Identifizierung metastasierungsassoziierter molekularer Faktoren durch genomweite Expressionsanalysen an pulmonalen Metastasen und Primärtumoren des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Diplomchemikerin Daniela Wuttig

geboren am 12. Dezember 1982 in Bautzen

Eingereicht am 21. Juli 2010

Die Dissertation wurde in der Zeit von August 2006 bis Juli 2010 am Lehrstuhl für Allgemeine Biochemie der Technischen Universität Dresden in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus Dresden angefertigt.

Gutachter: **Prof. Dr. rer. nat. habil. Karl-Heinz van Pée**

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Manfred P. Wirth

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i

Nomenklatur iii

Tabellenverzeichnis vii

Abbildungsverzeichnis ix

1 Einleitung 1
- 1.1 Die Metastasierung von Tumoren . . . 1
  - 1.1.1 Der mehrstufige Metastasierungsprozess . . . 1
  - 1.1.2 Die Latenz von Tumorzellen . . . 3
- 1.2 Das Nierenzellkarzinom . . . 5
  - 1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Diagnose . . . 5
  - 1.2.2 Klassifikation . . . 5
  - 1.2.3 Therapie und Prognose . . . 6
  - 1.2.4 Genetische Aberrationen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms . . . 9
  - 1.2.5 Biomarker des klarzelligen Nierenzellkarzinoms . . . 10
- 1.3 „Microarray“-Analysen zur Identifikation prognostisch relevanter molekularer Faktoren . . . 11

2 Zielstellung 13

3 Material und Methoden 15
- 3.1 Material . . . 15
  - 3.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien . . . 15
  - 3.1.2 Puffer und Lösungen . . . 17
  - 3.1.3 Primer-Sonden-Gemische . . . 18
- 3.2 Probenmaterial und -bearbeitung . . . 20
  - 3.2.1 Humanes Probenmaterial . . . 20
  - 3.2.2 Anfertigung und Hämalaun-Eosin-Färbung von Gefriergewebeschnitten 20
  - 3.2.3 Isolation von Total-RNA aus kryokonserviertem Gewebe . . . 21
  - 3.2.4 RNA-Quantifizierung und -Qualitätskontrolle . . . 22
  - 3.2.5 cDNA-Synthese . . . 23
- 3.3 „Microarray“-Analysen . . . 23
  - 3.3.1 Durchführung der „Microarray“-Analysen . . . 24
  - 3.3.2 Bioinformatische Auswertung der „Microarray“-Daten . . . 30
- 3.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion . . . 34
  - 3.4.1 Expressionsmessung mittels „TaqMan Low Density Arrays“ . . . 34
  - 3.4.2 Expressionsmessung am LightCycler 480 . . . 36
  - 3.4.3 Relative Quantifizierung mittels ΔΔCT-Methode . . . 37
- 3.5 Immunhistochemische Färbungen . . . 37

3.5.1 Probenmaterial . . . 37
3.5.2 Immunhistochemische PECAM1-Färbung — Beurteilung der Mikrogefäßdichte . . . 38
3.5.3 Immunhistochemische TSPAN7-Färbung . . . 39
3.6 Statistik . . . 40
3.6.1 Test auf Normalverteilung, Gruppenvergleiche und Korrelationen . . . 40
3.6.2 Überlebensanalysen . . . 41

4 Ergebnisse **43**
4.1 „Microarray“-Analysen . . . 43
4.1.1 Spät *vs.* früh entwickelte pulmonale Metastasen . . . 43
4.1.2 Nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierte primäre Nierenzellkarzinome . . . 47
4.1.3 Vergleich der Ergebnisse der Metastasen- und Primärtumoranalysen . . . 51
4.1.4 Nicht metastasierte *vs.* metastasierte primäre Nierenzellkarzinome . . . 53
4.2 Validierung der „Microarray“-Ergebnisse . . . 55
4.2.1 Quantitative PCR — „Screening“ mittels „TaqMan Low Density Arrays“ 55
4.2.2 Quantitative PCR — Untersuchung der Expression ausgewählter Gene 61
4.2.3 Immunhistochemische PECAM1-Färbung . . . 67
4.2.4 Immunhistochemische TSPAN7-Färbung . . . 72

5 Diskussion **79**
5.1 „Microarray“-Analysen . . . 79
5.1.1 Biostatistische Auswertung der „Microarray“-Daten . . . 79
5.1.2 Späte *vs.* frühe pulmonale Metastasen — potenziell funktionell an der Tumorzelllatenz beteiligte Gene . . . 83
5.1.3 Nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierte primäre Nierenzellkarzinome — potenziell prognostisch nutzbare Gene . . . 87
5.1.4 Vergleich der Ergebnisse der „Microarray“-Studien an Primärtumoren und Metastasen . . . 90
5.1.5 Nicht metastasierte *vs.* metastasierte Primärtumoren . . . 94
5.1.6 Ähnlichkeit pulmonaler Metastasen und primärer metastasierter Nierenzellkarzinome . . . 97
5.2 Validierung der „Microarray“-Ergebnisse . . . 98
5.2.1 „Screening“ mittels „TaqMan Low Density Arrays“ . . . 99
5.2.2 Validierung ausgewählter Kandidatengene mittels quantitativer PCR und Immunhistochemie . . . 102
5.2.3 Zusammenfassende Bewertung und Ausblick . . . 115

6 Zusammenfassung **117**

Literaturverzeichnis **121**

A Anhang **I**

Danksagung **V**

Erklärung **VII**

Nomenklatur

Im Folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen und Formelzeichen (außer SI-Einheiten) sowie die verwendeten Gensymbole und deren ausführliche Gennamen [National Center for Biotechnology Information, 2010] aufgelistet. Die Gene und Proteine werden der Übersichtlichkeit halber im fortlaufenden Text der Arbeit nur mit ihren offiziellen Symbolen bezeichnet. Gene sind stets in kursiver, Proteine in normaler Schriftform dargestellt. Die Schrägstriche in den Gensymbolen und Gennamen in der folgenden Nomenklatur kennzeichnen verschiedene Gene, die sich in ihrem Symbol bzw. Namen nur in dem durch den Schrägstrich abgetrennten Buchstaben bzw. die abgetrennte Zahl unterscheiden. Die Expression der Gene *SAA1* und *SAA2* konnte aufgrund ihrer Sequenzhomologie weder in den Oligonukleotid-„Microarray"-Analysen noch in der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) getrennt quantifiziert werden, was in der Arbeit generell durch das Kürzel *SAA1/2* gekennzeichnet ist.

