antikörper konnte in einer Phase-II-Studie mit 116 Patienten mit metastasiertem klarzelligem RCC die Zeit bis zur Tumorprogression signifikant verlängert werden (Yang, Haworth et al. 2003).

Für die Therapie von RCC-Patienten von der FDA zugelassen sind derzeit sieben gegen definierte Zielstrukturen gerichtete Agentien (Su et al. 2014). Der Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib blockiert die c-Raf-Kinase und die Proteintyrosinkinase des *Vascular-endothelial-growth-factor*-Rezeptors (VEGFR) sowie des *Platelet-derived-growth-factor*-Rezeptors (PDGFR). Nach ersten Erfolg versprechenden Studien zeigte eine Phase-II-Studie, in der Sorafenib als *First-line*-Medikament eingesetzt wurde, keine Überlegenheit im Vergleich zu einer Therapie mit IFN α (Escudier et al. 2009). Die Ansprechraten bewegen sich im Bereich von 5-10%. In Anbetracht der teilweise gravierenden Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe sowie kritischer hypertensiver Entgleisungen und des Hand-Fuß-Syndroms erhält Sorafenib derzeit nur eine Empfehlung als *Second-line*-Medikament beim Zytokintherapie- und Sunitinib-refraktären RCC.

Sunitinib und Pazopanib sind Vertreter der Tyrosinkinase-Inhibitoren, die die Rezeptor-Tyrosinkinasen des VEGFR und PDGFR blockieren und das Tumor-Wachstum hauptsächlich aufgrund seiner antiangiogenen Wirkung verhindern. Studien konnten eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens von sechs Monaten im Vergleich zu einer IFN α -Therapie zeigen (Motzer et al. 2007). 85 % der mit Sunitinib therapierten Patienten zeigten *Fatigue*, die aus einer Schilddrüsenunterfunktion resultierte. Neutropenie trat bei etwa 80 % der Patienten auf. Ansonsten ähnelt das Nebenwirkungsspektrum dem von mit Sorafenib therapierten Patienten. Aus diesem Grund war eine Dosisreduktion bei 40 % der Patienten nötig. Axitinib ist ein weiterer oral applizierbarer Tyrosinkinaseinhibitor. In Studien an Patienten mit Sorafenib-resistentem metastasiertem RCC konnte eine Ansprechrate von 21 % gezeigt werden (Rini et al. 2009). Diese Erkenntnisse prädestinieren Axitinib als *Second-line*-Medikament bei Zytokin- und Sorafenib-refraktären metastasierten RCC.

Eine weiterer Ansatzpunkt sind Medikamente die gegen *mammalian target of rapamycin* (mTOR) gerichtet sind. mTOR ist ein zentraler Faktor in der Weiterleitung von Signalen, die von Wachstumsfaktor-Rezeptoren in die Zelle geleitet werden. Vertreter dieser Gruppe sind Temsirolimus und Everolimus. Mit Temsirolimus behandelte Patienten hatten ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben als Patienten, die mit IFN α alleine behandelt wurden (Dutcher et al. 2009). Es zeigten sich keine synergistischen Effekte in der Kombination beider Präparate. Somit bietet sich dieses Medikament als *First-line*-Therapeutikum bei Patienten mit einem geringen Risiko für eine Metastasierung an. Für Everolimus liegen nur Daten von einer randomisiert kontrollierten Studie vor, in der das Medikament unterstützend beim Sorafenib- und Sunitinib-resistenten metastasierten RCC eingesetzt wurde (Motzer et al. 2008). Hier führte Everolimus zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens. Nebenwirkungen sind auch bei diesem Medikament teils gravierend. So zeigten 90 % der Patienten eine Anämie, 40 % eine Stomatitis sowie 37 % *Fatigue*. Derzeit werden von der *European Association of Urology* Sorafenib, Sunitinib und Temsirolimus als Zielstruktur-basierte Medikation beim metastasierten RCC empfohlen (Ljungberg et al. 2010, (Escudier et al. 2010, Tostain, Li et al. 2010, Escudier et al. 2012, Bergmann et al. 2014)).

Als neue Targets für die Therapie des RCC sind in letzter Zeit sogenannte „*Immune Checkpoint Inhibitors*“ mittels erster klinischer Studien untersucht worden. Hierbei handelt es sich letztendlich um einen zielgerichteten Ansatz, das Immunsystem dahin gehend zu aktivieren, dass inhibitorische Rezeptoren auf T-Zellen blockiert und somit Immunreaktionen stimuliert und Tumorzellen durch entsprechende T-Zellklone als fremd erkannt werden. *Programmed death 1* (PD-1) und *programmed death ligand 1* (PDL-1) blockierende Antikörper wurden in der jüngeren Vergangenheit in Phase-I/II-Studien zur Therapie des metastasierten RCC eingesetzt. Es existieren mittlerweile drei Agentien die den PD-1-Signalweg als Ziel haben (Nivolumab, MK-3475, CT-011) sowie drei die auf den PDL-1 oder PDL-2 Signalweg abzielen (BMS-935559, MPDL3280A, AMP-224).

Ein alternativer Angriffspunkt ist das *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) durch blockierende Antikörper wie z.B. Ipilimumab (Mellman, Coukos et al. 2011). CTLA-4 ist ebenfalls ein inhibitorischer Rezeptor, der T-Zell-Proliferation verhindert. Eine Inhibition des CTLA-4 reaktiviert also zytotoxische T-Zellen. Allerdings reguliert CTLA-4 auch die autoaktive T-Zell-Immunität. Die Stimulierung von Autoimmunität stellt eine erhebliche Nebenwirkung bei den bisherigen Tumorummuntherapeutika dar, die neben kaum beherrschbaren Nebenwirkungen auch für den Tod einiger Patienten verantwortlich ist (Bailey and McDermott 2013). Insbesondere traten autoimmunologische Krankheitsbilder auf. Diese Nebenwirkungen waren insbesondere bei den CTLA-4-Inhibitoren zu beobachten. Einige der PD-1/PDL-1-Inhibitoren teilen dieses Nebenwirkungsprofil. Dieses neue Forschungsgebiet stellt jedoch nach der Meinung von Bailey und Kollegen erst den Anfang der immunmodulatorischen Forschung dar (Bailey and McDermott 2013).

Ein weiterer potentieller Vorteil ist auch, dass sich einige dieser Agentien für Kombinationstherapien mit zum Beispiel antiangiogenetischen Therapeutika anbieten. Seit Februar diesen Jahres werden vermehrt Studien mit verschiedenen Kombinationstherapien durchgeführt (Sheridan 2014).

1.5.2.2 Tumor-Vakzine und adoptiver T-Zelltransfer

Tumorstoffe und adoptiver T-Zelltransfer spielen in den aktuellen Empfehlungen zur Patientenbehandlung bei Nierenkarzinomen noch keine Rolle.

1.5.3 Tumorprofiling

Da es sich bei Nierenzellkarzinomen um eine extrem heterogene Gruppe von Tumoren mit unterschiedlichem Therapieansprechen handelt, könnte eine genauere Unterscheidung der jeweiligen Tumorentität durch Tumorprofiling hilfreich sein. Unter Tumorprofiling versteht man die genauere Unterscheidung von Tumoren auf Basis des Genexpressionsmusters. Für den jeweiligen Tumor kann so ein spezifisches Expressionsprofil erarbeitet werden. Anhand dieses Profils könnte dann genauer entschieden werden, ob ein Patient von einer Therapie profitiert, da ein potentielles Zielprotein erhöht exprimiert wird und damit hemmbar ist oder ob es sich um einen *non-responder* handeln wird, dem die jeweilige Therapie keinen Vorteil, sondern nur unerwünschte Nebenwirkungen bringt. Ziel wäre, auf diesem Weg über eine genauere Selektion des Patientenguts die Ansprechraten zu erhöhen und gleichzeitig den anderen nicht sensitiven Patienten Nebenwirkungen bei höherer Lebensqualität zu ersparen.

1.6 Aufgabenstellung

In Anbetracht der bislang immer noch mehr als unbefriedigenden Ansprechraten sowie der massiven Nebenwirkungen der momentan auf dem Markt verfügbaren Therapeutika sind weitere Anstrengungen von Nöten, um molekulare Zielstrukturen zu identifizieren, die ein gutes Ansprechverhalten bei geringer Nebenwirkung bieten.

Zur Identifikation solcher neuer *targets* sollten mit Hilfe von uns zur Verfügung stehenden Oligonukleotid-Microarray-Datensätzen Gene identifiziert werden, die in 15 primären RCC-Proben überexprimiert und in einem umfangreichen Kollektiv von Normalgewebeproben nicht oder nur in geringem Maß exprimiert sind.

Die Anzahl potentieller Kandidatengene sollte durch Literaturrecherche aufgrund ihrer Expression in Normalgeweben, Expressionsort und Funktion weiter eingegrenzt werden.

Die Expression der so identifizierten Kandidatengene sollte in einem unabhängigen Tumor- und tumortragenden Normalnierenkollektiv durch quantitative Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) validiert werden. Eine direkte Korrelation der Expressionshöhe der Kandidatengene mit dem Überleben der Patienten sollte Hinweise auf eine mögliche aktive Rolle der Zielantigene bei der Tumor-Entstehung, Progression und Metastasierung geben. Beteiligung am Tumorgeschehen sollte einem Verlust der Zielantigene unter Therapie und somit Resistenz entgegenwirken.

2 Material

2.1 Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent
Elektrophoresekammer, horizontal	Invitrogen
Geldokumentationssystem Fluor-S Multilayer	Bio Rad
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf
Light Cycler 3.39	Roche
Mehrkanalpipetten (5-50 µl, 25-200 µl)	Dunn Labortechnik
Mikropipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf
Mikrowelle Mikromat	AEG
Pipettierassistent Pipetboy acu	Hirschmann
RNA LabChip [®]	Agilent
Sterilwerkbank BSK Luft- und Klimatechnik	
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim
Ultra Turrax	IKA Labortechnik
Vortexer VF 2	IKA Labortechnik
Waagen	
Präzisionswaage BP2100	Sartorius
Analysewaage MCI	Sartorius
Zentrifugen	
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R	Eppendorf
Kühlzentrifuge 541 R	Heraeus

2.2 Einmalartikel

Handschuhe Sempermed Nitril	Semperit
Einfrierröhrchen (2 ml)	Nunc
Pipetten (5, 10 und 25 ml)	Falcon
Pipettenspitzen (200 und 1000 µl)	Greiner
Pipettenspitzen, gestopft (2, 5, 10, 20, 100, 200 und 1000 µl)	Biozym
Reaktionsgefäße (0,2 ml) Softstrips	Biozym
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf

2.3 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

100 bp DNA Marker	Fermentas
Agarose	Invitrogen
β-Mercaptoethanol	Sigma
Blue-Juice-Gelladepuffer	Invitrogen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Ethidiumbromid	Bio-Rad
Ethanol, p.a.	Merck
Isopropanol	Sigma
TAE (100 mM Tris-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,5)-Puffer	Invitrogen
Taq-DNA-Polymerase	

2.4 Kits

Light Cycler [®] Fast Start DNA Master ^{Plus} Sybr Green	Roche Penzberg
Reverse Transcription System	Promega Chatsworth, USA
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
Light Cycler Primer Set β-Actin	SearchLC Heidelberg

2.5 Oligonukleotide

Die β -Actin-Primer entstammen dem in 2.4 beschriebenen Kit. Alle anderen Primer wurden so ausgewählt, dass zwischen zwei Exonen ein möglichst großes Intron liegt. Die Produktgröße sollte zwischen 150 und 300 Basenpaaren liegen und sich bei jedem Kandidatengen um ca. 20 Basenpaare in ihrer Größe unterscheiden um eine eindeutige Zuordnung der Produkte zum jeweiligen Kandidatengen zu ermöglichen. Durch dieses Vorgehen sollte eine Kontamination sowie eine Fehlinterpretation vermieden werden. Realisiert werden konnte dies durch das internetbasierte Programm Primer3 zur *Primer*-Generierung, welches die Möglichkeit bietet, nach oben beschriebenen Kriterien *Primer* zu entwerfen. Die vom Programm vorgeschlagenen Primersequenzen wurden anschließend internetbasiert mit Gendatenbanken mit Hilfe des Programms BLASTN verglichen, um andere eventuell mit diesen *Primern* ebenfalls amplifizierte Genloci auszuschließen. Die so ermittelten *Primer* wurden von der Gruppe Dr. Arnold, Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität synthetisiert. Nach einer Amplifikation der Transkripte mittels PCR erfolgte die Validierung der *Primer* durch Analyse der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese, um Nebenprodukte wie Primerdimere ausschließen zu können. In Tabelle 4: Oligonukleotide für die Quantifizierung der Kandidatengen-mRNAs sind die Sequenzausschnitte der jeweiligen Gene sowie Produktgröße und Exonlokalisierung zusammengestellt.

Tabelle 4: Oligonukleotide für die Quantifizierung der Kandidatengen-mRNAs

Gen	Oligonukleotid	Sequenz	Produktgröße	Primerlokalisierung
<i>ACTB</i> <i>β-Actin</i>	Strang	aus Primer Kit	ca. 800 bp	
	Gegenstrang	aus Primer Kit		
CA9	Strang	5'-CACTCCTGCCCTACTTC	228 bp	Exon 7
	Gegenstrang	5'-GGAAGGAGGCCTCAATCACT		Exon 8
<i>FGF11</i>	Strang	5'-CTAGTGAGCGGGCTCCTCTG	303 bp	Exon 1
	Gegenstrang	5'-AGTTTGGTGACGATGCCTTT		Exon 2
<i>PTHLH</i>	Strang	5'-GGAGACTGGTTCAGCAG	205 bp	Exon 3
	Gegenstrang	5'-TCAGCTGTGTGGATTTCT		Exon 4
<i>SLC6A3</i>	Strang	5'-GAGACCTGGGGCAAGAAGAT	267 bp	Exon 2
	Gegenstrang	5'-TGAGATGAGGATGACCGTGA		Exon 4
<i>SLC6A3</i>	Strang	5'-GAGACCTGGGGCAAGAAGAT	177 bp	Exon 2
	Gegenstrang	5'-GGCCAGCTCCATGTAGAAAA		Exon 3

3 Methoden

3.1 Aufarbeitung des Gewebematerials von Patienten

Nach der Überführung aus flüssigem Stickstoff wurden die Gewebeproben rasch gewogen, mittels Mörser und Pistill unter flüssigem Stickstoff durch Pulverisierung aufgeschlossen und anschließend in 2-ml-Reaktionsgefäße gefüllt. Es wurden Gewebestücke mit einem mittleren Gewicht von 30 mg verwendet. Sofort nach der Zerkleinerung der Gewebestücke und Verdampfen des flüssigen Stickstoffs erfolgte die Weiterverarbeitung (siehe 3.2). Initial suspektive Gewebearmale (z. B. Nekrosen, Fett) wurden von Anfang an von der weiteren Verwendung ausgeschlossen. Als Normalnierengewebe wurde hierbei Gewebe einer tumortragenden Niere verwendet, das mit einem Sicherheitsabstand nach Einschätzung des Chirurgen reseziert wurde.

3.2 Bestimmung des Gewebetyps und *Staging*

Teile der Gewebeproben wurden nach Standardprozessierung (Formaldehydfixierung, Paraffineinbettung) unter dem Lichtmikroskop nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung untersucht, um den Gewebetyp zu bestimmen. Die Diagnosen wurden von einem Pathologen zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs gestellt. Die histologische Typisierung erfolgte in Anlehnung an die WHO-Klassifikation. Verwendet wurden nur Normalnierengewebeproben sowie Tumorgewebeproben von klarzelligen Nierenzellkarzinomen (*clear cell renal cell carcinoma*; ccRCC).