Abkürzung	**Begriff**	**Abkürzung**	**Begriff**
A. dest.	destilliertes Wasser	ECOG	„Eastern Cooperative Oncology Group"
Abb.	Abbildung(en)	EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ANED	„alive, no evidence of disease"; lebt ohne Rezidiv	Fa.	Firma
ANOVA	„analysis of variance"	FAM	6-Carboxyfluorescein
Anz.	Anzahl	FDR	„false discovery rate"
AWD	„alive with disease"; lebt mit Rezidiv	FFPE	formalinfixiert, paraffineingebettet
BSA	Rinderserumalbumin	FWER	„family-wise error rate"
Ca.	Karzinom	G	Tumorgrad
chr.	chromosomal	Gl.	Gleichung(en)
cDNA	„complementary DNA"	H_2O_2	Wasserstoffperoxid
CI	Konfidenzintervall	hep.	hepatisch
cRNA	„complementary RNA"	HR	„hazard ratio"
CT	„threshold cycle"	HSD	„honestly significant difference"
CTP	Cytosintriphosphat		
DAB	Diaminobenzidin	HUVEC	„human umbilical vein endothelial cells"
DFS	„disease-free survival"; rezidivfreies Überleben	ID	Identifikationsnummer
DMSO	Dimethylsulfoxid	JÜR	Jahresüberlebensrate
DNA	Desoxyribonukleinsäure	klin.	klinisch
(d)NTP(s)	(Desoxy-)ribonukleotid(e)	KNN	„k-nearest neighbouring"
DOD	„dead of disease"; tumorbedingt verstorben	kont.	kontinuierlich
		kum.	kumulativ
DTT	Dithiothreitol	kzNZK	klarzellige(s) NZK
DUC	„dead of unknown cause"; verstorben an unbekannter Ursache	LK	Lymphknoten
		M	distante Metastasierung
		m	männlich

Abkürzung	Begriff	Abkürzung	Begriff
max.	maximal(e)	RNA	Ribonukleinsäure
med.	mediastinal	ROX	5-Carboxyrhodamin
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure	RT	Zimmertemperatur
		SAPE	R-Phycoerythrin-Streptavidin
met.	metastasiert		
Mets	Metastasen	SCID	„severe combined immune deficiency“
Mon.	Monat(e)		
mRNA	„messenger RNA“	SSPE	Natriumchlorid-Natrium-dihydrogenphosphat-EDTA
MVD	„micro vessel density“; Mikrogefäßdichte		
		Tab.	Tabelle(n)
N	Lymphknotenmetastasierung	TBS	Tris-gepufferte Saline
NA	Daten nicht verfügbar	Tf	nichtmalignes Gewebe
NaCl	Natriumchlorid	TLDA(s)	„TaqMan Low Density Array(s)“
NN	Nebenniere		
n.s.	nicht signifikant	TMA(s)	„tissue microarray(s)“
NZK	Nierenzellkarzinom(e)	TNM	klinisches Tumorstadium
OS	„overall survival“ ; Gesamtüberleben	TSS	„tumor-specific survival“; tumorspezifisches Überleben
oss.	ossär	Tu	Tumorgewebe
OT	Objektträger	UISS	„University of California integrated scoring system“
P.	Perzentil		
PCR	Polymerasekettenreaktion	UKD	Universitätsklinikum Dresden
pd(N)6	„random hexamer primer“		
pos.	positiv	UTP	Uridintriphosphat
(p)T	(pathologisches) Tumorstadium	V	Veneninvasion
pulm.	pulmonal	w.	weiblich
qPCR	quantitative PCR	WV	„weighted voting“
RIN	„RNA integrity number“		

Formelzeichen	Einheit	Erklärung
A	U	Enzymaktivität in Units
c	M	Konzentration in Mol/Liter
a	x g	Beschleunigung in Vielfaches der Erdbeschleunigung
λ	nm	Wellenlänge in Nanometer
N	rpm	Drehzahl in Umdrehungen/Minute
n	-	Probenzahl
p	-	Irrtumswahrscheinlichkeit, nominal
q	-	Irrtumswahrscheinlichkeit, korrigiert
r	-	Permutationszahl
ρ	-	Spearman-Korrelationskoeffizient
T	°C	Temperatur in Grad Celsius
t	h, min	Zeit in Stunden, Minuten
V_{rel}	VE	relatives Volumen in Volumeneinheiten
l_{dsDNA}	bp	Länge doppelsträngiger DNA in Basenpaaren
l_{ssDNA}	nt	Länge einzelsträngiger DNA oder RNA in Nukleotiden

Gensymbol	**Genname [Synonym]**
ACTB	„actin, beta“
ANGPT1	„angiopoietin 1“
APOE	„apolipoprotein E“
ARNT	„aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ [*HIF1B*]
ATP11A	„ATPase, class VI, type 11A“
AXL	„AXL receptor tyrosine kinase“
BIRC5	„baculoviral IAP repeat-containing 5“ [„survivin“]
CA4/9	„carbonic anhydrase IV/IX“
CAPN6	„calpain 6“
CD34	„CD34 molecule“
CD36	„CD36 molecule (thrombospondin receptor)“
CD63	„CD63 molecule“
CD151	„CD151 molecule (Raph blood group)“
CDH1	„E-cadherin“
CENPV	„centromere protein V“
CKS2	„CDC28 protein kinase regulatory subunit 2“
COL4A2	„collagen, type IV, alpha 2“
COX2	„mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II“
CSF1	„colony stimulating factor 1“
CSRP1	„cysteine and glycine-rich protein 1“
CXCL12	„chemokine (C-X-C motif) ligand 12“
CXCR4	„chemokine (C-X-C motif) receptor 4“
DARC	„duffy blood group, chemokine receptor“
DKK3	„dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)“
EDN1/2/3	„endothelin 1/2/3“
EDNRA/B	„endothelin receptor type A/B“
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
EMCN	„endomucin“
EPAS1	„endothelial PAS domain protein 1“ [*HIF2A*]
EREG	„epiregulin“
ERG	„v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)“
FABP7	„fatty acid binding protein 7, brain“
FGF2	„fibroblast growth factor 2“
FLT1	„fms-related tyrosine kinase 1“
GAPDH	„glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase“
GAS6	„growth arrest-specific 6“
GLUT1	„glucose transporter protein 1“
GPR116	„G protein-coupled receptor 116“
GSN	„gelsolin (amyloidosis, Finnish type)“
HIF1A	„hypoxia inducible factor 1, alpha subunit“
HNMT	„histamine N-methyltransferase“
ID1/3	„inhibitor of DNA binding 1/3, dominant negative helix-loop-helix protein“
IGFBP5	„insulin-like growth factor binding protein 5“
IL1/8	„interleukin 1/8“
IL13RA2	„interleukin 13 receptor, alpha 2“

Gensymbol	**Genname [Synonym]**
IMP3	„U3 small nucleolar ribonucleoprotein“
KDR	„kinase insert domain receptor“
LAMA5	„laminin, alpha 5“
LBH	„limb bud and heart development homolog (mouse)“
LDB2	„LIM domain binding 2“
MAPK1	„mitogen-activated protein kinase 1“ [*ERK*]
MAPK14	„mitogen-activated protein kinase 14“ [*p38*]
MKI67	„antigen identified by monoclonal antibody Ki-67“ [*antigen KI-67*]
MMP1/2/9/14	„matrix metallopeptidase 1/2/9/14“
MTOR	„mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)“
NMU	„neuromedin U“
NOTCH4	„homolog 4 (Drosophila)“
OLFML2A	„olfactomedin-like 2A“
PARM1	„prostate androgen-regulated mucin-like protein 1“
PBK	„PDZ binding kinase“
PDGFA/B	„platelet derived growth factor alpha/beta“
PECAM1	„platelet/endothelial cell adhesion molecule“ [*CD31*]
PLAU	„plasminogen activator, urokinase“ [*UPA*]
PLAUR	„plasminogen activator, urokinase receptor“ [*UPAR*]
PPIA	„peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)“
PTK2	„protein tyrosine kinase 2“ [*FAK*]
PTPRB	„protein tyrosine phosphatase, receptor type, B“
PTTG1	„pituitary tumor-transforming 1“
RGS5	„regulator of G-protein signaling 5“
ROBO4	„roundabout homolog 4, magic roundabout“
SAA1/2	„serum amyloid A1/A2“
SNRK	„SNF related kinase“
SPARC	„secreted protein, acidic, cysteine-rich“ [„osteonectin“]
SPRY1/2	„sprouty homolog 1 (antagonist of FGF signaling)/2 (Drosophila)“
SYNPO2	„synaptopodin 2“
TBP	„TATA box binding protein“
TEK	„TEK tyrosine kinase, endothelial“
TGFA/B1	„transforming growth factor, alpha/beta 1“
TGFBR2	„growth factor, beta receptor II (70/80kDa)“
THBS1	„thrombospondin 1“
TIMP1/2/3	„TIMP metallopeptidase inhibitor 1/2/3“
TMEM47	„transmembrane protein 47“
TPM2	„tropomyosin 2 (beta)“
TSPAN7/9	„tetraspanin 7/9“
UCHL1	„ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)“
VCAM1	„vascular cell adhesion molecule 1“
VEGFA	„vascular endothelial growth factor A“ [*VEGFA*]
VHL	„von Hippel-Lindau tumor suppressor“
VIM	„vimentin“

Tabellenverzeichnis

1.1 Klassifikation von Nierenzellkarzinomen 7

3.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software 15
3.2 Reagenzien, Kits und Zelllinien 16
3.3 Puffer für die Immunhistochemie 17
3.4 Puffer und Lösungen für die Oligonukleotid-„Microarray“-Analysen 18
3.5 „TaqMan Gene Expression Assays“ für die quantitative PCR 19
3.6 Pipettierschema und Temperaturprogramm für die cDNA-Synthese 23
3.7 Pipettierschema und Temperaturprogramm für die cDNA-Erststrangsynthese 26
3.8 Pipettierschema und Temperaturprogramm für die Synthese des komplementären cDNA-Strangs 26
3.9 Pipettierschema und Temperaturprogramm für die *in vitro*-Transkription . . 27
3.10 Pipettierschema und Temperaturprogramm für die cRNA-Fragmentierung . . 27
3.11 Pipettierschema und Temperaturprogramm zur Herstellung des Hybridisierungsmixes 28
3.12 Wasch- und Färbeprotokoll EukGe-WS2v5 für HG-U133 Plus 2.0-„Arrays“ . 29
3.13 Sequenzspezifisches Temperaturprogramm zur Messung der „TaqMan Low Density Arrays“ 34
3.14 Pipettierschema und Temperaturprogramm für die quantitative PCR am LightCycler 480 unter Verwendung von „TaqMan Gene Expression Assays“ 36

4.1 Mittels „Microarrays“ analysierte pulmonale Nierenzellkarzinommetastasen . 44
4.2 Überrepräsentierte biologische Prozesse innerhalb der in späten *vs.* frühen Metastasen differenziell exprimierten Gene 46
4.3 6-Genmodell zur Einordnung der Metastasen mit unterschiedlich langen Manifestationszeiträumen 46
4.4 Mittels „Microarrays“ analysierte primäre Nierenzellkarzinome 48
4.5 Überrepräsentierte biologische Prozesse innerhalb der 356 in nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierten primären Nierenzellkarzinomen differenziell exprimierten Gene 51
4.6 In der vorliegenden Arbeit und in publizierten „Microarray“-Studien an Nierenzellkarziomen als metastasierungsassoziiert identifizierte Gene 52
4.7 Überrepräsentierte biologische Prozesse innerhalb der 128 in nicht metastasierten *vs.* metastasierten primären Nierenzellkarzinomen differenziell exprimierten Gene 53
4.8 5-Genmodell zur Unterscheidung nicht metastasierter und metastasierter primärer Nierenzellkarzinome 55
4.9 Korrelation der mittels „Microarrays“ und „TaqMan Low Density Arrays“ gemessenen Expressionswerte in primären Nierenzellkarzinomen und Metastasen 57

4.10 Validierung der „Microarray“-Daten mittels „TaqMan Low Density Arrays“ in Metastasen und Primärtumoren für den Vergleich späte *vs.* frühe Metastasierung 58
4.11 Korrelation der mittels „TaqMan Low Density Arrays“ quantifizierten Expression ausgewählter Gene in Metastasen bzw. primären Nierenzellkarzinomen zum rezidivfreien Überleben der Patienten 59
4.12 Validierung der „Microarray“-Daten mittels „TaqMan Low Density Arrays“ für den Vergleich nicht metastasierte *vs.* metastasierte primäre Nierenzellkarzinome 60
4.13 Expression der Gene *EDNRB* und *PECAM1* in Primärtumoren in Abhängigkeit von klinischen Parametern, der Metastasierung und dem rezidivfreien Überleben 64
4.14 Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse für das rezidivfreie und tumorspezifische Überleben unter Einbeziehung klinischer Parameter sowie der Expression von *CA4*, *EDNRB* und *PECAM1* 66
4.15 Abhängigkeit der Mikrogefäßdichte in primären Nierenzellkarzinomen von klinischen Parametern und dem rezidivfreien Überleben 71
4.16 Abhängigkeit der Anzahl TSPAN7-positiver Gefäße in primären Nierenzellkarzinomen von klinischen Parametern und dem rezidivfreien Überleben der Patienten 75
4.17 Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse für das rezidivfreie und das tumorspezifische Überleben unter Einbeziehung klinischer Parameter und der Zahl TSPAN7-gefäßpositiver Gewebestanzen 77

5.1 Ausgewählte Gene zur Validierung des Vergleichs spät *vs.* früh metastasierte primäre Nierenzellkarzinome 92
5.2 Ausgewählte Gene zur Validierung des Vergleichs nicht metastasierte *vs.* metastasierte primäre Nierenzellkarzinome 96

A.1 Mittels „Microarray“-Analysen untersuchte pulmonale Metastasen II
A.2 Mittels „Microarray“-Analysen untersuchte primäre klarzellige Nierenzellkarzinome III

Abbildungsverzeichnis

1.1 Schematische Darstellung des Metastasierungsprozesses 2
1.2 Mikroskopische Darstellung der drei am häufigsten vorkommenden histologischen Subtypen des Nierenzellkarzinoms 6
1.3 Zahl der publizierten Studien zu „Microarray“-Analysen in den Jahren 1995 bis 2009 11

3.1 Arbeitsablauf der Oligonukleotid-„Microarray“-Analysen 24
3.2 Kundenspezifische Belegung der „TaqMan Low Density Arrays“ 35