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolierung aus humanen Nierengeweben

Die Isolierung der RNA aus den zuvor aufgearbeiteten Gewebeproben (siehe 3.1) wurde nach einer modifizierten *Single-step*-Methode mittels des RNeasy[®] Mini Kits (siehe 2.4) durchgeführt. Der Aufschluss der Zell- und Organellmembranen und die Homogenisierung des Lysats wurden mittels Ultraturrax und RLT-Puffer (ein Guanidiniumisothiocyanat (GTC)-haltiger Puffer) durchgeführt. Der Aufschluss wurde mit dem Ziel durchgeführt, möglichst viel RNA freizusetzen und RNasen effektiv durch die chaotrope Wirkung des GTC zu denaturieren und damit zu inhibieren. Dies ermöglicht die Isolierung intakter RNA. Die Homogenisierung mittels Ultraturrax führt zu einer Viskositätsverminderung, da hochmolekulare genomische DNA und andere hochmolekulare Substanzen geschert werden. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit einem ethanolhaltigen Puffer versetzt. Dieser gewährleistet eine selektive Bindung von RNA auf der Silikagelmembran der RNeasy[®]-Säule und entfernt somit Proteine und DNA-Fragmente. An der Membran haftende Verunreinigungen und Puffersubstanzen wurden durch mehrmalige Waschvorgänge entfernt, so dass lediglich aufgereinigte RNA auf der Membran gebunden blieb. Diese wurde in einem letzten Schritt mit 50 µl RNase-freiem Wasser von der Membran abgelöst und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Isoliert werden hierbei bevorzugt Moleküle mit einer Länge größer als 200 Nukleotiden. Es kommt hierdurch zu einer Abreicherung der kleinen RNA-Bruchstücke und tRNA. Die isolierte und gereinigte RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.3.2 Qualitätskontrolle der RNA

Die Qualität der RNA aus Patientengewebe wurde durch zwei verschiedene Methoden überprüft.

3.3.2.1 RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte über Messung der optischen Dichte. Hierbei werden 2 µl RNA-Lösung mit 98 µl deionisiertem Wasser 1:50 verdünnt und in eine Quarzküvette gegeben. Diese wird mit UV-Licht der Wellenlänge 260 und 280 nm durchstrahlt. Die Lichtabsorption wird gemessen und ist am Gerät ablesbar. Aus diesem Wert lässt sich über die Formel $c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$ die RNA-Konzentration der Probe berechnen. Zur Abschätzung der Reinheit der RNA-Probe wird das Verhältnis der OD_{260} und der OD_{280} verwendet. Dieses sollte optimal zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Dieses Vorgehen gibt Aufschluss über eine etwaige Proteinkontamination, da Proteine aufgrund ihres Absorptionsmaximums bei 280 nm den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ erniedrigen.

3.3.2.2 Kapillargelelektrophorese

Mit dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* erfolgte eine Überprüfung der RNA-Intaktheit und RNA-Konzentration. Zusätzlich benötigt man zum Gerät einen Miniaturchip (*RNA LabChip*[®]). In diesem Chip sind Glaskapillaren eingebettet, die untereinander verbunden sind. Die Kapillaren werden mit einer Gelmatrix befüllt, bevor 1 µl der RNA-Proben zusammen mit einem RNA-interagierenden Fluoreszenzfarbstoff in die Vertiefungen gegeben werden können. Durch Elektroden, die in flüssigkeitsgefüllte Vertiefungen eintauchen, ist eine elektrophoretische Auftrennung der Proben nach ihrer Größe möglich. An einem Messpunkt, an dem alle Proben vorbei geleitet werden, wird die Fluoreszenz der RNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexe gemessen. Um die Proben miteinander vergleichen zu können, wird 1 µl eines RNA-Standards (*RNA 6000 ladder standard*) mitgemessen. Dieser Standard beinhaltet sechs verschieden große RNA-Fragmente (0,2-6 kb) mit einer Gesamtkonzentration von 150 ng/µl. Durch einen Vergleich mit dem Standard kann softwareunterstützt die Größe der Fragmente und die RNA-Konzentration ermittelt werden. Das Programm ermöglicht auch die graphische Darstellung in Form eines Elektropherogramms, oder als Gel-Banden ähnliches Bild. Eine von der Software errechnete *RNA Integrity Number* (RIN) ermöglicht einen direkten Qualitätsvergleich verschiedener Proben. Die Kapillarelektrophorese wurde nach den vom Hersteller vorgegebenen Versuchsbedingungen durchgeführt.

3.3.3 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Für die Umschreibung der *messenger RNA* (mRNA) in komplementäre DNA (cDNA) wurde ein Reagenzienkit verwendet (*Reverse Transcription System*, Promega). Dieser Kit ermöglicht die Umschreibung der Gesamt-RNA mittels einer retroviralen reversen Transkriptase (*avian myeloblastosis virus* (AMV) RT) in cDNA durch eine so genannte Erststrangreaktion.

Start der Reaktion erfolgt durch komplementäre Bindung von *Random-hexamer*-Nukleotiden als *Primer* an der RNA. Die Verlängerung erfolgt durch die RT, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in 5' → 3'-Richtung. Diese unspezifischen *Primer* binden an verschiedenen Stellen der RNA. Das Vorgehen richtete sich nach dem herstellerseitig vorgeschlagenen Protokoll. Zur Denaturierung wurde 1 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 9,9 µl aufgefüllt und anschließend für zehn Minuten bei 70°C inkubiert. Der Reaktionsansatz ist in

Tabelle 5, die Inkubationsbedingungen in Tabelle 6 ersichtlich. Nach Beendigung der reversen Transkription wurde die cDNA bei - 20°C gelagert.

Tabelle 5: Reaktionsansatz reverse Transkription

Endkonzentration	Reaktionskomponenten	Stammlösung	Volumen
0,05 µg/µl	RNA-Probe (1 µg) in RNase-freiem Wasser		9,9 µl
25 ng/µl	<i>Random Hexamer Primers</i>	0,5 µg/µl	1,0 µl
1x	RT-Puffer	10x	2,0 µl
5 mM	MgCl ₂	25 mM	4,0 µl
1 mM	dNTP-Mischung	10 mM	2,0 µl
1 U/µl	RNase-Inhibitor	40 U/µl	0,5 µl
0,75 U/µl	AMV-Reverse-Transkriptase	25 U/µl	0,6 µl
	Volumen je Versuchsansatz		20 µl

Tabelle 6: Inkubationsbedingungen reverse Transkription

Versuchsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Primeranlagerung	25	10
Verlängerung	42	60
Denaturierung	95	5
Ende	4	unbegrenzt

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation eines spezifischen Sequenzabschnitts der cDNA. Dazu werden *Primer* benötigt, aus 20 - 30 Nukleotiden bestehende Oligonukleotide, die an die cDNA binden. Zwei *Primer* begrenzen diesen Abschnitt der cDNA. Jeder dieser *Primer* bindet auf einem Strang (Strang und Gegenstrang) der cDNA nach Trennung des Doppelstrangs in Einzelstränge durch Erhöhung der Temperatur. Mit Hilfe von hitzestabilen DNA-Polymerasen wird die gewählte DNA-Sequenz enzymatisch amplifiziert. Die verwendeten *Primer* sind in Tabelle 4: Oligonukleotide für die Quantifizierung der Kandidatengen-mRNAs ersichtlich.

Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit *Primern* für das Haushalts-Gen *GAPDH* etabliert. Unter Haushaltsgenen versteht man Gene, die für Proteine kodieren, die in jeder Zelle ungefähr gleich stark exprimiert werden. Dies ermöglicht zum einen eine Beurteilung der cDNA-Qualität, zum anderen erlaubt sie Aussagen über die Menge der eingesetzten RNA, da angenommen wird, dass der absolute Gehalt von Haushaltsgen-mRNA zwischen Zellen unterschiedlicher Gewebe nicht oder nur gering variabel ist.

Durch kurzzeitige Erhitzung auf 94°C werden die DNA-stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen gelöst und die DNA wird in ihre Einzelstränge zerlegt. Dies ist Voraussetzung für die Anlagerung der *Primer* an den zu ihrer eigenen Sequenz komplementären DNA-Abschnitt. Die Temperatur für diesen als *annealing* bezeichneten Schritt wird durch die Länge und Basenzusammensetzung der *Primer* determiniert. Es wurden Temperaturen im Bereich von 58-62°C verwendet. Die Verlängerung (*extension*) der angelagerten *Primer* geschieht durch eine hitzestabile *Taq*-Polymerase in 5'-3'-Richtung, so dass am Ende wieder doppelsträngige cDNA vorliegt. Als Bausteine für die neu synthetisierte DNA dienen die im Reaktionsansatz vorhandenen dNTPs. Nach diesem Schritt erfolgt wieder eine Denaturierung wie oben geschildert und der Zyklus beginnt von neuem. Nach Erreichen einer definierten Anzahl von Zyklen, bei dem sich jedes Mal die Menge des zu amplifizierenden Abschnitts verdoppelt, wird der Ansatz gekühlt und ist zur weiteren Verwendung bereit.

Die PCR wurde gemäß der Herstellerempfehlung durchgeführt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 7 ersichtlich. Die Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 8 und in Tabelle 9 zu sehen.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die PCR

Reaktionskomponenten	Volumen
cDNA-Probe (1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt)	5,0 µl
Strang-Primer (25 pmol/µl)	0,40 µl
Gegenstrang-Primer (25 pmol/µl)	0,40 µl
PCR-Puffer (10 x)	2,50 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,50 µl
dNTP-Mischung (25 mM)	0,20 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,13 µl
Volumen je Versuchsansatz	25 µl

Tabelle 8: Inkubationsbedingungen GAPDH-PCR

Versuchsschritte	Temperatur (°C)	Dauer (min:s)
Denaturierung	94	0:30
Amplifikation (30 Zyklen)		
Denaturierung	94	0:30
Annealing	60	0:45
Extension	72	2:30
Extension (1x am Ende)	72	10:00

Tabelle 9: Inkubationsbedingungen für die CA9-, β-Aktin-, FGF11-, PTHLH- und SLC6A3-PCR

Versuchsschritte	Temperatur (°C)	Dauer (min:s)
Denaturierung	94	0:30
Amplifikation (30 Zyklen)		
Denaturierung	94	0:30
Annealing	58	0:45
Extension	72	2:30
Extension (1x am Ende)	72	10:00

3.3.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Eine Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente wird durch ihr unterschiedliches Wanderungsverhalten im elektrischen Feld ermöglicht. Die negativen Ladungen der Phosphatgruppen bewirken eine Wanderung im elektrischen Feld in Richtung Anode. Das Auftragen der DNA-Fragmente erfolgt auf ein Agarosegel der Konzentration 2 %. Dieses ermöglicht eine optimale Auftrennung von Fragmenten mit 0,2-2 kb Größe. Große Fragmente durchlaufen das Gel langsamer als kleine DNA-Fragmente. Dies liegt an der Siebstruktur der Agarose, deren Poren kleinen Molekülen einen geringeren Widerstand entgegen bringen als großen.

Tabelle 10: Rezeptur Agarosegel

Endkonzentration	Chemikalien	Menge
2%	Agarose	2 g
1x	10x TAE-Puffer	10 ml
	deionisiertes Wasser	90 ml
0,2 µg/ml	Ethidiumbromid (10 mg/ml)	2 µl

Die zur Herstellung des Agarosegels benötigten Mengen der jeweiligen Chemikalien sind in Tabelle 10 ersichtlich. Im ersten Schritt wurde die Agarose mit dem Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer und dem Wasser vermischt. Dieser Ansatz wurde in der Mikrowelle erhitzt bis sich eine schlierenfreie Lösung ergab. Nach dem anschließenden Abkühlen auf 60°C wurde Ethidiumbromid zugegeben. Ethidiumbromid bewirkt eine sequenzunspezifische Anlagerung zwischen Basenpaaren. Durch UV-Beleuchtung können die DNA-Fragmente so bei einer Wellenlänge von λ 308 nm aufgrund der Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffes sichtbar gemacht werden. Die noch flüssige Gelmatrix wurde in eine horizontale Gelkammer der Länge 10 bzw. 16 cm gegossen. Die weitere Abkühlung bewirkte die Polymerisation des Gels.

Tabelle 11: Rezeptur Laufpuffer

Chemikalien	Menge
10x TAE-Puffer	100 ml
deionisiertes Wasser	900 ml
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	20 µl

Vor dem Auftragen der DNA-Fragmente wurde diesen Ladepuffer *Blue Juice* (siehe 2.3) zugefügt. Da DNA-Lösungen annähernd die gleiche Dichte besitzen wie der Elektrophoresepuffer, erleichtert die Zugabe von Ladepuffer aufgrund der höheren Dichte das Pipettieren der Proben in die Geltaschen. Es wurden 20 µl DNA-Lösung vermischt mit 5 µl Ladepuffer aufgetragen. Um die Größe der DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurde ein Größenmarker 100 bp DNA *Ladder* (siehe 2.3) verwendet. Von diesem wurden 7 µl in eine separate Geltasche pipettiert. Bei einer Spannung von 100 V wurde die Gelelektrophorese für etwa 90 min durchgeführt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte durch computergestützte digitale Ablichtung des Gels unter UV-Licht für etwa 16 s.

3.3.6 Quantitative RT-PCR

Zur Quantifizierung der Expression von Kandidatengenomen führten wir nach reverser Transkription der RNA in cDNA (siehe 3.3.3) eine quantitative Echtzeit (*real time*) PCR durch. Anders als bei den konventionellen Quantifizierungsansätzen wird hier nicht die absolute Menge an PCR-Produkt gemessen, sondern die Kinetik der PCR-Reaktion für die Quantifizierung ausgenutzt. In den frühen Zyklen findet eine exponentielle Vermehrung der PCR-Produkte statt, während dies im weiteren Verlauf durch Störeinflüsse limitiert wird und subexponentiell verläuft. Man nimmt deshalb einen genau definierten, bei allen Proben gleichen Wert, bei dem sich das Fluoreszenzsignal gerade eben deutlich vom Hintergrund abhebt (C_T -Wert), da zu diesem Zeitpunkt noch exponentielles Wachstum unterstellt werden kann. In gleicher Weise wird für alle übrigen cDNA-Proben verfahren. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der einzelnen C_T -Werte. Höhere C_T -Werte bedeutet eine geringere Kopienzahl zu Beginn des Experiments.

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die quantitative β -Aktin-RT-PCR

Reagenz	Menge
cDNA Probe (1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt)	2 μ l
Forward Primer (25 pmol/ μ l)	0,4 μ l
Reverse Primer (25 pmol/ μ l)	0,4 μ l
Master Mix	4 μ l
Wasser	13,2 μ l
Volumen je Versuchsansatz	20 μ l

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die quantitative RT-PCR

Reagenz	Menge
cDNA Probe (1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt)	4 μ l
Forward-Primer (25 pmol/ μ l)	0,4 μ l
Reverse Primer (25 pmol/ μ l)	0,4 μ l
Master Mix	4 μ l
Wasser	11,2 μ l
Volumen je Versuchsansatz	20 μ l

3.4 Statistische Methoden

3.4.1 Normierung der Daten

Der Vergleich der Expressionsstärke des jeweiligen Kandidatengens in Normalnieren- und RCC-Gewebeproben erfolgte durch qRT-PCR analog der in Abschnitt 3.2.6 beschriebenen Weise. Die hierbei ermittelten C_T -Werte bildeten die Basis für die weitere statistische Auswertung. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen und die graphische Darstellung zu vereinfachen, war eine Normierung der erhaltenen „Rohwerte“ nötig. Die C_T -Werte wurden in relative cDNA-Mengen umgerechnet. Die Multiplikationsfaktoren 10^4 bzw. 10^7 sind willkürlich gewählt.