4.1 Hierarchisches Clustern spät und früh entstandener pulmonaler Metastasen . 45
4.2 Hierarchisches Clustern nicht, spät und früh metastasierter primärer Nierenzellkarzinome 49
4.3 Hierarchisches Clustern spät und früh metastasierter primärer Nierenzellkarzinome 50
4.4 Schnittmengen der zwischen später und früher Metastasierung differenziell exprimierten Gene in Metastasen und Primärtumoren des Nierenzellkarzinoms 52
4.5 Hierarchisches Clustern nicht metastasierter und metastasierter primärer Nierenzellkarzinome 54
4.6 Relative Expression ausgewählter Targetgene in nicht, spät und früh metastasierten primären Nierenzellkarzinomen sowie in spät und früh entwickelten Metastasen 62
4.7 Rezidivfreies und tumorspezifisches Überleben von Patienten mit Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der *EDNRB*-, *PECAM1*- und *CA4*-Expression ihrer Primärtumoren 65
4.8 Relative Expression von *CA4*, *DKK3*, *EDNRB*, *PECAM1* und *TIMP3* in Nierenzellkarzinomen und autologen nichtmalignen Nierengeweben 67
4.9 Immunhistochemische Färbung von PECAM1 und TSPAN7 in primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen 68
4.10 Immunhistochemische Färbung von PECAM1 und TSPAN7 in einem papillären Nierenzellkarzinom, einem Onkozytom und einem nichtmalignen Nierengewebe 69
4.11 Mikrogefäßdichte von Metastasen und primären Nierenzellkarzinomen in Abhängigkeit vom Metastasierungszustand und rezidivfreiem Überleben der Patienten 70
4.12 Anzahl TSPAN7-positiver Gefäße in Metastasen und primären Nierenzellkarzinomen in Abhängigkeit vom rezidivfreien Überleben und vom Metastasierungszustand der Patienten 74
4.13 Rezidivfreies und tumorspezifisches Überleben von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der Anzahl TSPAN7-gefäßpositiver Gewebestanzen ihrer Primärtumoren 76

5.1 Relativer Variationskoeffizient der mittels „Microarrays“ gemessenen Expressionswerte ausgewählter Gene in Abhängigkeit von der Anzahl der biologischen Replikate 81
5.2 Hierarchisches Clustern der nicht-“batch“-korrigierten Expressionsdaten der primären Nierenzellkarzinome 83
5.3 Clustern der pulmonalen Metastasen anhand der in spät *vs.* früh metastasierten primären Nierenzellkarzinomen differenziell exprimierten Gene und *vice versa* 91

1 Einleitung

Tumorleiden stellen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar [Statistisches Bundesamt, 2009]. Allein hier erkranken jährlich über 400.000 Menschen an einem bösartigen Tumor. Nur etwas mehr als die Hälfte der Patienten überlebt die ersten fünf Jahre nach der Diagnose [Batzler *et al.*, 2004]. Etwa 90 % aller durch solide Tumoren bedingten Sterbefälle werden durch die Manifestation von Metastasen hervorgerufen [Nguyen & Massague, 2007; Minn *et al.*, 2005].

1.1 Die Metastasierung von Tumoren

1.1.1 Der mehrstufige Metastasierungsprozess

Um manifeste Metastasen in einem Sekundärorgan zu bilden, müssen Tumorzellen mehrere Prozesse durchlaufen: (1) lokale Invasion — Infiltration des umliegenden Gewebes, (2) Intravasation — Eintritt der Tumorzellen in den Blutstrom, (3) Zirkulation — Überleben und Transport der disseminierten Tumorzellen im Blutstrom, (4) Extravasation — Adhäsion an die Gefäßwand, Austritt aus dem Blutstrom, Invasion in und Ansiedlung im Sekundärorgan sowie (5) progressives Wachstum der Tumorzelle zur Makrometastase (Abb. 1.1) [Nguyen *et al.*, 2009; Nguyen & Massague, 2007]. Die an diesen Prozessen beteiligten Proteine werden von Metastasierungsinitiations-, Metastasierungprogressions- und Metastasierungsvirulenzgenen kodiert (Abb. 1.1) [Nguyen *et al.*, 2009; Nguyen & Massague, 2007].

Metastasierungsinitiationsgene bedingen die für entartete Zellen charakteristischen Fähigkeiten. Dazu gehören die unbegrenzte Zellteilung, die Inhibierung der Apoptose, die Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, die Insensitivität gegenüber wachstumsinhibitorischen Signalen, die Angiogenese, das invasive Wachstum und die Umgehung der antitumoralen Immunantwort [Chiang & Massague, 2008; Hanahan & Weinberg, 2000]. Als grundlegende Eigenschaften entarteter Zellen werden sie sowohl im Primärtumor als auch in der entstehenden Metastase benötigt [Nguyen *et al.*, 2009]. Voraussetzung für invasives Wachstum der Tumorzellen ist ihre Motilität, die aus der Auflösung von Zell-Zell-Kontakten, der Modulation der Zell-Matrix-Adhäsion, der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts sowie der Degradation der extrazellulären Matrix resultiert [Chiang & Massague, 2008; Yamazaki *et al.*, 2005]. Im Fall epithelialer Tumoren spricht man hier von epithelial-mesenchymaler Transition [Christofori, 2006; Larue & Bellacosa, 2005]. Wichtige Initiatoren dieser Prozesse sind beispielsweise der Verlust des Tumorzellkontakte vermittelnden E-Cadherins (CDH1) [Chiang & Massague, 2008] oder die Überexpression von *RHOC*, dessen Protein als Rho-GTPase die Reorganisation des Zytoskeletts und damit die zelluläre Motilität begünstigt [Clark *et al.*, 2000]. Die Degradation der extrazellulären Matrix wird vor allem von Matrixmetalloproteinasen bewerkstelligt [Westermarck & Kahari, 1999]. Die Vaskularisierung eines Tumors ist Voraussetzung für eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff während seines Wachstums. Sie stellt weiterhin das „Transportmittel“ disseminierter Tumorzellen zu distanten Organen zur Verfügung [Chiang & Massague, 2008]. Eine wichtige Rolle in der Ak-

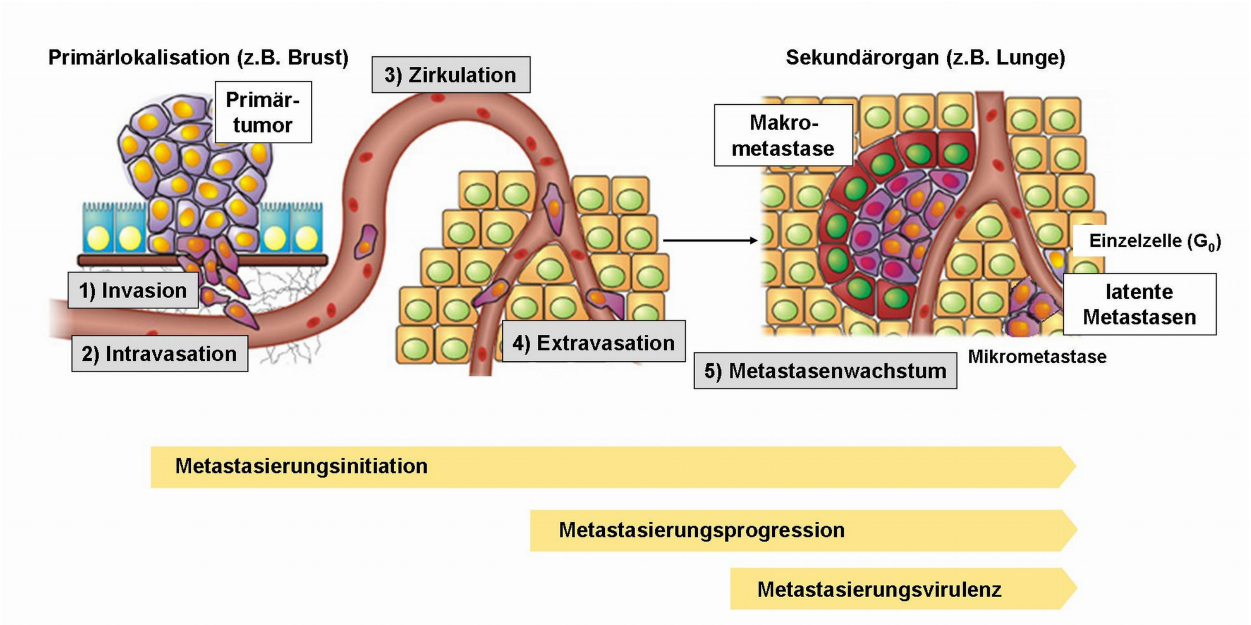


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Metastasierungsprozesses. Gezeigt sind die fünf Schritte der Metastasierung sowie die Zuordnung zu den Prozessen der Metastasierungsinitiation, -progression und -virulenz. Darüber hinaus zeigt die Grafik die beiden latenten Zustände — Zellzyklusarrest und Mikrometastase — in denen die Tumorzellen im Sekundärorgan vorliegen können, bis sie zur Makrometastase heranwachsen [modifiziert nach Hülsken, 2010 und Nguyen *et al.*, 2009].