Die Berechnungsformel für die relative Anzahl von β -Aktin-Kopien lautet:

$$\text{Relative cDNA-Menge}_{\beta\text{-Aktin}} = 2^{-C_T \beta\text{-Aktin}} \times 10^7$$

Die Berechnungsformel für den relativen Gehalt von Kandidatengen-mRNA lautet:

$$\text{Relative cDNA-Menge}_{\text{Kandidatengen}} = (2^{C_T \beta\text{-Aktin}} / 2^{C_T \text{Kandidatengen}}) \times 10^4$$

3.4.2 Vergleich aller Gewebeproben miteinander

In diese Auswertung wurden alle vorhandenen cDNA-Proben mit einbezogen. Die Auswertung sowie die graphische Darstellung erfolgte durch die Software Graphpad Prism 6. Verglichen wurde hier der relative cDNA-Gehalt des jeweiligen Kandidatengens aller Normalnierengewebe mit dem relativen cDNA-Gehalt aller RCC-Gewebe. Dies erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. Dieser Test erlaubt Aussagen über die Höhe des Unterschieds zwischen beiden Testgruppen und die statistische Signifikanz. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

3.4.3 Follow-up der Patienten

Durch Unterstützung des Tumorregisters München konnte bis auf einen Patienten von allen ein vollständiges *Follow-up* erhoben werden. Bei allen Patienten, die während des Beobachtungszeitraums starben, war das Tumorleiden Todesursache. Die Zusammensetzung des Patientenkollektivs sowie die Überlebensraten sind in den jeweiligen Kapiteln dargestellt. Die Auswertung sowie die graphische Darstellung erfolgte durch die Software Graphpad Prism 6

4 Ergebnisse

4.1 RNA-Qualitätskontrolle

Es wurde die RNA-Isolierung aus insgesamt 52 Gewebeproben durchgeführt, wobei sich insgesamt 24 Paare aus korrespondierenden Normalgewebe von tumortragenden Nieren und ccRCC-Gewebe bilden ließen. Viermal wurde die RNA lediglich aus einem ccRCC-Gewebestück isoliert, einmal aus Normalgewebe einer tumortragenden Niere.

Im Anschluss an die Isolierung der RNA wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Diese erfolgte in einem ersten Schritt mittels Absorptionsspektrometrie. Hierbei konnten Aussagen über den RNA-Gehalt und die Reinheit der RNA-Probe gewonnen werden.

Der RNA-Gehalt der untersuchten Proben reichte von 24 µg RNA/ml bis 1100 µg RNA/ml. Im Mittel betrug der RNA-Gehalt 267 µg RNA/ml. Das Verhältnis der gemessenen Absorptionen bei 260 und 280 nm ergab Werte von 1,58 bis 2,26. Im Mittel wurde ein Wert von 1,753 erreicht, was für einen sehr hohen Reinheitsgehalt der RNA-Proben d.h. für eine geringe Proteinkontamination spricht. Ein RNA-Gehalt unter 60 µg/ml hatte einen Ausschluss der Proben zur Folge, da die RT nicht im Standardansatz durchgeführt werden konnte.

Die Kapillarelektrophorese - wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben - wurde zur Überprüfung der RNA-Intaktheit und RNA-Konzentration durchgeführt. In Abbildung 2 ist das Resultat der Analyse von drei RNA-Proben dargestellt. Proben mit einer RIN < 7,0 wurden von der weiteren Verwendung ausgeschlossen.

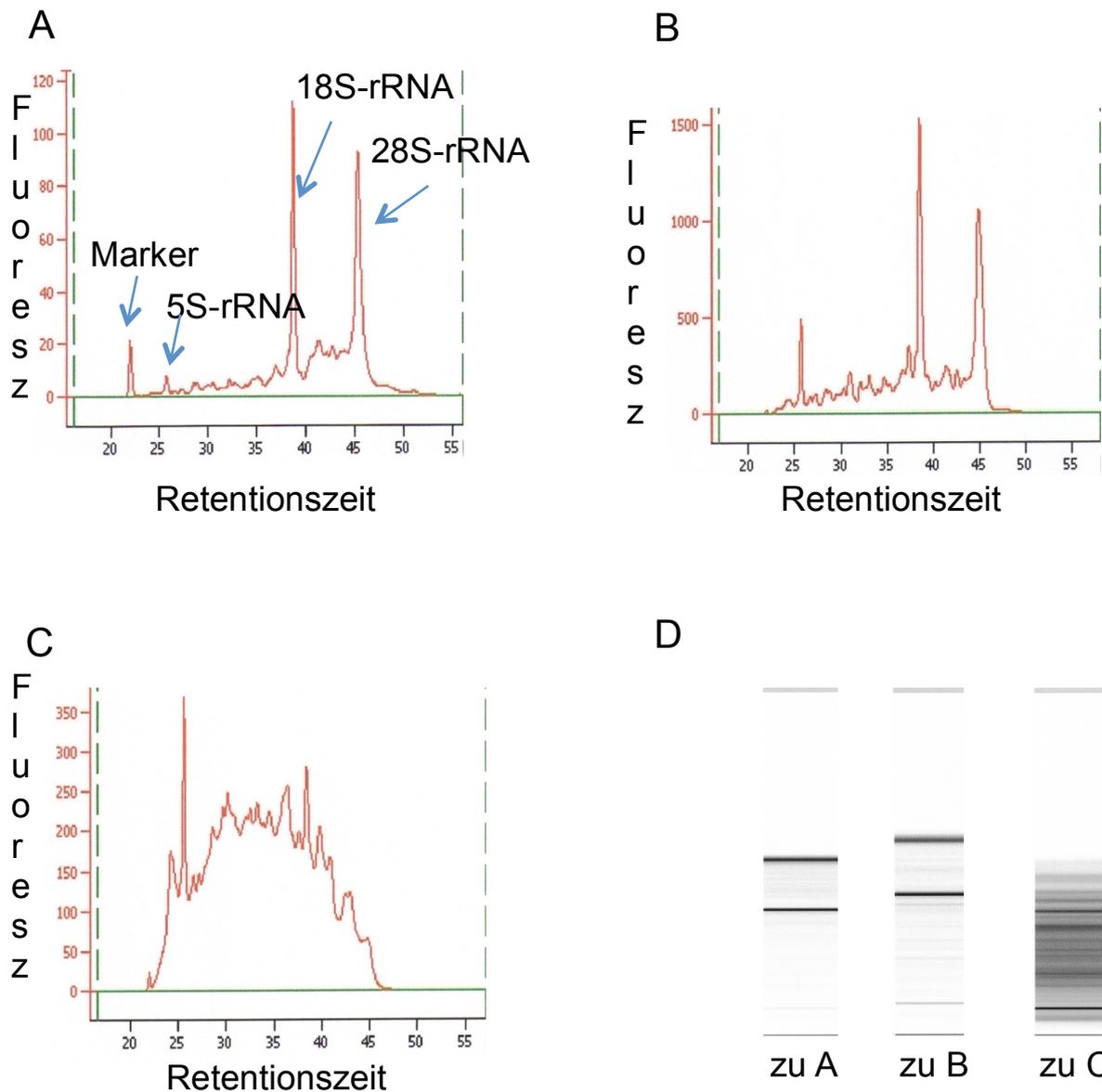


Abbildung 2: Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA. Aus dem Patientengewebe wurde mit Hilfe des RNeasy-Mini-Reagenziensystems die RNA isoliert. Die Qualitätskontrolle erfolgte durch Kapillarelektrophorese mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer und dem RNA LapChip Kit. Aus den Elektropherogrammen wurde mit Hilfe der Software die RNA Integrity Number (RIN) errechnet. Für die Versuche dieser Arbeit wurde nur RNA mit einer RIN größer 7 verwendet. (A) Elektropherogramm einer intakten RNA (RIN 8,1). (B) Elektropherogramm einer partiell degradierten RNA (RIN 6,9). (C) Elektropherogramm einer stark degradierten RNA (RIN 2,1). (D) Geldarstellung der Fluoreszenzaufnahme der unter (A) bis (C) gezeigten Proben.

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der RNA-Isolierung wurde aus sechs bereits verwendeten RCC-Gewebeproben wiederholt die RNA isoliert. Hierbei zeigten sich in fünf von sechs Fällen vergleichbare RNA-Konzentrationen. In einem von sechs Fällen zeigte sich ein deutlich niedrigerer RNA-Gehalt, bei dem jedoch aufgrund der morphologischen Beschaffenheit der Gewebeprobe vermutet wurde, dass dieses Gewebe einem Tumornekroseareal entstammt. Aus demselben Grund wurde von zwei weiteren Tumorgewebeproben erneut die RNA extrahiert und es zeigte sich im Gegensatz zum ersten Durchlauf ein RNA-Gehalt im verwertbaren Rahmen.

Insgesamt wurde die isolierte RNA von sechs Tumorgewebeproben und einer Normalnieregewebeprobe wegen zu geringem RNA-Gehalt bzw. einer RIN < 7,0 ausgeschlossen. Für die reverse Transkription und Untersuchung der Expression ausgewählter Kandidatengene standen nach den durchgeführten Qualitätskontrollen insgesamt 18 Normalnieren-RNAs sowie 18 RCC-RNAs zur Verfügung.

Zur Bestimmung der Variabilität zwischen einzelnen Läufen (Interassayvariabilität) wurden in jedem Analyselauf zwei cDNA-Proben bestehend aus einem cDNA-Gemisch von neun Normal- bzw. 30 primären RCC-Geweben mitgeführt. Des Weiteren wurden drei cDNA-Paare von RNAs erstellt, die von derselben Tumorprobe unabhängig isoliert worden waren und im selben Lauf insgesamt auf Expression von vier Genen analysiert wurden. In beiden Fällen ergab sich eine für die quantitative PCR sehr hohe Reproduzierbarkeit (relative Abweichung: $25 \pm 18 \%$ bzw. $23 \pm 19 \%$).

4.2 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Beschrieben wird hier die Zusammensetzung des Kollektivs an Patienten, deren Gewebeproben in die weiteren Analysen mit einbezogen werden konnten.

4.2.1 Geschlecht und Alter

Die Evaluation von Alter und Geschlecht wurde vorgenommen, um eine Verzerrung ausschließen zu können, die aus einer unterschiedlichen Geschlechts- bzw. Altersverteilung herrühren könnte. Dies würde sich insbesondere bei den Analysen zur Prognose von Patienten mit hoher bzw. niedriger Expression des jeweiligen Kandidatengens bemerkbar machen und möglicherweise zu ungerechtfertigten Schlussfolgerungen führen. Die 29 Normalnieren-Gewebeproben stammen von 17 Männern und 12 Frauen. Das Alter dieses Patientenkollektivs beträgt im Mittel 59,6 Jahre bei einer Standardabweichung von 7,9 Jahren.

4.2.2 Klassifizierung der RCC-Gewebe

Bei allen Tumorgewebeproben handelt es sich um klarzellige Nierenzellkarzinome (ccRCC). Die Einordnung erfolgte nach der gängigen TNM-Klassifikation, wobei T für Tumorgröße, N für Lymphknotenbefall und M für Fernmetastasen steht. Zum Operationszeitpunkt befanden sich 18 Patienten im Stadium T1, fünf Patienten im Stadium T3a und sechs Patienten im Stadium T3b. Bei drei Patienten im Stadium T1 und bei zwei Patienten im Stadium T3a waren regionale Lymphknoten befallen. Metastasen fanden sich bei drei Patienten im Stadium T1 und bei vier Patienten im Stadium T3a. Als Erweiterung zum TNM-Stadium wurde zusätzlich das *grading* mit betrachtet, das Aufschluss über den Differenzierungsgrad der untersuchten Tumorgewebeproben gibt. Hierbei befanden sich vier Tumoren im Stadium G1, ein Tumor im Stadium G1-2, 12 Tumoren im Stadium G2, fünf

Tumoren im Stadium G2-3 und sechs Tumoren im Stadium G3. Von den verwendeten 29 RCC-Geweben ließ sich lediglich eines wegen fehlender Daten nicht einordnen.

4.3 Reverse Transkription

Die Qualitätskontrolle erfolgte in einem weiteren Arbeitsschritt mittels der in Abschnitt 3.3.6 beschriebenen quantitativen *Real-time*-PCR. Hier wurde in analoger Weise die β -Aktin-cDNA bei allen zur Verfügung stehenden RCC- bzw. Normalnieren-cDNA-Proben amplifiziert. Dieses Vorgehen wurde bei 2 RCC-RNAs wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der reversen Transkription zu überprüfen. Des Weiteren wurde zur Reproduzierbarkeit der Amplifikation der β -Aktin-cDNA die quantitative *Real-time*-PCR bei 2 cDNA-Proben erneut durchgeführt.

Die erste Kontrolle der β -Aktin-cDNA-Amplifikation erbrachte bei der Initialprobe einen CT-Wert von 15,26, in der Kontrollprobe 15,68. Bei der zweiten Kontrolle zeigte sich bei der Initialprobe ein CT-Wert von 22,96, in der Kontrollprobe 24,09.

4.4 Auswahl von Kandidatengenprodukten als Zielantigene

4.4.1 Vorarbeiten

Die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Keith M. Skubitz, Hematology, Oncology, and Transplantation University of Minnesota Medical School, Minneapolis, USA durch bioinformatische Analysen einer umfangreichen Transkriptomdatenbank gewonnen. Zahl und Gewebetyp der analysierten Proben ist in Tabelle 14 zusammengefasst. Transkriptomanalysen wurden mittels *Affimetrix Gene Chip Oligonukleotid-Microarrays*, die annähernd 40.000 Gene (sogenannte *probe sets*) detektieren können, für insgesamt 16 RCC-Gewebeproben, 21 Normalnierenproben sowie für 518 Proben aus 16 verschiedenen Normalgeweben untersucht.

Tabelle 14: Verteilung mittels *Oligonukleotid-Microarrays* untersuchten Gewebeproben

Gewebetyp	Anzahl
Fett	22
Degenerativ erkrankte Knochen	25
Knochen	5
Cervix	25
Dickdarm	41
Leber	22
Lunge	36
Muskel	20
Myometrium	90
Eierstock	59
Haut	12
Dünndarm	28
Magen	7
Thymus	63
Tonsillen mit lymphoider Hypoplasie	59
Schilddrüsen mit nodulärer Hyperplasie	4

Zur ersten Eingrenzung potentieller Kandidatengene wurden verschiedene Abfragen der Datenbank auf unsere Anregung hin durchgeführt. So wurde die Abwesenheit in Muskelgewebe, eine Expression in 75 bis 100 Prozent der RCC-Gewebeproben (sogenannter *present call*) sowie eine geringe oder fehlende Expression in den übrigen Normalgeweben gefordert (*absent call*). Zielantigene mit einer Expression im Muskel wurden ausgeschlossen, da Muskelzellen nicht polarisiert vorliegen und somit vermutlich exprimierte Oberflächenproteine für therapeutisch eingesetzte Antikörper zugänglich wären, was zu unkalkulierbaren Nebenwirkungen führen könnte.

4.4.2 Internetrecherche

Um die unter 4.4.1 erhaltene Anzahl von etwa 100 potentiell interessanten Kandidatengen weiter eingrenzen zu können, wurde eine Internetrecherche für fünf der am interessantesten eingeschätzten Kandidatengene durchgeführt. Ziel der Recherche war, Informationen über bereits bekannte Details zu den einzelnen Kandidatengen wie z.B. Expressionsorte und Expressionsstärke zu erhalten. Aufgrund dieser Recherche wurde SPAG4 von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da eine hohe Expression in lebenswichtigen Organen wie Pankreas und Rückenmark beschrieben wurde. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten für jedes einzelne potentiell interessante Kandidatengen separat dargestellt.

4.4.3 Qualitätskontrolle der verwendeten Oligonukleotide

Eine Qualitätskontrolle der verwendeten Oligonukleotide wurde durch eine Analyse der Schmelzkurven durchgeführt. Zeigt sich wie in **Abbildung 3** in allen Proben eine identische Schmelztemperatur kann von einer guten Oligonukleotidwahl ausgegangen werden.