tivierung der Angiogenese spielt von Tumor- oder Stromazellen sekretiertes VEGFA. Durch Bindung an seine Rezeptoren KDR oder FLT1 auf Endothelzellen stimuliert es deren Proliferation, Invasivität und Motilität. Die Bindung an seine Rezeptoren auf Tumorzellen bewirkt zudem eine autokrine Stimulation der Tumorzellproliferation und -invasion. VEGFA erhöht außerdem die vaskuläre Permeabilität, was Tumorzellen den Eintritt in den Blutstrom erleichtert [Hicklin & Ellis, 2005].

Zur Metastasierungsprogression werden Proteine benötigt, die das Überleben im Blutstrom, die Umgehung einer Immunantwort sowie den Austritt aus dem Blutstrom, Invasion in und Überleben im Sekundärorgan vermitteln [Nguyen *et al.*, 2009; Nguyen & Massague, 2007]. Diese Proteine spielen wahrscheinlich auch eine Rolle in der Organspezifität der Metastasierung, bei der die spezifischen strukturellen Gegebenheiten der Blutgefäße überwunden sowie die einzigartige Mikroumgebung jedes Organs toleriert werden müssen [Nguyen *et al.*, 2009; Nguyen & Massague, 2007]. Sie werden bereits im Primärtumor exprimiert. Ihre Proteine erfüllen dort allerdings meist eine andere, für das Tumorwachstum wichtige Aufgabe (z. B. Initiation der Angiogenese) [Nguyen *et al.*, 2009; Nguyen & Massague, 2007]. Für das Überleben der Tumorzellen im Blutstrom spielt das Tetraspanin CD82 eine wichtige Rolle. Es bindet an seinen Rezeptor DARC auf Endothelzellen, was die Proliferation der Tumorzellen im Blutstron inhibiert, deren Seneszenz induziert und somit die Metastasierung verhindert [Bandyopadhyay *et al.*, 2006]. Die Aggregation von Tumorzellen und Thrombozyten schützt vor physikalischem Stress und einer antitumoralen Immunantwort. Sie erleichtert zudem die Extravasation aus den Lungenkapillaren durch eine Interaktion von $\alpha_3\beta_1$-Integrin auf Thrombozyten und LAMA5 der Gefäßbasalmembran [Im *et al.*, 2004; Nieswandt *et al.*, 1999]. Die Matrixmetalloproteinasen MMP1 und MMP2 erhöhen in Kombination mit COX2

und EREG die transendotheliale Migrationsfähigkeit der Zellen. Dies begünstigt zum einen die Intravasation, zum anderen die Extravasation aus den Kapillaren von Lunge und Knochen [Gupta *et al.*, 2007a; Minn *et al.*, 2005 & 2005a]. Die Wechselwirkung des Chemokins CXCL12 und seines Rezeptors CXCR4 spielt eine wichtige Rolle in der Organspezifität der Metastasierung. Von Stromazellen sekretiertes CXCL12 bindet an CXCR4 auf Tumorzellen und bewirkt deren gerichtete Wanderung zu dem CXCL12-sekretierenden Organ [Joyce & Pollard, 2009; Pan *et al.*, 2006].

Metastasierungsvirulenzgene kodieren Proteine, die das Wachstum der im Sekundärorgan angesiedelten Tumorzellen zur Makrometastase fördern. Sie sind vor allem für die Anpassung an die jeweils spezifische Mikroumgebung des Sekundärorgans sowie die Initiation des Metastasenwachstums wichtig. Sie tragen somit wahrscheinlich auch zum Austritt aus dem latenten Zustand bei, in den Tumorzellen nach der Extravasation eintreten können [Nguyen *et al.*, 2009; Nguyen & Massague, 2007; Minn *et al.*, 2005]. Diese Gene werden vorrangig in Metastasen exprimiert. Im Primärtumor sind sie nur in einigen Zellen nachweisbar, da sie dort keinen Wachstumsvorteil bedingen [Gupta *et al.*, 2007; Minn *et al.*, 2005a]. Im Sekundärorgan vermitteln diese Metastasierungsvirulenzgene vermutlich einen Selektionsvorteil für die disseminierten Tumorzellen [Nguyen *et al.*, 2009; Chiang & Massague, 2008].

Bei jedem Schritt der Metastasierung spielt neben den Fähigkeiten der Tumorzellen selbst auch deren Wechselwirkung mit Stromazellen ihrer Mikroumgebung eine entscheidende Rolle. Dazu zählen Endothelzellen, Perizyten, Fibroblasten oder aus dem Knochenmark stammende Makrophagen oder mesenchymale Stammzellen [Joyce & Pollard, 2009]. So können beispielsweise auch Makrophagen die Angiogenese und Invasivität der Tumorzellen unterstützen, indem sie VEGFA oder Matrixmetalloproteinasen produzieren [Pollard, 2008; Condeelis & Pollard, 2006]. Solche tumorassoziierten Makrophagen werden von Tumorzellen durch die Sekretion von Chemokinen wie CSF1 angelockt. Diese binden an ihre Rezeptoren auf Makrophagen (z. B. CSF1R) und induzieren deren gerichtete Wanderung zur Chemokinquelle [Condeelis & Pollard, 2006].

1.1.2 Die Latenz von Tumorzellen

Verlassen Tumorzellen den Blutstrom und siedeln sich im Sekundärorgan an, können sie sofort zur Makrometastase heranwachsen oder in einen latenten Zustand („dormancy“) eintreten. Bei letzterem verharren die Tumorzellen entweder in einem Einzelzellstadium (G_0/G_1-Zellzyklusarrest) oder sie bilden in Folge eines Gleichgewichts zwischen Proliferation und Zelltod klinisch nicht detektierbare Mikrometastasen. Beide Formen dieser Tumorzelllatenz können nebeneinander existieren [Naumov *et al.*, 2006; Luzzi *et al.*, 1998].

Solche latenten Tumorzellen wurden beispielsweise in Autopsiestudien an Unfallopfern nachgewiesen. So wurden bei 19 % der Frauen im Alter von 20 – 54 Jahren, die nie einen makroskopisch detektierbaren Mammatumor hatten, mikroskopisch kleine Tumorherde in der Brust detektiert [Black & Welch, 1993; Nielsen *et al.*, 1987]. In Tumorpatienten äußert sich die Latenz der Tumorzellen in einem langen Zeitraum zwischen der Diagnose des Primärtumors und der Entwicklung manifester Metastasen. Klinisch wird dieser Zeitraum als rezidivfreies Überleben („disease-free survival“, DFS) bezeichnet. Die Länge dieser Latenzphase variiert zwischen verschiedenen Tumorentitäten, aber auch innerhalb ein und derselben

Entität und kann bis zu Jahren oder gar Jahrzehnten betragen [Wittke *et al.*, 1999; Karrison *et al.*, 1999]. Nierenzellkarzinompatienten können beispielsweise bereits initial, also zur Diagnose des Primärtumors, Metastasen besitzen oder erst Jahre nach der Entfernung des Primärtumors manifeste Metastasen entwickeln [Patel *et al.*, 2009; Motzer *et al.*, 1996].

Als **Ursachen der Latenz** werden eine inhibierte Proliferation der Tumorzellen [Goodison *et al.*, 2003], die Unfähigkeit zur Angiogenese [Almog *et al.*, 2006] und eine effektive, eventuell T-Zell-vermittelte Immunantwort diskutiert [Mahnke *et al.*, 2005; Schirrmacher, 2001]. Außerdem wird vermutet, dass sich latente Tumorzellen, ähnlich wie beispielsweise hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark, in einer sog. prämetastatischen Nische ansiedeln. Diese begünstigt zwar das Überleben der Zellen, unterdrückt allerdings ihre ungehinderte Proliferation [Kaplan *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003]. Eine weitere Parallele zu Stammzellen stellt die Fähigkeit der latenten Tumorzellen dar, nach einer langen Latenzphase ihr Wachstum zu reinitiieren. Somit könnten diese Zellen auch sog. Tumorstammzellen darstellen [Nguyen *et al.*, 2009; Chiang & Massague, 2008].

Um ein Tumorwachstum zu initiieren, müssen sich entweder die latenten Tumorzellen an die neuen Bedingungen anpassen oder Veränderungen in der Mikroumgebung auftreten. Bisher sind nur einige wenige Proteine bekannt, die den Austritt aus der Tumorzelllatenz bewirken können. Die Transkriptionsinhibitoren ID1 und ID3 beispielsweise vermitteln die Reinitiierung des Zellzyklus und induzieren somit das Wachstum von im Sekundärorgan angesiedelten Tumorzellen zur Makrometastase [Gupta *et al.*, 2007]. Auch das Plasminogen-Aktivator (PLAU/PLAUR)-System, dessen angiogene, zellmotilitätsfördernde und mitogene Wirkung bereits seit einigen Jahren bekannt ist [McMahon & Kwaan, 2008], könnte eine Rolle in der Tumorzelllatenz spielen. Die Interaktion von PLAUR mit $\alpha_5\beta_1$-Integrin auf Tumorzellen aktiviert die proliferationsfördernde MAPK1 und inhibiert die wachstumsinhibitorische MAPK14. Ein hohes MAPK1/MAPK14-Verhältnis verhindert die Tumorzelllatenz, während ein geringes Verhältnis eine Latenz induziert [Aguirre-Ghiso *et al.*, 2003, 2001 & 1999]. Veränderungen der Mikroumgebung können beispielsweise durch Entzündungs- oder Alterungsprozesse bedingt sein. Seneszente Fibroblasten sekretieren inflammatorische Zytokine wie IL1, die sowohl die Proliferation von Tumorzellen als auch Angiogenese induzieren können [Krtolica *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 1992]. Dies stellt zudem eine interessante Verbindung zwischen Alter, entzündlichen Prozessen und Tumorbiologie dar [Joyce & Pollard, 2009].

Die Unfähigkeit zur Angiogenese wird vor allem als Ursache für latente Mikrometastasen angesehen. Diese nicht vaskularisierten Tumorherde können maximal bis zu einem Durchmesser von 1 – 2 mm heranwachsen, der die Grenze für eine Versorgung durch Diffusion darstellt [Almog *et al.*, 2006; Naumov *et al.*, 2006]. Bei der spontanen Induktion der Angiogenese in Mikrometastasen („angiogenic switch“) spielt vermutlich die Freisetzung proangiogener Faktoren wie VEGFA von Tumor- und Stromazellen sowie die Hemmung antiangiogener Faktoren wie THBS1 eine Rolle [Kienast *et al.*, 2010; Almog *et al.*, 2009 & 2006; Joyce & Pollard, 2009; Lin *et al.*, 2006].

Alle beschriebenen Einflüsse setzen eine Veränderung der Tumor- bzw. Stromazellen voraus, um eine Anpassung an die neuen Bedingungen im Sekundärorgan zu erreichen. Allerdings treten bereits im Primärtumor Expressionsveränderungen auf, die mit dem DFS der

Patienten und somit der Länge der Latenzphase assoziiert sind [Hoffmann *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2003; van't Veer *et al.*, 2002]. Obwohl der komplexe Prozess der Metastasierung insgesamt sehr ineffizient ist — in Mausmodellen bilden nur etwa 0,02 % der in den Blutstrom injizierten Tumorzellen manifeste Metastasen [Luzzi *et al.*, 1998] — scheinen also bereits initial tumorintrinsische Metastasierungsprogressions- und -virulenzgene exprimiert zu werden. Diese könnten die Anpassung an eine neue Umgebung und das Wachstum in dieser begünstigen und somit die Länge der Latenzphase beeinflussen.

1.2 Das Nierenzellkarzinom

1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Diagnose

Nierenzellkarzinome (NZK) sind maligne epitheliale Tumoren, die aus den proximalen Tubuluszellen der Niere hervorgehen [Uzzo *et al.*, 2000]. Sie umfassen etwa 85 % aller bösartigen Neubildungen der Niere, des Nierenbeckens und der ableitenden Harnwege [Batzler *et al.*, 2004; Uzzo *et al.*, 2000]. NZK machen etwa 3 – 4 % aller humanen malignen Tumoren aus und bilden nach Prostata- und Harnblasenkarzinomen die dritthäufigste urologische Tumorentität [Jemal *et al.*, 2009, Batzler *et al.*, 2004]. Die höchste Inzidenz des NZK wird in den westlichen Ländern beobachtet, wobei der Alterspeak zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr liegt [Ljungberg *et al.*, 2009; Batzler *et al.*, 2004]. In Deutschland erkranken jährlich etwa 17.000 Menschen an einem NZK, wobei Männer etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen [Batzler *et al.*, 2004]. Die Inzidenz dieses Tumors steigt jährlich welt- und auch europaweit um etwa 2 %. Die Ursache dieser steigenden Inzidenz wird in der frühzeitigen Diagnose durch den vermehrten Einsatz bildgebender Verfahren gesehen [Muscat, 2000]. Als Risikofaktoren für das NZK werden Rauchen, Alkoholkonsum, Übergewicht und Hypertonie diskutiert [Muscat, 2000].

Heute werden durch den verstärkten Einsatz von Ultraschall und Computertomografie mehr als die Hälfte aller NZK als Zufallsbefund im noch beschwerdefreien Zustand diagnostiziert. Tritt die typische Symptomtrias aus Hämaturie, Flankenschmerz und Tastbarkeit des abdominalen Tumors auf oder wird der Tumor in Folge der von Metastasen verursachten Schmerzen diagnostiziert, ist die Krankheit für eine Heilung meist schon zu weit fortgeschritten [Ljungberg *et al.*, 2009; Slaton & Swanson, 2000].