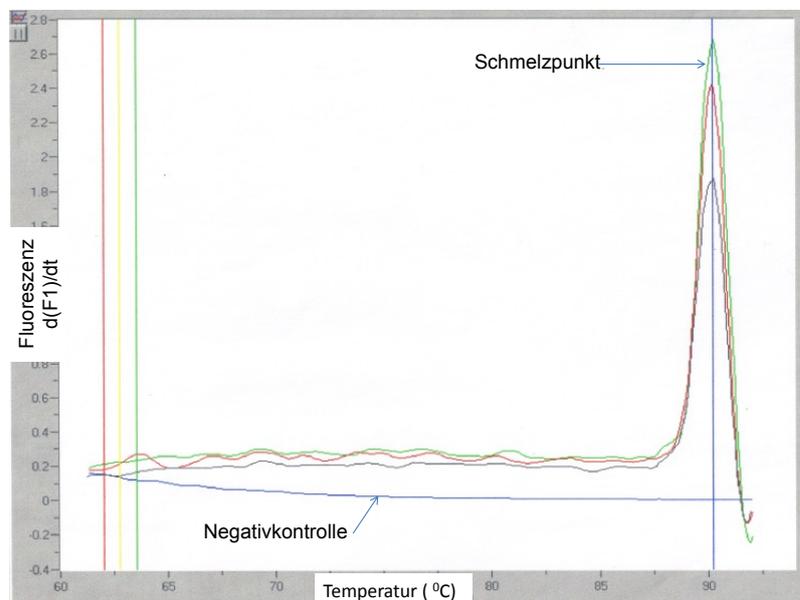


Abbildung 3: Qualitätskontrolle durch Bestimmung der Schmelztemperatur des cDNA-Amplifikationsprodukts. Die Temperatur wird nach dem Ende der PCR schrittweise erhöht. Nähert man sich der Temperatur, bei der die beiden DNA-Stränge trennen, kann der bei Bindung fluoreszierende Farbstoff Sybr Green nicht mehr in den Doppelstrang interskalieren. Dies wird durch einen raschen Abfall der Fluoreszenz sichtbar. Bei Darstellung der ersten Ableitung der Fluoreszenzwerte, zeigt der Peak die Schmelztemperatur an. Gezeigt sind beispielhaft die Schmelzkurven für das β -Aktin-Amplifikationsprodukt, das eine Schmelztemperatur von ca. 90°C aufweist. Die unterste Linie zeigt die Negativ-Kontrolle.

Zusätzlich wurde die Spezifität der verwendeten Oligonukleotide durch eine zweite Methode überprüft. Hierbei wurde eine quantitative RT-PCR zur Amplifikation eines cDNA-Fragments der verschiedenen Kandidatengene RCC-cDNAs durchgeführt. Im Anschluss daran wurde diese Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt. Durch zusätzliche Auftragung eines DNA-Markers konnte die Größe der amplifizierten Fragmente bestimmt werden.

4.5 Verwendung von externen Expressionsdaten

Nach der eigenständigen Etablierung der gesamten Methodik wurden diese selbst generierten Daten nicht weiter ausgewertet.

Die für die statistische Auswertung in Anspruch genommenen Daten wurden im Anschluss an die Etablierung der Methodik durch Mitarbeiter des Labors für Tumorummunologie generiert und mir freundlicher Weise für die Erstellung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. In diesen Datensätzen waren die von mir isolierten RNAs bereits enthalten. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden meine RNAs mit weiteren RNAs in einem Versuchsansatz gemessen. Sämtliche Qualitätskontrollen wurden analog der von mir oben beschriebenen Methodik ausgeführt, so dass für die statistischen Auswertungen jetzt insgesamt 29 Normalnieren-cDNAs sowie 29 RCC-cDNAs hervorragender Qualität zur Verfügung.

4.6 Expression der Kandidatengene in Normalnieren- und RCC-Gewebeproben

Es wurde der Mittelwert des relativen cDNA-Gehalts des jeweiligen Kandidaten-Gens im Normalnierengewebe mit dem des RCC-Gewebes verglichen (Tabelle 15). Ebenso aufgeführt sind die Standardabweichungen sowie die Genexpressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe (f).

Die Signifikanz der Unterschiede der Expressionsstärke der Kandidatengene zwischen Normal- und Tumorgewebe wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests bestimmt. Mit Ausnahme von SLC6A3 bestand bei allen Kandidatengentranskripten ein mit $p < 0,01$ signifikanter Unterschied des relativen cDNA-Gehalts zwischen den Normalnierengeweben und den ccRCC-Gewebeproben. In Abbildung 4 ist der relative cDNA-Gehalt der Kandidatengene für jeweils Normalniere und Nierentumor separat dargestellt. Ebenso grafisch dargestellt ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung.

Tabelle 15: Relativer cDNA-Gehalt der Kandidatengene in Normalnieren- und ccRCC-Gewebeproben.

Gen	Relativer cDNA-Gehalt Normalniere (Mittelwert; n 29)	Standardabweichung	Relativer cDNA-Gehalt ccRCC (Mittelwert; n 29)	Standardabweichung
CA9	26,38 (f 1)	52,76	598,9 (f 22,7)	872,2
SLC6A3	3,439 (f 1)	7,899	62,05 (f 18,0)	116,4
PTHLH	7,426 (f 1)	7,097	237,8 (f 32,0)	310,2
FGF11	6,105 (f 1)	6,900	27,89 (f 4,6)	25,28

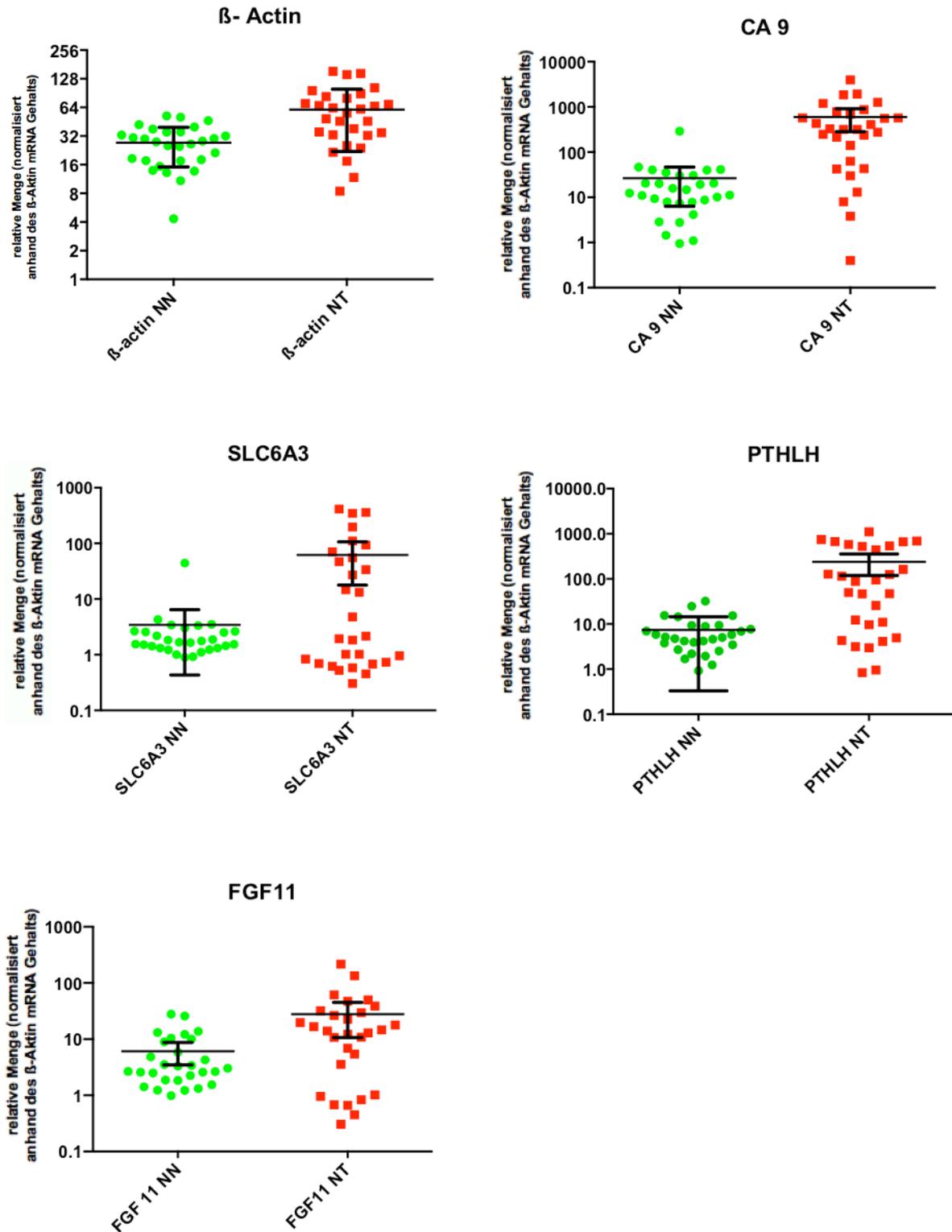


Abbildung 4: mRNA-Gehalt von Kandidatengen in tumortragenden Normalnierengeweben und primären RCC. Es erfolgte die logarithmische Darstellung des relativen mRNA-Gehaltes für β -Aktin als *Housekeeping*-Gen, CA9 als etablierter Goldstandard, SLC6A3, PTHLH sowie FGF11. Der Mittelwert des jeweiligen mRNA-Gehaltes wurde in Form eines horizontalen Balkens für jedes Gen separat dargestellt. Die beiden zusätzlichen horizontalen Balken stellen die Standardabweichung dar. NN, tumortragendes Normalnierengewebe; NT, Nierentumorgewebe.

4.7 Überlebensdauer der Tumorpatienten

4.7.1 Allgemeines

In die Auswertungen einbezogen wurden die quantitativen Expressionsdaten der Kandidatengene der 29 zur Verfügung stehenden RCC-Gewebeprobe. Diese wurden je nach Höhe ihres relativen cDNA-Gehalts des jeweiligen Kandidatengens in eine Gruppe mit hoher Expression des jeweiligen Kandidatengens und eine Gruppe mit niedriger Expression des jeweiligen Kandidatengens unterteilt. Um eine einheitliche Zuteilung zu gewährleisten, wurde der Median aus dem normierten cDNA-Gehalt des jeweiligen Kandidatengens gebildet. Alle Proben mit größerer relativer cDNA-Menge wurden zur Gruppe mit der hohen Expression gezählt, die darunter lagen zur Gruppe mit der niedrigen Expression. Die graphische Darstellung erfolgte für jede gebildete Gruppe separat in Form einer Kaplan-Meier-Kurve. Diese zeigt graphisch die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientenkollektiven in Abhängigkeit von der Zeit nach der Operation des Tumors.

4.7.2 β -Aktin

Es erfolgte die Zuteilung der Gewebeprobe in eine Gruppe mit hoher bzw. niedriger Expression des β -Aktin-Gens. *Cut-Off*-Wert hierfür war ein relativer cDNA-Gehalt von 55. Sämtliche Gewebeprobe mit einem relativen cDNA-Gehalt über 55 wurden der Gruppe mit der hohen Expression zugeordnet, die mit einem korrigierten C_T -Wert unter 55 wurden der Gruppe mit der niedrigen Expression zugeordnet. Es ergaben sich 14 Gewebeprobe in der Gruppe der niedrigen Expression und 15 mit hoher Expression.

Die statistische Auswertung dieser Daten mittels Logrank-Test und Chi-Quadrat-Test ergab keinen signifikanten Unterschied im Überleben der beiden Patientengruppen (p 0,357). Die mittlere Überlebensdauer der Patienten mit niedriger β -Aktin-mRNA-Expression betrug 13 Monate, die mittlere Überlebensrate der Patienten mit hoher β -Aktin-mRNA-Expression betrug 54 Monate.

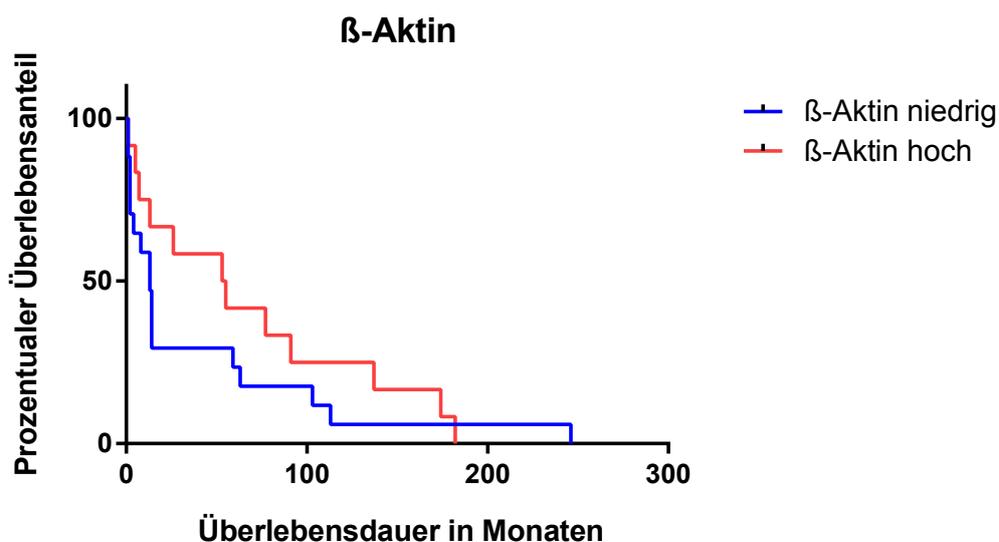


Abbildung 5: Überleben von Nierenzellkarzinompatienten in Abhängigkeit von der β -Aktin-Expressionsstärke im Tumor. Dargestellt sind hier die beiden Kaplan-Meier-Kurven für Patienten mit hoher bzw. niedriger Expression des Kandidatengens im Tumorgewebe. Auf der y-Achse ist der prozentuale Überlebensanteil dargestellt, auf der x-Achse die Lebensdauer der Patienten in Monaten.

4.7.3 CA9

Es erfolgte die Zuteilung der Gewebeproben in eine Gruppe mit hoher bzw. niedriger Expression des CA9-Gens. *Cut-Off*-Wert hierfür war ein relativer, für den β -Aktin-mRNA-Gehalt normalisierter cDNA-Gehalt von 317. Sämtliche Gewebeproben mit einem relativen cDNA-Gehalt über 317 wurden der Gruppe mit der hohen Expression zugeordnet, die mit einem korrigierten cDNA-Gehalt unter 316 wurden der Gruppe mit der niedrigen Expression zugeordnet. Es ergaben sich 14 Gewebeproben in der Gruppe der niedrigen Expression und 15 mit hoher Expression.

Die statistische Auswertung dieser Daten mittels Logrank-Test und Chi-Quadrat-Test ergab mit $p = 0,096$ keinen signifikanten Unterschied im Überleben der beiden Patientengruppen. Die mittlere Überlebensdauer der Patienten mit hoher CA9-Expression betrug 74 Monate, die mittlere Überlebensrate der Patienten mit niedriger CA9-Expression betrug 14 Monate.

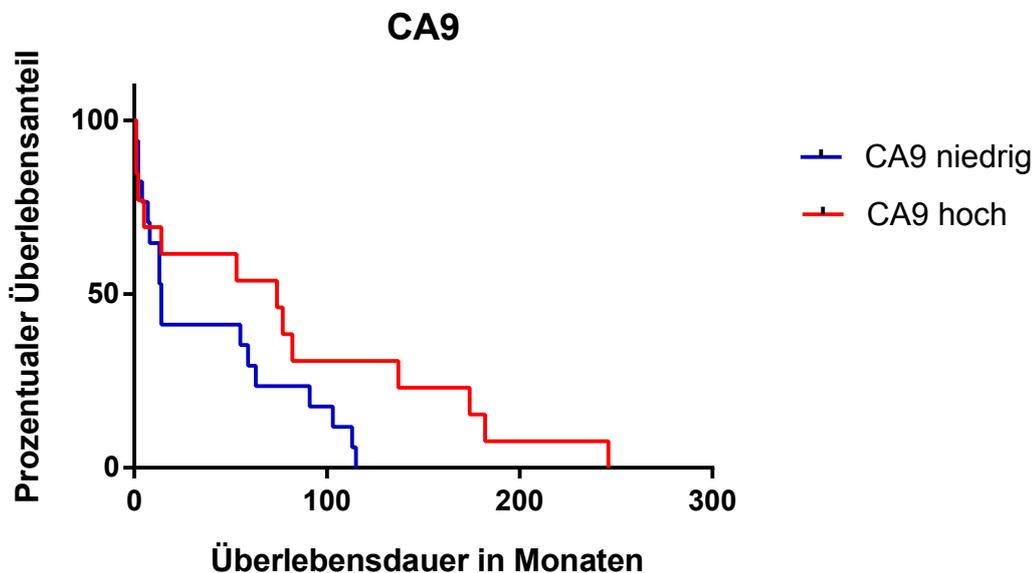


Abbildung 6: Überleben von Nierenzellkarzinompatienten in Abhängigkeit von der CA9-Expressionsstärke im Tumor. Dargestellt sind hier die beiden Kaplan-Meier-Kurven für Patienten mit hoher bzw. niedriger Expression des Kandidatengens im Tumorgewebe. Auf der y-Achse ist der prozentuale Überlebensanteil dargestellt, auf der x-Achse die Lebensdauer der Patienten in Monaten.