1.2.2 Klassifikation

Das NZK wird basierend auf seinen morphologischen Eigenschaften in drei wesentliche Subtypen unterteilt, von welchen das klarzellige NZK (kzNZK) am häufigsten auftritt (75 – 90 %), gefolgt vom papillären (chromophilen; 10 – 15 %) und chromophoben NZK (4 – 5 %, Abb. 1.2) [Ljungberg *et al.*, 2009; Lopez-Beltran *et al.*, 2006]. Daneben existieren weitere seltene Formen wie das Ductus-Bellini-Karzinom sowie nicht klassifizierbare Typen (z. B. rein sarkomatoide Tumoren) [Lopez-Beltran *et al.*, 2006].

Des weiteren klassifiziert man NZK nach ihrer lokalen Ausdehnung (T), dem Tumorbefall regionaler Lymphknoten (N) sowie dem Auftreten distanter Metastasen (M) und fasst diese

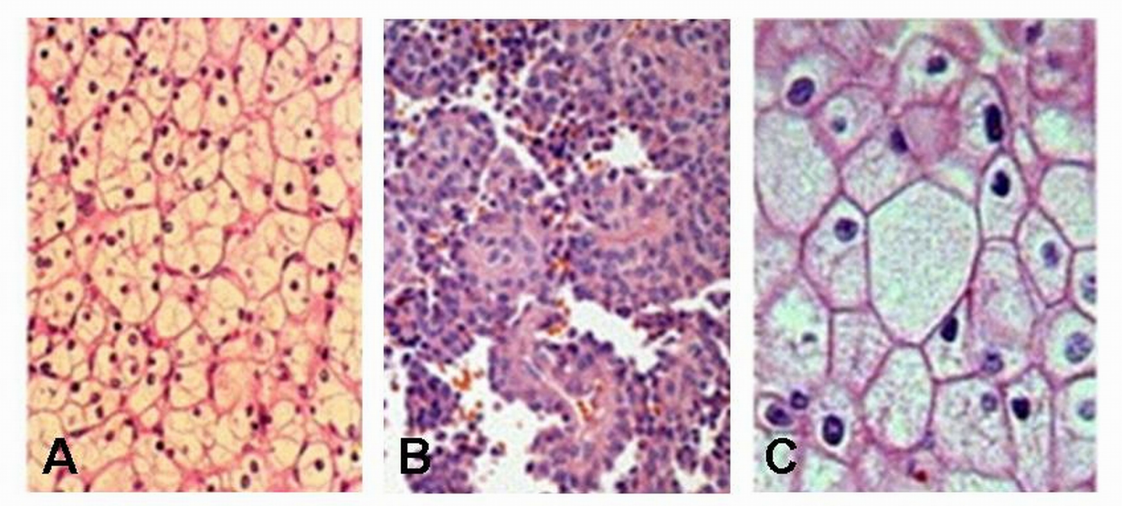


Abb. 1.2: Mikroskopische Darstellung der drei am häufigsten vorkommenden histologischen Subtypen des Nierenzellkarzinoms. A klarzelliges NZK (klares, teils auch eosinophiles Zytoplasma; fein verzweigte Gefäßstruktur), **B** papilläres NZK (basophiles oder eosinophiles Zytoplasma; deutlich kleinere Zellen als klarzelliges NZK) und **C** chromophobes NZK (blasses oder eosinophiles, granuläres Zytoplasma; Zellen unterschiedlicher Größe) [modifiziert nach Lopez-Beltran *et al.*, 2006]. (NZK = Nierenzellkarzinom)

prognostisch relevanten Parameter außerdem zum klinischen (TNM-)Stadium zusammen (Tab. 1.1) [Ljungberg *et al.*, 2009].

Zusätzlich werden die morphologischen Veränderungen der Zellkerne nach den Kriterien von Thoenes *et al.* [1986] erfasst. Tumorzellen mit einem nukleären Grad 1 sind gut differenziert (regelmäßige, runde, nicht vergrößerte Zellkerne), mit einem Grad 2 mäßg differenziert (mäßige Unterschiede in Größe und Form im Vergleich zu normalen Tubuluskernen) und mit Grad 3 schlecht bis undifferenziert (stark vergrößerte, polymorphe und hyperchrome Kerne) [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 1998].

1.2.3 Therapie und Prognose

Solange der Tumor auf die Niere begrenzt ist und noch keine manifesten Metastasen gebildet hat, ist eine kurative Behandlung durch Entfernung der tumortragenden Niere (Nephrektomie) möglich. Sofern der Tumor klein ist, wird dabei meist der gesunde Teil der Niere erhalten (Teilnephrektomie) [Ljungberg *et al.*, 2009].

Zum Zeitpunkt der Primärtumordiagnose weisen 10 – 20 % der Patienten bereits Metastasen auf [Patel *et al.*, 2009]; 20 – 30 % der Patienten entwickeln Metastasen oder ein Lokalrezidiv im weiteren Krankheitsverlauf [Motzer *et al.*, 1996]. Der bevorzugte Metastasierungsort des NZK ist die Lunge (50 % der Patienten), gefolgt von den Lymphknoten (35 %), der Leber und den Knochen (je 30 %), dem Gehirn (5 %), den Nebennieren (5 %) und der kontralateralen Niere (1 – 2 %) [Slaton & Swanson, 2000].

In der Regel werden auch Patienten mit initial metastasiertem Tumor zunächst nephrektomiert, um die Tumorlast des Patienten zu verringern. Im metastasierten Stadium ist eine kurative Behandlung allerdings nahezu ausschließlich durch eine operative Entfernung der Metastasen möglich. Diese setzt jedoch eine begrenzte Zahl und günstige Lokalisation der Metastasen sowie einen guten Allgemeinzustand des Patienten voraus [Ljungberg *et al.*,

Tab. 1.1: Klassifikation von Nierenzellkarzinomen nach lokaler Ausdehnung des Primärtumors (T), regionalem Lymphknotenbefall (N) und Auftreten von distanten Metastasen (M) sowie Einteilung in klinische (TNM-)Stadien nach den Kriterien der UICC („Union internationale contre le cancer“) aus dem Jahr 2002 [Ljungberg *et al.*, 2009]. In der Regel werden diese Daten mit einem „p“ (pathologisch) oder „c“ (klinisch) versehen, um zu verdeutlichen, ob die Daten am entnommenen Präparat von einem Pathologen beurteilt oder mittels bildgebender Verfahren erhalten wurden. N1 und N2 werden als N+ zusammengefasst. Seit Anfang 2010 sind neue Kriterien gültig, in denen die pT2-Tumoren in zwei Subgruppen unterteilt werden und die Klassifikation der pT3-Tumoren revidiert wurde. Die Gewebeproben in der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nach den Kriterien von 2002 beurteilt.