4.7.4 SLC6A3

Es erfolgte die Zuteilung der Gewebeproben in eine Gruppe mit hoher bzw. niedriger Expression des SLC6A3-Gens. *Cut-Off*-Wert hierfür war ein relativer cDNA-Gehalt von 2,1. Sämtliche Gewebeproben mit einem relativen cDNA-Gehalt über 2,1 wurden der Gruppe mit der hohen Expression zugeordnet, die mit einem relativen cDNA-Gehalt unter 2,1 wurden der Gruppe mit der niedrigen Expression zugeordnet. Es ergaben sich 2 deutlich getrennte Gruppen mit 14 Gewebeproben in der Gruppe der niedrigen Expression und 15 Gewebeproben in der Gruppe der hohen Expression.

Die statistische Auswertung dieser Daten mittels Logrank-Test und Chi-Quadrat-Test ergab mit $p = 0,060$ keinen signifikanten Unterschied im Überleben der beiden Patientengruppen, das vorgegebene Signifikanzniveau von 0,05 wurde allerdings nur knapp ver-

passt. Die mittlere Überlebensdauer der Patienten mit niedriger SLC6A3-Expression betrug 63 Monate, die mittlere Überlebensrate der Patienten mit hoher SLC6A3-Expression betrug 14 Monate. Abbildung 7 zeigt den Verlauf der beiden Gruppen in Abhängigkeit von der Zeit.

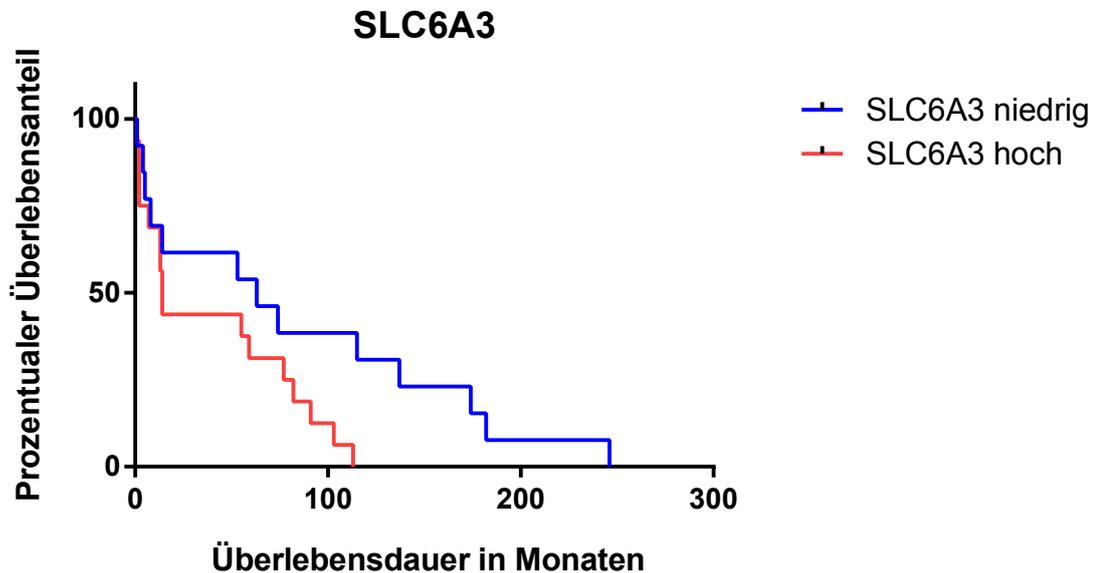


Abbildung 7: Überleben von Nierenzellkarzinompatienten in Abhängigkeit von der SLC6A3-Expressionsstärke im Tumor. Dargestellt sind hier die beiden Kaplan-Meier-Kurven für Patienten mit hoher bzw. niedriger Expression des Kandidatengens im Tumorgewebe. Auf der y-Achse ist der prozentuale Überlebensanteil dargestellt, auf der x-Achse die Lebensdauer Patienten in Monaten.

4.7.5 PTHLH

Es erfolgte die Zuteilung der Gewebeproben in eine Gruppe mit hoher bzw. niedriger Expression des PTHLH-Gens. *Cut-Off*-Wert hierfür war ein relativer cDNA-Gehalt von 87. Sämtliche Gewebeproben mit einem relativen cDNA-Gehalt über 87 wurden der Gruppe mit der hohen Expression zugeordnet, die mit einem relativen cDNA-Gehalt unter 87 wurden der Gruppe mit der niedrigen Expression zugeordnet. Es ergab sich eine Gruppe von 15 Gewebeproben mit hoher Expression sowie 14 Gewebeproben in der Gruppe der niedrigen Expression.

Die statistische Auswertung dieser Daten mittels Logrank-Test und Chi-Quadrat-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,213$) im Überleben der beiden Patientengruppen. Die mittlere Überlebensdauer der Patienten mit niedriger PTHLH-Expression betrug 35 Monate, die mittlere Überlebensrate der Patienten mit hoher PTHLH-Expression betrug 14 Monate. Abbildung 8 zeigt den Verlauf der beiden Gruppen in Abhängigkeit von der Zeit.

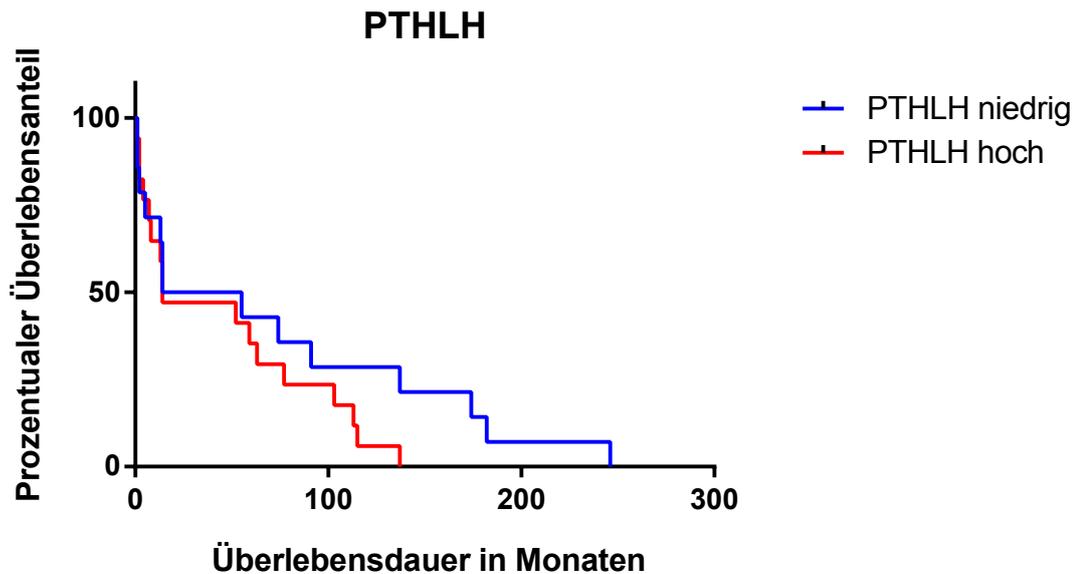


Abbildung 8: Überleben von Nierenzellkarzinompatienten in Abhängigkeit von der PTHLA-Expressionsstärke im Tumor. Dargestellt sind hier die beiden Kaplan-Meier-Kurven für Patienten mit hoher bzw. niedriger Expression des Kandidatengens im Tumorgewebe. Auf der y-Achse ist der prozentuale Überlebensanteil dargestellt, auf der x-Achse die Lebensdauer Patienten in Monaten.

4.7.6 FGF11

Es erfolgte die Zuteilung der Gewebeproben in eine Gruppe mit hoher bzw. niedriger Expression des FGF11-Gens. *Cut-Off*-Wert hierfür war ein relativer cDNA-Gehalt von 14. Sämtliche Gewebeproben mit einem relativen cDNA-Gehalt über 14 wurden der Gruppe mit der hohen Expression zugeordnet, die mit einem relativen cDNA-Gehalt unter 14 wurden der Gruppe mit der niedrigen Expression zugeordnet. Es ergab sich eine Gruppe von 15 Gewebeproben mit hoher Expression sowie 14 Gewebeproben in der Gruppe der niedrigen Expression.

Die statistische Auswertung dieser Daten mittels Logrank-Test und Chi-Quadrat-Test ergab mit $p = 0,332$ keinen signifikanten Unterschied im Überleben der beiden Patientengruppen. Die mittlere Überlebensdauer der Patienten mit niedriger FGF11-Expression betrug 26 Monate, die mittlere Überlebensrate der Patienten mit hoher FGF11-Expression betrug 14 Monate. Abbildung 9 zeigt den Verlauf der beiden Gruppen in Abhängigkeit von der Zeit.

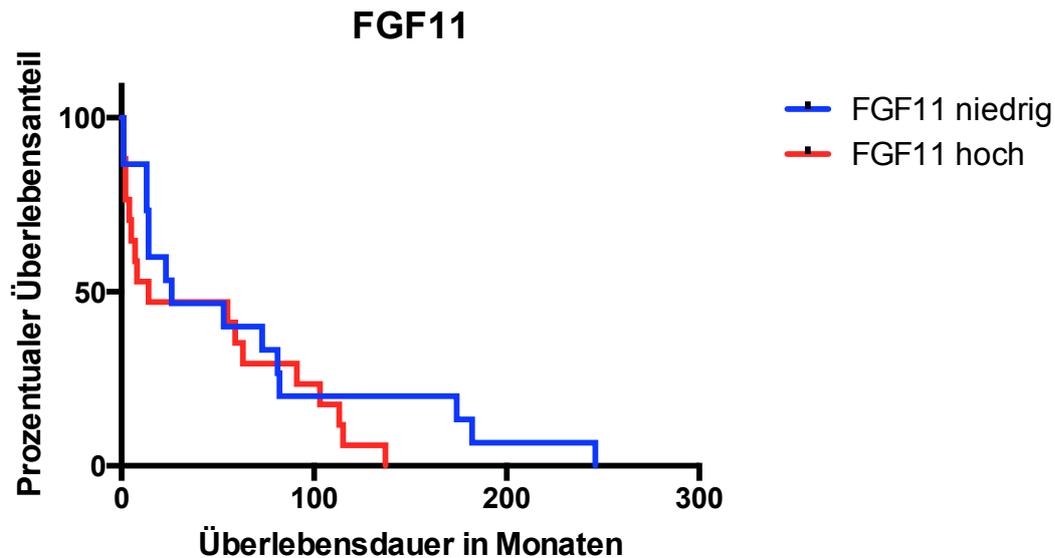


Abbildung 9: Überleben von Nierenzellkarzinompatienten in Abhängigkeit von der FGF11-Expressionsstärke im Tumor. Dargestellt sind hier die beiden Kaplan-Meier-Kurven für Patienten mit hoher bzw. niedriger Expression des Kandidatengens im Tumorgewebe. Auf der y-Achse ist der prozentuale Überlebensanteil dargestellt, auf der x-Achse die Lebensdauer Patienten in Monaten

5 Diskussion

5.1 Wert der Kandidatengene als Zielantigene und prognostische Marker

Ein gutes Zielantigen zeigt eine sehr hohe Expression in der jeweiligen Tumorentität und keine Expression im dazugehörigen Normalnierengewebe und anderen Geweben. Ein guter prognostischer bzw. prädiktiver Marker kann mehrere Aufgaben erfüllen. Zum einen sollte er unabhängig eine Schätzung der Überlebensdauer eines Patienten ermöglichen, ein zweites mögliches Aufgabenfeld wäre eine Vorhersage der Therapieeffektivität sowie der Ansprechrate, die hier allerdings, aus Mangel an Daten, nicht untersucht wurde. Hier würden viele Patienten profitieren, denen wirkungslose Therapien und somit eine aufgrund der Nebenwirkungen deutlich eingeschränkte Lebensqualität erspart werden könnten, andererseits könnte das für eine Therapie sensitive Kollektiv mit einer erhöhten Erfolgswahrscheinlichkeit behandelt werden.

5.1.1 CA9

Mit dieser Zielsetzung wurden Carboanhydrasen bereits von einigen Arbeitsgruppen untersucht. Insbesondere die Wertigkeit als prognostischer Marker wurde analysiert.

Carboanhydrasen gehören zu den Zink-Metalloenzymen, die in einer ganzen Reihe von verschiedenartigen Organismen (Vertebraten, Grünpflanzen, Algen) vorkommen. Bislang sind im menschlichen Genom 15 verschiedene Unterformen bekannt. Diese zeigen verschiedenste Enzymkinetiken sowie intrazelluläre Verteilung in unterschiedlichen Geweben. Ebenso vielfältig sind ihre Aufgaben, die sich von der pH-Regulation über Atmung und Gluconeogenese bis hin zur Liquorbildung, sowie renaler Säureregulation erstrecken (Supuran et al. 2003); (Supuran 2007); (Pastorekova et al. 1997).

Carboanhydrase 9 (CA9) ist ein membranständiges Glykoprotein, welches aus drei Anteilen besteht. Wie die übrigen Carboanhydrasen, katalysiert CA9 die reversible Hydratisierung von CO₂. CA9 spielt eine große Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation, Differenzierung und Wahrung der Integrität der Magenschleimhaut (Tureci et al. 1998). es weiteren wird CA9 eine Beteiligung bei der Regulation der Zellproliferation in hypoxischen Arealen sowie der Tumorentstehung und -progression zugeschrieben.

1997 wurde erstmals die hohe CA9-Expression in ccRCC beschrieben, in den anderen RCC-Entitäten wurde nur geringe Expression nachgewiesen (Liao et al. 1997). Es wurden daraufhin eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt. Unter anderem untersuchten Bui et al. durch *tissue microarrays* 321 Tumoren von ccRCC-Patienten nach Nephrektomie und kamen zu dem Schluss, dass niedrige CA9-Expression ein unabhängiger Marker für eine schlechte Prognose sei (Bui et al. 2003). Mit diesem Wissen wählten wir CA9 als etablierten Referenz-Marker für das ccRCC. Wie in den bereits publizierten Arbeiten zeigte sich auch in unserem Kollektiv eine höhere Expression von CA9 bei RCC im Vergleich zum Normalnierengewebe. Innerhalb des RCC-Kollektivs konnten zwei Gruppen mit unterschiedlich hoher CA9-Expression identifiziert werden die durch *follow-up* über das Krebsregister mit dem Langzeitüberleben korreliert wurden. Es zeigte sich ein Überlebensvorteil für Patienten mit höherer CA9-mRNA-Expression im Tumorgewebe, wohingegen eine erniedrigte Expression mit einer schlechteren Prognose korrelierte. Diese Ergebnisse decken sich mit den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen. Bui et al. kamen auf das selbe Ergebniss wie wir durch quantitative RT-PCR. Es konnten also die bekannten Ergebnisse bestätigt und gleichzeitig die Zuverlässigkeit unserer eigenen Experimente gezeigt werden. Bei uns zeigten 17 Patienten mit RCC eine hohe CA9-Expression mit einer mittleren Überlebensdauer von 74 Monaten, 12 Patienten hatten eine niedrige CA9-Expression mit einer mittleren Überlebensdauer von 14 Monaten. Interessanterweise konnte in einer Studie mit 66 Patienten anhand der Höhe der CA9-Expression eine Vorhersage über die Ansprechraten einer IL-2-Therapie gezeigt werden (Signoretti et al. 2008).

5.1.2 SLC6A3

SLC6A3 ist ein Dopamin-Transporter, der eigentlich für den Transport von Dopamin aus dem synaptischen Spalt in die Zellen des Nervensystems zuständig ist (Gelernter et al. 1995).

Bis dato wurde SLC6A3, bzw. dessen Fehlfunktion mit dem Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom in Verbindung gebracht, die pathogenetische Rolle beim RCC ist bislang nicht untersucht (Franke et al. 2008, Purper-Ouakil et al. 2008). In den uns zur Verfügung stehenden Primärdaten zeigte sich eine starke Überexpression im RCC im Vergleich zum Normalnierengewebe. Mit den momentan verfügbaren Expressionsergebnissen und der derzeit verfügbaren Literatur halten wir SLC6A3 nicht für ein lohnenswertes Zielantigen für eine Tumorthherapie. Eine relativ große Anzahl der Tumoren (rund 50 %) exprimiert SLC6A3-mRNA gleich oder weniger als Nierennormalgewebe. Man würde mit einem solchen Zielantigen eventuell nicht nur Tumorgewebe, sondern auch Normalnierengewebe schädigen bzw. würden die Tumoren rund der Hälfte der Patienten möglicherweise zu geringe Zielantigenmengen exprimieren und somit einer solchen Therapie nicht zugänglich sein.

Im folgenden wurde das RCC-Kollektiv analog dem Vorgehen bei CA9 in zwei Gruppen unterteilt. Die eine Gruppe hatte eine hohe Expression, die andere eine niedrige

Expression. Unterteilt wurden diese Gruppen anhand des Medians der Gesamtexpression. Die mit einer Expression höher als der Median wurden der einen Gruppe zugeordnet, die mit der niedrigeren Expression der anderen.

Die beiden Gruppen wurden mit dem Überleben der jeweiligen Patienten korreliert. So sollte ein Einfluss des Zielantigens auf das Überleben und eventuell direkt auf das Wachstumsverhalten des Tumors zu erkennen sein. In einer Gruppe mit niedriger SLC6A3 Expression lebten die Patienten 63 Monate, in der Gruppe mit hoher Expression 14 Monate. Dies entspricht einer dreifach längeren Überlebensdauer für niedrige Expression und ist damit deutlich stärker ausgeprägt als bei dem Goldstandard CA9. Es könnte sich also um einen sehr interessanten prognostischen Marker handeln. Die direkte Korrelation seiner Expressionshöhe der Kandidatengene mit dem Überleben der Patienten sollte Hinweise auf eine mögliche aktive Rolle der Zielantigene bei der Tumor-Entstehung, Progression und Metastasierung geben. Beteiligung am Tumorgeschehen sollte einem Verlust der Zielantigene unter Therapie und somit Resistenz entgegenwirken.

Diesen ersten sehr interessanten Trend als prognostischer Marker zu validieren und eventuell unsere Erkenntnisse bezüglich der Expression in Normalnieren und Tumorgewebe zu bestätigen, sollte Ziel von noch folgenden Untersuchungen sein.

5.1.3 PTHLH

PTHLH (*parathyroid hormone-like hormone*) ist ein Protein, das für die humorale Hypercalciämie bei malignen Erkrankungen verantwortlich gemacht wird (Philbrick et al. 1996). Funktionell ähnelt es dem Hormon der Nebenschilddrüse und imitiert dessen Wirkung, ohne dass erhöhte PTH-Spiegel nachzuweisen wären. Es erfolgt also eine Interaktion mit dem PTH-Rezeptor. Es wird in malignen Zellen gebildet und reguliert Zellwachstum, Differenzierung und Zelltod (Martin et al. 1997). Die PTHLH-Expression wird auf mRNA-Ebene unter anderem durch das Von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) reguliert. Eine Abhängigkeit der Expressionsstärke vom pVHL-Level konnte beim RCC jedoch nicht gezeigt werden. Dies ist erklärbar durch andere regulatorische Faktoren, die in anderen Organen einen Einfluss auf die PTHLH-Expression haben, wie z.B. EGF, TNF- α und TNF- β , VEGF und PDGF (Philbrick, Wysolmerski et al. 1996) (Cho et al. 2004); (Burton and Knight 1992); (Sellers et al. 2004); (Akino et al. 2000) (Esbrit et al. 2000) (Bakre et al. 2002). In Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Tumordinvasion bzw. der TumorgroÙe und erhöhter PTHLH-Expression bei Neoplasien von Lunge, Brust, Prostata und Niere nachgewiesen werden (Massfelder et al. 2004); (Luparello et al. 2001); (Dougherty et al. 1999) (Hastings et al. 2001). Eine Überexpression konnte in 95 % aller RCC-Gewebeproben gezeigt werden (Iwamura et al. 1999). Dies stimmt gut mit unseren Befunden überein, in denen in 76 % (22/29) der RCC-Primärtumoren eine höhere PTHLH-mRNA-Expression als im Normalnierengewebe (Mittelwert des mRNA-Gehalts) gefunden werden konnten.

Burton et al. entwickelten einen polyklonalen Antikörper für PTHLH. Bei Einsatz dieses Antikörpers konnten sie eine deutliche Wachstumshemmung in einer humanen RCC-Zelllinie zeigen (Burton et al. 1990). Dieses Erkenntnis führte Iwamura und Kollegen in einer bereits 1998 veröffentlichten Arbeit zu der Annahme, dass es sich bei PTHLH um einen autokrinen Wachstumsfaktor handeln könnte (Iwamura, Wu et al. 1999). Einen folgerichtigen Schritt unternahm Talon et al. die mit einem monoklonalen Antikörper die PTHLH-Funktion RCC-Zellen ausschalten konnten und sowohl in vitro als auch in vivo einen Antitumor-Effekt erkannten (Talon et al. 2006). Dieser Antitumor-Effekt kann möglicherweise ein weiteres Indiz für die Mitwirkung von PTHLH bei der Tumorprogression sein. In-

wieweit es jedoch bei einer systemischen Immuntherapie mittels PTHLH zu einer Remission oder lediglich zu einem stabilen Krankheitsverlauf temporär ohne Tumorprogression führen wird, wird Gegenstand weiterer Studien sein müssen.

Auch wir konnten in unserer Studie eine rund 30-fache Überexpression von PTHLH im RCC-Gewebe im Vergleich mit dem Normalnierengewebe nachweisen. Dass dieser Nachweis bereits an dieser kleinen Population in einer solchen Ausprägung auf Signifikanzniveau gelang spricht eindeutig für die massive Überexpression und unterstreicht die potentielle medizinische Bedeutung dieses Zielantigens. Bei genauerer Betrachtung der *PTHLH*-Expression in RCC-Gewebe zeigte sich eine Aufteilung in zwei Gruppen. In einer Gruppe (12 RCC-Gewebe) fanden sich PTHLH-mRNA-Mengen, die mit den in Normalgewebe gefunden vergleichbar waren. Der Fragestellung, inwieweit damit nicht nur wie in den oben angeführten Studien eine generelle erhöhte Expression eine Auswirkung auf das Überleben hat, sondern sich auch in den beiden Gruppen innerhalb der RCC-Gewebeproben eine unterschiedliche Lebenserwartung widerspiegelt, wollten wir durch eine Korrelation der beiden Gruppen mit der Überlebensdauer klären. Die jeweilige Korrelation dieser Expressionsdaten mit dem Überleben nach Diagnosestellung bzw. Primär-OP ergaben zwar keinen signifikanten, wohl aber einen deutlichen Unterschied im Überleben. So lebten Patienten mit niedriger Expression (cut-off 100) im Schnitt deutlich länger (35 Monate) als mit hoher Expression (14 Monate). Aufgrund dieser weiteren von anderen Gruppen publizierten Ergebnissen halten wir PTHLH für einen interessanten prognostischen Marker. Inwieweit es sich um einen von anderen Parametern wie dem TNMG Stadium unabhängigen Marker handelt sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Zimmermann et al. konnten in einem bislang nicht publizierten von der Deutschen Krebshilfe geförderten Projekt, in welches auch Ergebnisse dieser Untersuchung eingeflossen sind, keinen Beweis für die Unabhängigkeit dieses prognostischen Markers finden. Um diese Fragestellung endgültig mit zufriedenstellendem Signifikanzniveau beantworten zu können, sind weitere Untersuchungen an einem größeren Probenkollektiv nötig.

5.1.4 FGF11

FGF11 (*fibroblast growth factor 11*) gehört zu den Wachstumsfaktoren, die unter anderem eine Rolle bei der Embryogenese spielen. So wirken sie bei der Bildung des Mesoderms während der Gastrulation sowie der Organogenese des Gehirns, des Gastrointestinaltrakts sowie des Skelettsystems mit. Die genaue Rolle dieser Genfamilie ist aber noch nicht verstanden. Bei malignen Erkrankungen wird der FGF-Familie eine Rolle bei der Angiogenese zugeschrieben. Die Vermutung liegt nahe, dass FGF11 auch eine Rolle bei der Angiogenese des RCC spielt. In diesem Zusammenhang kann man postulieren, dass es sich bei FGF11 um ein potentiell interessantes Zielantigen handelt, das für therapeutische Zwecke ein interessantes Target darstellen könnte. Diese Meinung teilen auch Sonpavde und Kollegen, die in einem Review die Rolle des FGF-Rezeptor-Signalwegs beim Auftreten von Resistenzen bei Antiangiogenesetherapien bei RCC untersuchten (Sonpavde et al. 2014). Sie gelangten zu der Überzeugung, dass FGF-Rezeptoren als therapeutische Zielantigene beim klarzelligen Nierenkarzinom sehr vielversprechend und geeignet seien. So zeigten die FGF-Rezeptor-Inhibitoren Regorafenib, Dovitinib, Nintedanib und Cediranib in ersten klinischen Untersuchungen Wirksamkeit. Allerdings wird nach dem bisherigen Kenntnisstand FGF11 hauptsächlich im Inneren von Zellen vermutet. Seine Funktion ist noch nicht geklärt (Itoh and Ornitz 2008).

Wir konnten mit unserem Ansatz eine erhöhte FGF11-Expression in RCC-Gewebeproben im Vergleich zum Normalnierenkollektiv feststellen. Der relative cDNA-Gehalt im Tumor-

gewebe war rund fünffach höher als im Normalnierengewebe. Eine nennenswerte Expression in anderen lebenswichtigen Organen konnten wir durch unsere Recherchen nicht erkennen. So qualifiziert sich dieses Genprodukt als durchaus interessanter Kandidat für eine *targeted therapy*, z.B. für eine Zell-vermittelte Immuntherapie.

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in bereits publizierten Arbeiten anderer Arbeitsgruppen und ersten klinischen Studien wieder, die durchaus erfolgversprechende Ergebnisse bei der Verwendung von Antikörpern gegen den FGF-Rezeptor zeigten (Maruyama-Takahashi et al. 2008).

Inwieweit sich diese Ergebnisse auch auf den von uns untersuchten Subtyp FGF11 übertragen lassen ist Gegenstand weiterer Forschung. Die von uns neu gewonnenen Erkenntnisse lassen jedenfalls berechtigte Hoffnung auf ein klinisch wirksames Zielantigen zu. Durch eine zielgerichtete Therapie gegen lediglich einen Subtyp der Wachstumsfaktorfamilie liegt unserer Ansicht nach die Vermutung nahe, dass die Nebenwirkungen im Vergleich zur ungerichteten, häufig an allen/mehreren FGF-Rezeptoren ansetzenden Therapie deutlich geringer sein müssten. Somit sehen wir FGF11 als hoffnungsvolles Zielantigen mit moderatem Nebenwirkungsprofil.

In einem weiteren Teil dieser Versuchsreihe wurde das Überleben der Tumorpatienten mit hoher Expression mit denen mit niedriger FGF11-Expression verglichen. Hier konnten wir herausfinden, dass wenige der Tumorpatienten, die in ihrem Primärtumor nur eine geringe FGF11-Expression aufwiesen deutlich länger leben als die Patienten, bei denen im Primärtumor eine hohe Expression zu erkennen war. Bei Patienten, die in den ersten Monaten nach Operation versterben, spielt die unterschiedliche Expressionshöhe unserer Erkenntnis nach noch keine Rolle, aber insbesondere beim Langzeitüberleben werden die Unterschiede relevant. Diese Ergebnisse waren aufgrund der insgesamt eingeschränkten Patientenzahl noch nicht signifikant, jedoch auch - wie bei den übrigen Kandidatengen die von uns ausgewählt wurden - deutlich erkennbar. Dies bestätigt unsere These, dass es sich bei FGF11 um ein für die Tumorprogression wichtiges Protein handelt. Der exakte Angriffspunkt ist bis dato noch nicht bekannt und bedarf weiterer Studien. Sowohl als prognostischer Marker als auch als Zielantigen für Anti-Tumor-Therapie lohnt es sich, FGF11 weiter zu erforschen.

5.2 Ausblick

Die jahrelange etablierte unspezifische Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms mit Interferon- α und IL-2 hatte für die Patienten mit metastasierter Erkrankung geringe Ansprechraten. Dies wiederum hatte sehr geringe Fünf-Jahres-Überlebensraten zur Folge. Nach fünf Jahren waren bereits 60 - 80% der Patienten verstorben. Erst durch Charakterisierung von für das Tumor Überleben essentiellen Signalwegen gelang es neue Therapeutika einschließlich therapeutischer Antikörper wie Bevacizumab und nieder molekularer zielgerichteter Medikamente zu entwickeln.

In Anbetracht der knapper werdenden Ressourcen im Gesundheitswesen gewinnt der finanzielle Aspekt eine zunehmende Bedeutung, zumal es sich beim RCC um einen der selteneren Tumoren handelt, der zudem noch in verschiedene Tumorentitäten unterteilt werden muss und somit bereits an Relevanz als lukratives Forschungsziel für Pharmaunternehmen verliert. Die Etablierung im Rahmen klinischer Studien dürfte von einzelnen „kleineren“ Pharmaunternehmen kaum zu bewältigen sein (Sawyers 2008).

In Anbetracht dessen könnte der zukünftig limitierende Faktor nicht mehr das bisher limitierte Verständnis der Biologie und Physiologie eines Tumors sein, sondern die immer knapper verfügbaren finanziellen Mittel.

Zu einer möglichen Ressourcenschonung könnte die simultane Entwicklung von Therapie-Targets bzw. prognostischen bzw. prädiktiven Markern beitragen. So kann ein potentiell-elles Antigen sowohl für die klinische Therapie als auch zur Prognosebestimmung beitragen.

Wünschenswert wäre nicht nur aufgrund des finanziellen Debakels die gleichzeitige Entwicklung von Zielantigen-basierten Anti-Tumor-Therapien sowie einer eventuell damit verbundenen Möglichkeit des Therapie Monitorings. Die Etablierung solcher Tests sowie Vakzinen müsste trotz Allem angesichts der hohen genetischen Variabilität der Patienten und deren Tumoren für jede Tumorentität separat erfolgen, um eine ausreichende Zuverlässigkeit sowie Therapiesicherheit zu gewährleisten. Die Grundlagen hierzu wurden bereits durch einige Arbeitsgruppen geschaffen, jedoch sind noch keine zuverlässigen Aussagen hinsichtlich des Therapieerfolges und damit der Prognose möglich. Es konnte bis dato lediglich ein der klassischen TNM-Einteilung überlegener Prognosemarker, nämlich CA9, gefunden werden (Tostain et al. 2010). Diese Arbeit kann eventuell nach einer Validierung der Expressionsdaten der hier neu beschriebenen Marker an einem größeren Kollektiv zur Erreichung dieser Ziele beitragen.

Die derzeitig etablierten Chemotherapeutika verlängern die progressionsfreie Zeit um wenige Wochen, das Überleben der Patienten um wenige Wochen bzw. Monate. Dies ist keinesfalls zufriedenstellend, so dass dringend weitere Anstrengungen bei der Suche nach geeigneten Zielstrukturen unternommen werden müssen. Ziel wäre die Sicherung eines langfristigen Therapieerfolgs durch Immuntherapie. Dies ist derzeit nur bei Frauen mit Her2/neu-positiven Mamma-Karzinomen und einer Therapie mit Herceptin möglich.

Des Weiteren ist der Einsatz jeder neu etablierten Immuntherapie kritisch zu hinterfragen. Profitieren Patienten von einer minimal verlängerten Lebenserwartung, wenn sie gleichzeitig unter massiven Nebenwirkungen leiden müssen? So sollte zur Begutachtung der Validität von neuen Therapieansätzen neben der Beurteilung der Remissionsquote, der Zeit des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Intervalls unbedingt auch die Lebensqualität der Patienten in die Beurteilung einfließen. So kann eine potentiell wirksame Therapie, die das Überleben um Monate verlängert, dadurch sinnlos werden, dass mit dieser Therapie nicht beherrschbare Nebenwirkungen verbunden sind, die Patienten in ihrem Alltag so sehr einschränken, dass der potentielle Vorteil zunichte gemacht wird.

Die Betrachtung der *life time quality* wird in den nächsten Jahren zunehmend an Bedeutung gewinnen, da neben den eigentlichen Ansprechraten auch die oben angeführten Aspekte immer mehr zum Tragen kommen werden. All diese Forderungen können durch verbesserte molekularbiologische Methoden mit Sicherheit leichter zu erfüllen sein, als wenn man sich auf die etablierten *First-* und *Second-line*-Chemotherapeutika (z.B. Kinasen-inhibitoren) verlässt.

Grundlage einer personalisierten Therapie bzw. valider prognostischer Marker könnte diese Arbeit sein. In weiteren Experimenten an größeren Fallzahlen müssten die positiven in Teilen die Signifikanz knapp verfehlenden Prognoseergebnisse bestätigt werden. In einem nächsten Schritt könnte immunhistochemisch die genaue Lokalisation der Zielantigene erforscht werden. Im Anschluss daran könnten tierexperimentielle Studien z.B. an Maus-

modellen unternommen werden, um eine Vorstellung von den grundlegenden Ansprechraten bzw. dem potentiellen Nebenwirkungsprofil von z.B. Antikörpern, die gegen unserer Kandidaten Gene gerichtet sind, zu gewinnen. Die Ansprechraten könnten, wie in der klinischen Forschung gebräuchlich, definiert werden als z.B. Verlängerung des Gesamtüberlebens der Mäuse bzw. das Erreichen einer Remission oder die Dauer einer Remission. Bei den von uns getesteten Kandidatengenomen scheint dies ein durchaus gangbares Konzept zu sein.

6 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Identifizierung neuer Zielantigene beim Nierenzellkarzinom sowie deren Beurteilung hinsichtlich Ihrer Eignung als potentielle prognostische Marker.

Das Nierenzellkarzinom ist ein weitgehend strahlenresistenter Tumor, auch bisherig verfügbare Chemotherapeutika zeigen ein schlechtes Ansprechverhalten bei dieser Tumorentität. Als einzige erfolgversprechende Therapie bleibt bis dato die radikale Tumornephrektomie. Auch bei diesem radikal operativen Vorgehen und primärer R0-Resektion entwickelt eine große Anzahl von Patienten Rezidive, meist in Form von Metastasierung. Eine Selektion und damit verbunden eine Risikoabschätzung, welche Patienten zur Rezidiven neigen, ist bisher nicht möglich. Medikamentöse *First-line*-Therapien verwenden derzeit entweder die Tyrosinkinaseinhibitoren Sunitinib bzw. Pazopanib, den monoklonale Antikörper Bevacizumab in Verbindung mit IFN oder bei Patienten mit bereits Initial schlechter Prognose den mTOR-Inhibitor Temsirolimus. Abhängig von der *First-line*-Therapie stehen verschiedene *Second-line*-Therapien zur Verfügung. Bei fortgeschrittenem RCC und Kontraindikation bzw. Versagen einer Zytokintherapie wird der Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib empfohlen. Bei Versagen von Sunitinib oder einer Zytokintherapie steht als *second-line* der Tyrosinkinaseinhibitor Axitinib zur Verfügung. Der mTOR-Inhibitor wird empfohlen bei Versagen einer *First-line*-VEGF-Therapie, wobei der therapeutische Nutzen als deutlich limitiert angesehen werden muss. Welche *First-line*-Therapie sich für welchen Patienten eignet ist momentan nicht evidenzbasiert zu klären. Hier gibt es vorwiegend Empfehlungen nationaler Arbeitsgruppen. Die weitere Therapieplanung ergibt sich aus einer ganz pragmatischen Herangehensweise, nämlich aus dem Wirkungs- und insbesondere dem Nebenwirkungsprofil. So wird bei einem langsam wachsenden Tumor mit guter Prognose nicht das Medikament zum Einsatz kommen, das die schwersten Nebenwirkungen hat, da dieser Patient damit eine deutlich geringere Compliance bei eventuell nötigen Folgetherapien aufweisen wird. Mit den bisher gängigen molekularbiologischen Methoden gelang es mit Ausnahme des Goldstandards CA9 bis dato nur in sehr geringem Umfang, Zielstrukturen für eine personalisierte Immuntherapie oder als prognostische Marker zu entwickeln, was mitunter auch an der schier unüberschaubaren Anzahl potentieller Kandidaten Gene liegen mag.

Mit diesem von uns durchgeführten Ansatz gelingt es, durch die Auswertung von *Microarray*-Daten für RCC spezifische Expressionsprofile zu erzeugen. Diese werden anschließend mit Expressionsprofilen von Normalnierengewebe abgeglichen. Besteht zwischen der Expression ein deutlicher Unterschied, so können potentielle Zielantigene erkannt werden. Anschließend wird durch eine Expressionsanalyse der Kandidaten Gene in Normalgeweben vermieden, Zielantigene zu etablieren, die auch in Normalnierengeweben hohe Expressionswerte zeigen. Dies würde nämlich zu unkalkulierbaren Nebenwirkungen führen. So könnte eine hohe Expression in der Leber, im Falle einer Therapie mit einem

solchen Zielantigen, zur Schädigung des Organs bis zum kompletten Ausfall führen. Um diese Risiken von Anfang an zu reduzieren, versuchten wir, diese Prämisse von Anfang an beizubehalten. Aus den umfangreichen uns zur Verfügung stehenden *Microarray*-Datensätzen sollen einige wenige potentiell interessante Kandidaten Gene durch Clustering eingegrenzt werden. Hierfür wurden Kriterien wie das Vorhandensein in Tumorgewebe und die Abwesenheit in Muskelgewebe sowie lebenswichtigen Organen wie Herz, zentralem Nervensystem, Leber etc. angewandt. Ein weiteres Kriterium war die Expressionsstärke. Um nicht zu viele, für ein bestimmtes Kollektiv interessante Gene von vornherein auszuschließen wurden auch einige modifizierte Analysen durchgeführt. Hierbei wurde eine Expression in 75% der Nierentumore sowie eine schwache Expression in den übrigen Geweben verwendet. Diese Analysen wurden miteinander verglichen und übereinstimmende Gene wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet. Durch Internet-Recherche in den gängigen Datenbanken wurden diese Gene anhand der Expressionsorte weiter eingegrenzt. Auf diesem Weg musste das Initial sehr interessante SPAG4 wegen der hohen Expression in der Pankreas ausgeschlossen werden. Ziel war es, im Folgenden dieses nun kleine Kollektiv auf seine Eignung als potentielles Zielantigen zum einen bzw. als prognostischer Marker zum anderen hin an einem ersten kleinen Probenkollektiv mittels quantitativer RT-PCR zu überprüfen. Als Goldstandard verwendeten wir CA9. Die ersten Experimente dienten nur der Implementierung der Methodik und sollten eine Validierung unserer Auswahlkriterien darstellen. Für die eigentlichen statistischen Auswertungen wurde der von Mitarbeitern des Labors für Tumorummunologie zur Verfügung gestellte umfangreiche Datensatz verwendet für dessen Erstellung auch die in dieser Arbeit isolierten RNAs verwendet wurden. Nach den oben beschriebenen Vorarbeiten zeigten sich CA9, FGF11, PTHLH und SLC6A3 als für die Antitumortherapie sowie für die prognostische Beurteilung des Krankheitsverlaufs interessante Zielstrukturen. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung aus RCC-Gewebeproben und tumortragenden Normalnierengewebeproben, die reverse Transkription mit darauf folgender quantitativer RT-PCR aller Kandidatengene sowie des Referenzgens CA9. Dieser Ansatz wurde bisher kaum gewählt, da dafür enorme *microarray*-Datenmengen für die ersten Auswertungen benötigt werden, die uns durch unsere Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Keith Skubitz dankenswerterweise zugänglich gemacht wurden. Die in unserem Labor vorhandene Gewebekbank von RCC- und Normalnierengeweben machten mRNA-Untersuchungen an einem großen Patientenkollektiv möglich.

Über diesen Weg gelang es uns, für jedes aufgrund von Oligonukleotid-Microarray-Daten ausgewählte Kandidatengen die Expression im Normalnieren- und RCC-Gewebe zu vergleichen. Hier zeigte sich eine wie erwartet signifikant höhere Expression der Kandidaten Gene im Tumorgewebe ($p < 0,01$ für alle Marker außer SLC6A3). Dies stellt eine Validierung dieser potentiellen Zielantigene dar.

Da in der Regel Metastasen und nicht Primärtumoren Ziel von Immuntherapien sind, wurden auch 40 ccRCC-Metastasen im Rahmen einer anderen Arbeit unseres Labors auf Expression der Kandidatengen-mRNAs hin untersucht. Es wurden gleiche oder sogar höhere Expressionsniveaus dieser Kandidatengen-mRNAs gefunden (unveröffentlicht). Daher bieten sich von diesen Kandidatengenen kodierte Proteine als Zielantigene für Antikörper- und/oder Zell-vermittelte Immuntherapien von ccRCC-Patienten mit fortgeschrittener, disseminierter Erkrankung an.

Zu diesen Gewebeproben existierten komplette Patientenakten mit den jeweiligen Behandlungen sowie dem vollständigen *follow-up*. Dies ermöglichte uns die Korrelation des Patientenüberlebens mit der Expression. Dazu wurden innerhalb der RCC-Gewebeproben zwei Gruppen unterschiedlicher Expressionshöhe gebildet und diese mit dem Überleben

korreliert. Inwieweit die höhere Expression einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf bzw. das Ableben hat konnte auf diese Weise für jedes Kandidatengen separat untersucht werden.

Die unterschiedliche Expressionshöhe in den beiden gebildeten Gruppen des SLC6A3 Gens ergaben, ebenso wie bei allen anderen untersuchten Kandidatengenen keine statistisch signifikante Differenz des Gesamtüberlebens. Es konnte aber ein sehr interessanter Trend erkannt werden. Patienten mit niedriger Expression der Kandidaten Gene lebten deutlich länger als Patienten mit hoher Expression des jeweiligen Gens. Einzige Ausnahme bildete die Untersuchung des CA9 Gens. Hier lebten Patienten mit niedriger Expression deutlich kürzer als Patienten mit hoher Expression. Aufgrund dieser Resultate erachten wir CA9, SLC6A3, PTHLH sowie FGF11 als durchaus interessante Kandidaten Gene zur prognostischen Abschätzung des Krankheitsverlaufs.

Eine weitere Verifizierung dieser ersten Ergebnisse an einem größeren Patientenkollektiv wäre ein nächstes Projekt. Hierbei würden dann eventuell auch statistisch signifikante Ergebnisse bei der Beurteilung der Kandidaten Gene als prognostische Marker zu beobachten sein. Interessant wäre dann auch eine Korrelation dieser Zielstrukturen mit den unterschiedlichen verwendeten Therapeutika um so eventuell eine Aussage hinsichtlich der Erfolgsaussicht einer konkreten Therapie getroffen werden könnte.

7 Literaturverzeichnis

Akino, K., A. Ohtsuru, K. Kanda, A. Yasuda, T. Yamamoto, Y. Akino, S. Naito, M. Kurokawa, N. Iwahori and S. Yamashita (2000). "Parathyroid hormone-related peptide is a potent tumor angiogenic factor." *Endocrinology* **141**(11): 4313-4316.

Amin, M. B., C. L. Corless, A. A. Renshaw, S. K. Tickoo, J. Kubus and D. S. Schultz (1997). "Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases." *Am J Surg Pathol* **21**(6): 621-635.

Atkins, D., S. Ferrone, G. E. Schmahl, S. Storkel and B. Seliger (2004). "Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma?" *J Urol* **171**(2 Pt 1): 885-889.

Atzpodien, J., H. Kirchner, H. J. Illiger, B. Metzner, D. Ukena, H. Schott, P. J. Funke, M. Gramatzki, S. Jurgenson, T. Wandert, T. Patzelt and M. Reitz (2001). "IL-2 in combination with IFN- alpha and 5-FU versus tamoxifen in metastatic renal cell carcinoma: long-term results of a controlled randomized clinical trial." *Br J Cancer* **85**(8): 1130-1136.

Bailey, A. and D. F. McDermott (2013). "Immune checkpoint inhibitors as novel targets for renal cell carcinoma therapeutics." *Cancer J* **19**(4): 348-352.

Bakre, M. M., Y. Zhu, H. Yin, D. W. Burton, R. Terkeltaub, L. J. Deftos and J. A. Varner (2002). "Parathyroid hormone-related peptide is a naturally occurring, protein kinase A-dependent angiogenesis inhibitor." *Nat Med* **8**(9): 995-1003.

Bertolotto, C., F. Lesueur, S. Giuliano, T. Strub, M. de Lichy, K. Bille, P. Dessen, B. d'Hayer, H. Mohamdi, A. Remenieras, E. Maubec, A. de la Fouchardiere, V. Molinie, P. Vabres, S. Dalle, N. Poulalhon, T. Martin-Denavit, L. Thomas, P. Andry-Benzaquen, N. Dupin, F. Boitier, A. Rossi, J. L. Perrot, B. Labeille, C. Robert, B. Escudier, O. Caron, L. Brugieres, S. Saule, B. Gardie, S. Gad, S. Richard, J. Couturier, B. T. Teh, P. Ghiorzo, L. Pastorino, S. Puig, C. Badenas, H. Olsson, C. Ingvar, E. Rouleau, R. Lidereau, P. Bahadoran, P. Vielh, E. Corda, H. Blanche, D. Zelenika, P. Galan, G. French Familial Melanoma Study, F. Aubin, B. Bachollet, C. Becuwe, P. Berthet, Y. J. Bignon, V. Bonadona, J. L. Bonafe, M. N. Bonnet-Dupeyron, F. Cambazard, J. Chevrant-Breton, I. Coupier, S. Dalac, L. Demange, M. d'Incan, C. Dugast, L. Faivre, L. Vincent-Fetita, M. Gauthier-Villars, B. Gilbert, F. Grange, J. J. Grob, P. Humbert, N. Janin, P. Joly, D. Kerob, C. Lasset, D. Leroux, J. Levang, J. M. Limacher, C. Livideanu, M. Longy, A. Lortholary, D. Stoppa-Lyonnet, S. Mansard, L. Mansuy, K. Marrou, C. Mateus, C. Maugard, N. Meyer, C. Nogues, P. Souteyrand, L. Venat-Bouvet, H. Zattara, V. Chaudru, G. M. Lenoir, M. Lathrop, I. Davidson, M. F. Avril, F. Demenais, R. Ballotti and B. Bressac-de Paillerets (2011). "A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma." *Nature* **480**(7375): 94-98.

Bhatia, A. and Y. Kumar (2014). "Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review." *Expert Rev Clin Immunol* **10**(1): 41-62.

Bui, M. H., D. Seligson, K. R. Han, A. J. Pantuck, F. J. Dorey, Y. Huang, S. Horvath, B. C. Leibovich, S. Chopra, S. Y. Liao, E. Stanbridge, M. I. Lerman, A. Palotie, R. A. Figlin and A. S. Belldegrun (2003). "Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in

advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy." Clin Cancer Res **9**(2): 802-811.

Burton, P. B. and D. E. Knight (1992). "Parathyroid hormone-related peptide can regulate the growth of human lung cancer cells, and may form part of an autocrine TGF-alpha loop." FEBS Lett **305**(3): 228-232.

Burton, P. B., C. Moniz and D. E. Knight (1990). "Parathyroid hormone related peptide can function as an autocrine growth factor in human renal cell carcinoma." Biochem Biophys Res Commun **167**(3): 1134-1138.

Cho, Y. M., D. A. Lewis, P. F. Koltz, V. Richard, T. A. Gocken, T. J. Rosol, R. L. Konger, D. F. Spandau and J. Foley (2004). "Regulation of parathyroid hormone-related protein gene expression by epidermal growth factor-family ligands in primary human keratinocytes." J Endocrinol **181**(1): 179-190.

Dougherty, K. M., E. A. Blomme, A. J. Koh, J. E. Henderson, K. J. Pienta, T. J. Rosol and L. K. McCauley (1999). "Parathyroid hormone-related protein as a growth regulator of prostate carcinoma." Cancer Res **59**(23): 6015-6022.

Dutcher, J. P., P. de Souza, D. McDermott, R. A. Figlin, A. Berkenblit, A. Thiele, M. Krygowski, A. Strahs, J. Feingold and G. Hudes (2009). "Effect of temsirolimus versus interferon-alpha on outcome of patients with advanced renal cell carcinoma of different tumor histologies." Med Oncol **26**(2): 202-209.

Esbrit, P., M. V. Alvarez-Arroyo, F. De Miguel, O. Martin, M. E. Martinez and C. Caramelo (2000). "C-terminal parathyroid hormone-related protein increases vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells." J Am Soc Nephrol **11**(6): 1085-1092.

Escudier, B., C. Szczylik, T. E. Hutson, T. Demkow, M. Staehler, F. Rolland, S. Negrier, N. Laferriere, U. J. Scheuring, D. Cella, S. Shah and R. M. Bukowski (2009). "Randomized phase II trial of first-line treatment with sorafenib versus interferon Alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma." J Clin Oncol **27**(8): 1280-1289.

Franke, B., M. Hoogman, A. Arias Vasquez, J. G. Heister, P. J. Savelkoul, M. Naber, H. Scheffer, L. A. Kiemeny, C. C. Kan, J. J. Kooij and J. K. Buitelaar (2008). "Association of the dopamine transporter (SLC6A3/DAT1) gene 9-6 haplotype with adult ADHD." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **147B**(8): 1576-1579.

Gelernter, J., D. Vandenberg, S. D. Kruger, D. L. Pauls, R. Kurlan, A. J. Pakstis, K. K. Kidd and G. Uhl (1995). "The dopamine transporter protein gene (SLC6A3): primary linkage mapping and linkage studies in Tourette syndrome." Genomics **30**(3): 459-463.

Hastings, R. H., D. W. Burton, R. A. Quintana, E. Biederman, A. Gujral and L. J. Deftos (2001). "Parathyroid hormone-related protein regulates the growth of orthotopic human lung tumors in athymic mice." Cancer **92**(6): 1402-1410.

Higgins, J. P., R. Shinghal, H. Gill, J. H. Reese, M. Terris, R. J. Cohen, M. Fero, J. R. Pollack, M. van de Rijn and J. D. Brooks (2003). "Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray." Am J Pathol **162**(3): 925-932.

Itoh, N. and D. M. Ornitz (2008). "Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family." *Dev Dyn* **237**(1): 18-27.

Iwamura, M., W. Wu, M. Muramoto, M. Ohori, S. Egawa, T. Uchida and S. Baba (1999). "Parathyroid hormone-related protein is an independent prognostic factor for renal cell carcinoma." *Cancer* **86**(6): 1028-1034.

Liao, S. Y., O. N. Aurelio, K. Jan, J. Zavada and E. J. Stanbridge (1997). "Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney." *Cancer Res* **57**(14): 2827-2831.

Lin, K. Y., D. Lu, C. F. Hung, S. Peng, L. Huang, C. Jie, F. Murillo, J. Rowley, Y. C. Tsai, L. He, D. J. Kim, E. Jaffee, D. Pardoll and T. C. Wu (2007). "Ectopic expression of vascular cell adhesion molecule-1 as a new mechanism for tumor immune evasion." *Cancer Res* **67**(4): 1832-1841.

Liou, L. S., T. Shi, Z. H. Duan, P. Sadhukhan, S. D. Der, A. A. Novick, J. Hissong, M. Skacel, A. Almasan and J. A. DiDonato (2004). "Microarray gene expression profiling and analysis in renal cell carcinoma." *BMC Urol* **4**: 9.

Ljungberg, B., N. C. Cowan, D. C. Hanbury, M. Hora, M. A. Kuczyk, A. S. Merseburger, J. J. Patard, P. F. Mulders and I. C. Sinescu (2010). "EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update." *Eur Urol* **58**(3): 398-406.

Luparello, C., R. Romanotto, A. Tipa, R. Sirchia, N. Olmo, I. Lopez de Silanes, J. Turnay, M. A. Lizarbe and A. F. Stewart (2001). "Midregion parathyroid hormone-related protein inhibits growth and invasion in vitro and tumorigenesis in vivo of human breast cancer cells." *J Bone Miner Res* **16**(12): 2173-2181.

Martin, T. J., J. M. Moseley and E. D. Williams (1997). "Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine." *J Endocrinol* **154** Suppl: S23-37.

Maruyama-Takahashi, K., N. Shimada, T. Imada, Y. Maekawa-Tokuda, T. Ishii, J. Ouchi, H. Kusaka, H. Miyaji, S. Akinaga, A. Tanaka and K. Shitara (2008). "A neutralizing anti-fibroblast growth factor (FGF) 8 monoclonal antibody shows anti-tumor activity against FGF8b-expressing LNCaP xenografts in androgen-dependent and -independent conditions." *Prostate* **68**(6): 640-650.

Massfelder, T., H. Lang, E. Schordan, V. Lindner, S. Rothhut, S. Welsch, P. Simon-Assmann, M. Barthelmebs, D. Jacqmin and J. J. Helwig (2004). "Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene." *Cancer Res* **64**(1): 180-188.

Mellman, I., G. Coukos and G. Dranoff (2011). "Cancer immunotherapy comes of age." *Nature* **480**(7378): 480-489.

Mickisch, G. H. (1994). "Chemoresistance of renal cell carcinoma: 1986-1994." *World J Urol* **12**(4): 214-223.

Montironi, R., G. Mikuz, F. Algaba, A. Lopez-Beltran, P. W. Hamilton and C. Parkinson (1999). "Epithelial tumours of the adult kidney." *Virchows Arch* **434**(4): 281-290.

Motzer, R. J., B. Escudier, S. Oudard, T. E. Hutson, C. Porta, S. Bracarda, V. Grunwald, J. A. Thompson, R. A. Figlin, N. Hollaender, G. Urbanowitz, W. J. Berg, A. Kay, D. Lebwohl and A. Ravaud (2008). "Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial." Lancet **372**(9637): 449-456.

Motzer, R. J., T. E. Hutson, P. Tomczak, M. D. Michaelson, R. M. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S. T. Kim, I. Chen, P. W. Bycott, C. M. Baum and R. A. Figlin (2007). "Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma." N Engl J Med **356**(2): 115-124.

Pastorekova, S., S. Parkkila, A. K. Parkkila, R. Opavsky, V. Zelnik, J. Saarnio and J. Pastorek (1997). "Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts." Gastroenterology **112**(2): 398-408.

Philbrick, W. M., J. J. Wysolmerski, S. Galbraith, E. Holt, J. J. Orloff, K. H. Yang, R. C. Vasavada, E. C. Weir, A. E. Broadus and A. F. Stewart (1996). "Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology." Physiol Rev **76**(1): 127-173.

Purper-Ouakil, D., M. Wohl, S. Orejarena, S. Cortese, C. Boni, M. Asch, M. C. Mouren and P. Gorwood (2008). "Pharmacogenetics of methylphenidate response in attention deficit/hyperactivity disorder: association with the dopamine transporter gene (SLC6A3)." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **147B**(8): 1425-1430.

Ravaud, A., N. Trufflandier, J. M. Ferriere, M. Debled, J. Palussiere, L. Cany, R. Gaston, S. Mathoulin-Pelissier and B. N. Bui (2003). "Subcutaneous interleukin-2, interferon alpha-2b and 5-fluorouracil in metastatic renal cell carcinoma as second-line treatment after failure of previous immunotherapy: a phase II trial." Br J Cancer **89**(12): 2213-2218.

Rini, B. I., G. Wilding, G. Hudes, W. M. Stadler, S. Kim, J. Tarazi, B. Rosbrook, P. C. Trask, L. Wood and J. P. Dutcher (2009). "Phase II study of axitinib in sorafenib-refractory metastatic renal cell carcinoma." J Clin Oncol **27**(27): 4462-4468.

Sawyers, C. L. (2008). "The cancer biomarker problem." Nature **452**(7187): 548-552.

Schendel, D. J., R. Oberneder, C. S. Falk, P. Jantzer, S. Kressenstein, B. Maget, A. Hofstetter, G. Riethmuller and E. Nossner (1997). "Cellular and molecular analyses of major histocompatibility complex (MHC) restricted and non-MHC-restricted effector cells recognizing renal cell carcinomas: problems and perspectives for immunotherapy." J Mol Med (Berl) **75**(6): 400-413.

Sellers, R. S., B. E. LeRoy, E. A. Blomme, S. Tannehill-Gregg, S. Corn and T. J. Rosol (2004). "Effects of transforming growth factor-beta1 on parathyroid hormone-related protein mRNA expression and protein secretion in canine prostate epithelial, stromal, and carcinoma cells." Prostate **58**(4): 366-373.

Sheridan, C. (2014). "Immune-checkpoint inhibitors march on, now in combinations." Nat Biotechnol **32**(4): 297-299.

Signoretti, S., M. Regan and M. Atkins (2008). "Carbonic anhydrase IX as a predictive biomarker of response to kidney cancer therapy." BJU Int **101** Suppl 4: 31-35.

Skubitz, K. M. and A. P. Skubitz (2002). "Differential gene expression in renal-cell cancer." J Lab Clin Med **140**(1): 52-64.

Sonpavde, G., C. D. Willey and S. Sudarshan (2014). "Fibroblast growth factor receptors as therapeutic targets in clear-cell renal cell carcinoma." Expert Opin Investig Drugs **23**(3): 305-315.

Storkel, S., J. N. Eble, K. Adlakha, M. Amin, M. L. Blute, D. G. Bostwick, M. Darson, B. Delahunt and K. Iczkowski (1997). "Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC)." Cancer **80**(5): 987-989.

Su, D., L. Stamatakis, E. A. Singer and R. Srinivasan (2014). "Renal cell carcinoma: molecular biology and targeted therapy." Curr Opin Oncol **26**(3): 321-327.

Supuran, C. T. (2007). "Carbonic anhydrases as drug targets--an overview." Curr Top Med Chem **7**(9): 825-833.

Supuran, C. T., A. Scozzafava and A. Casini (2003). "Carbonic anhydrase inhibitors." Med Res Rev **23**(2): 146-189.

Takahashi, M., D. R. Rhodes, K. A. Furge, H. Kanayama, S. Kagawa, B. B. Haab and B. T. Teh (2001). "Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9754-9759.

Takahashi, M., X. J. Yang, J. Sugimura, J. Backdahl, M. Tretiakova, C. N. Qian, S. G. Gray, R. Knapp, J. Anema, R. Kahnoski, D. Nicol, N. J. Vogelzang, K. A. Furge, H. Kanayama, S. Kagawa and B. T. Teh (2003). "Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers." Oncogene **22**(43): 6810-6818.

Talon, I., V. Lindner, C. Sourbier, E. Schordan, S. Rothhut, M. Barthelmebs, H. Lang, J. J. Helwig and T. Massfelder (2006). "Antitumor effect of parathyroid hormone-related protein neutralizing antibody in human renal cell carcinoma in vitro and in vivo." Carcinogenesis **27**(1): 73-83.

Thoenes, W., S. Storkel, H. J. Rumpelt, R. Moll, H. P. Baum and S. Werner (1988). Chromophobe cell renal carcinoma and its variants--a report on 32 cases. J Pathol. **155**: 277-287.

Tostain, J., G. Li, A. Gentil-Perret and M. Gigante (2010). "Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment." Eur J Cancer **46**(18): 3141-3148.

Tureci, O., U. Sahin, E. Vollmar, S. Siemer, E. Gottert, G. Seitz, A. K. Parkkila, G. N. Shah, J. H. Grubb, M. Pfreundschuh and W. S. Sly (1998). "Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7608-7613.

Yang, J. C., L. Haworth, R. M. Sherry, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, S. M. Steinberg, H. X. Chen and S. A. Rosenberg (2003). "A randomized trial of

bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer." *N Engl J Med* **349**(5): 427-434.

Young, A. N., M. B. Amin, C. S. Moreno, S. D. Lim, C. Cohen, J. A. Petros, F. F. Marshall and A. S. Neish (2001). "Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers." *Am J Pathol* **158**(5): 1639-1651.

Zambrano, N. R., I. A. Lubensky, M. J. Merino, W. M. Linehan and M. M. Walther (1999). "Histopathology and molecular genetics of renal tumors toward unification of a classification system." *J Urol* **162**(4): 1246-1258.

8 Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
Bp	Basenpaare
CA9	<i>carboanhydrase 9</i>
ccRCC	<i>clear cell renal cell carcinoma</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CP	<i>crossing point</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	2'-(Desoxy) Ribonukleotid 5'triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FGF11	<i>fibroblast-growth-factor 11</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin receptor</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasen-Ketteneaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGFR	<i>platelet derived growth factor receptor</i>
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
PTH1H	<i>parathyroid hormone like hormone</i>
RCC	<i>Renal cell carcinoma</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Reverse Transkription
SLC6A3	<i>Solute carrier family 6 A3</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat/EDTA

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	<i>tumor nodes metastasis</i>
tRNA	Transfer-RNA
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
5-FU	5-Fluoruracil

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors für Tumorimmunologie. Hervorheben möchte ich meinen Betreuer, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann. In den vergangenen Jahren stand er mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Seine Geduld und seine Unterstützung sowohl in fachlichen als auch zwischenmenschlichen Belangen waren herausragend.

Für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung und der Akquirierung der Daten bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Alexander Buchner. Anja Henning und Mirna Castro haben mich tatkräftig bei der Durchführung der Kapillarelektrophorese unterstützt, vielen Dank.

Nicht nur finanzielle, sondern auch fachliche Unterstützung habe ich durch den Promotionsstudiengang Molekulare Medizin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Heesemann erhalten. Vielen Dank.

Selbstverständlich haben auch Menschen außerhalb des Labors einen entscheidenden Anteil an dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie, die niemals an mir gezweifelt hat. Danke für eure Unterstützung, danke für eure guten Ratschläge und danke, dass ihr immer hinter mir steht.

Ich danke dem Schreibbüro Lenggries für die Unterstützung bei der Niederschrift.

Mein Dank gilt ganz speziell meinen Kindern Kathrin, Christina und Tanja. Sie mussten viele Tage auf mich verzichten und ohne ihr Verständnis und ihre Liebe hätte ich es nie geschafft.

Das Ende dieser Danksagung ist meiner Frau Andrea gewidmet. Sie hat meine Launen während der Fertigstellung dieser Arbeit am nächsten miterlebt und war trotz allem immer der Fels in der Brandung. Vielen Dank für deine Liebe .