T – Primärtumor			
Tx	nicht beurteilbar		
T0	kein Anhalt für Primärtumor		
T1a/T1b	Tumor begrenzt auf Niere; größte Tumorausdehnung $\leq$ 7 cm;		
	größte Tumorausdehnung $\leq$ 4 cm (T1a) bzw. $>$ 4 cm (T1b)		
T2	Tumor begrenzt auf Niere; größte Tumorausdehnung $>$ 7 cm		
T3a/T3b/T3c	Infiltration des perirenalen Fettgewebes und/oder der Nebenniere (T3a),		
	der Nierenvene oder *Vena cava* unterhalb des Zwerchfells (T3b) bzw.		
	der *Vena cava* oder ihrer Wand oberhalb des Zwerchfells (T3c)		
T4	Tumorausdehnung über Gerota-Faszie hinaus		
N – regionäre Lymphknoten			
Nx	nicht beurteilbar		
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen		
N1	Metastasen in einem regionären Lymphknoten		
N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten		
M – distante Metastasen			
Mx	nicht beurteilbar		
M0	keine distanten Metastasen		
M1	distante Metastasen		
TNM – klinisches Stadium			
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
IV	T4	N0, N1	M0
	jedes T	N2	M0
	jedes T	jedes N	M1

2009]. Daher erfolgt oft eine systemische Behandlung der Metastasen. Da NZK weitestgehend chemo- und radioresistent sind, waren viele Jahre lang die Immun- (Interferon-α, Interleukin-2) bzw. die Immunchemotherapie (+ 5-Fluoruracil) die einzigen verfügbaren Behandlungsoptionen [Patel *et al.*, 2009]. Hier beobachtete man ein gutes Ansprechen bei einem relativ geringen Anteil der Patienten (in Abhängigkeit von der Studie 0 – 29 % für Immun- bzw. 2 – 39 % für Immunchemotherapie), gelegentlich sogar Komplettremissionen der Tumorherde ($\leq$ 11 %) [van Spronsen *et al.*, 2005; Motzer & Berg, 2000; Olencki & Bukowski, 2000].

Seit 2006 wurden die immuntherapeutischen Behandlungsregimes durch neue, zielgerichtete Wirkstoffe weitestgehend abgelöst. Diese sollen durch den Angriff spezifischer molekularer Targets, wie MTOR, VEGF oder Rezeptortyrosinkinasen, vorrangig die Angiogenese in den Tumorherden hemmen und somit deren weiteres Wachstum verhindern bzw. ihr Schrumpfen bewirken [Patel *et al.*, 2009; van Spronsen *et al.*, 2005]. In der Erstlinientherapie des metastasierten NZK wird der Multi-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib eingesetzt. In der Zulassungsstudie bewirkte dieser eine signifikante Verlängerung des DFS um 6 Monate (11 *vs.* 5 Monate) [Motzer *et al.*, 2007] und des Gesamtüberlebens („overall survival“, OS) um 4 Monate (26 *vs.* 22 Monate) gegenüber Interferon-α [Motzer *et al.*, 2009], wobei auch deutlich mehr Patienten ein Ansprechen gegenüber Sunitinib zeigten (47 *vs.* 12 %) [Motzer *et al.*, 2009]. Allerdings sind bisher bei keinem der neuen Wirkstoffe Komplettremissionen beobachtet worden. Das Potenzial dieser Wirkstoffe liegt somit in einer Langzeitstabilisierung der Erkrankung [Ljungberg *et al.*, 2009]. Momentan wird in klinischen Phase III-Studien geprüft, ob die adjuvante Gabe dieser Wirkstoffe (u. a. Sunitinib, S-TRAC-Studie) das DFS von Hochrisikopatienten ohne bisherige Metastasierung verlängern kann [US National Institutes of Health, 2010].

Aufgrund seiner hohen Metastasierungsrate stellt das NZK den urologischen Tumor mit der höchsten Mortalitätsrate dar. Nur etwa 60 % der Patienten überleben die ersten fünf Jahre nach Nephrektomie. Die 5-Jahresüberlebensrate von Patienten mit metastasiertem NZK beträgt lediglich 11 – 20 % [Patel *et al.*, 2009]. Allein in der BRD versterben jährlich etwa 6.100 Patienten an einem NZK. Unter allen Tumoren stellt das NZK die sechsthäufigste Todesursache bei Männern und die elfthäufigste bei Frauen dar [Batzler *et al.*, 2004].

Die Abschätzung des Krankheitsverlaufs von NZK-Patienten erfolgt routinemäßig anhand verschiedener histologischer und klinischer Parameter. Ungünstige prognostische Faktoren sind u. a. ein großer Tumordurchmesser, ein hohes Tumorstadium, ein hoher Tumorgrad, eine Veneninvasion, das Vorhandensein initialer Lymphknoten- oder Fernmetastasen, das Auftreten nekrotischer Tumorareale sowie ein schlechter Allgemeinzustand des Patienten [Ljungberg *et al.*, 2009]. Beispielsweise liegt die tumorspezifische 5-Jahresüberlebensrate für Patienten mit organbegrenzten Tumoren zwischen 97 % (pT1a) und 71 % (pT2), für Patienten mit organüberschreitenden Tumoren deutlich geringer zwischen 53 % für pT3a- und nur 20 % für pT4-Tumoren [Frank *et al.*, 2005]. Patienten mit einem klinischen Tumorstadium IV, also einer maximalen lokalen Tumorausdehnung bzw. mit Fernmetastasen, haben eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 11 % gegenüber 93 % für Patienten mit einem klinischen Stadium I [Gudbjartsson *et al.*, 2005]. Weiterhin überleben 87 % der Patienten mit einem G1-Tumor die ersten fünf Jahre nach Nephrektomie, während die

5-Jahresüberlebensrate von Patienten mit G4-Tumoren nur 14 % beträgt (Gradierungssystem nach Fuhrman) [Gudbjartsson *et al.*, 2005; Fuhrman *et al.*, 1982]. kzNZK weisen eine schlechtere Prognose auf als papilläre und chromophobe NZK, wobei dieser Unterschied nach Adjustierung auf TNM-Stadium, Tumorgrad und Allgemeinzustand {ECOG („Eastern Cooperative Oncology Group")-Wert} nicht mehr signifikant ist [Gudbjartsson *et al.*, 2005; Patard *et al.*, 2005].

Die verschiedenen unabhängigen prognostischen Faktoren wurden in Form von Nomogrammen kombiniert. Anhand dieser kann die Rezidivwahrscheinlichkeit {z. B. SSIGN („stage size grade necrosis")-Wert} [Leibovich *et al.*, 2003] oder das Sterberisiko {z. B. UISS („University of California integrated scoring system")} [Zisman *et al.*, 2001] von Patienten mit kzNZK innerhalb definierter Zeiträume nach Nephrektomie abgeschätzt werden. Als „prognostisch unabhängig" werden Faktoren bezeichnet, wenn sie zusätzlich zu den anderen (klinischen) Parametern einen Einfluss auf den untersuchten Überlebensparameter ausüben.

Ein großes Manko besteht bei allen Prognosemodellen darin, dass sie auf dem TNM-System beruhen. Dieses scheint aber nur unzureichend geeignet, um den Langzeitverlauf der Erkrankung abzuschätzen. So können hier maximale Konkordanzindizes von 59 – 81 % erreicht werden [Cindolo *et al.*, 2005]. Der Konkordanzindex ist die Wahrscheinlichkeit, dass der vorhergesagte mit dem beobachteten Krankheitsverlauf übereinstimmt. Ein Grund hierfür ist beispielsweise die gemeinsame Klassifikation von Tumoren, die die Nebennieren infiltrieren und solchen, die das perirenale Fettgewebe infiltrieren (pT3a), obwohl erstere eine schlechtere Prognose besitzen (mediane Überlebensrate 12,5 *vs.* 36 Monate) [Ljungberg *et al.*, 2009, Han *et al.*, 2003]. Außerdem entwickeln auch 20 – 40 % der Patienten mit kleinen, organbegrenzten Tumoren (pT1/2) Metastasen, was anhand des TNM-Systems nicht vorhergesagt werden kann [Eichelberg *et al.*, 2008]. Auch die seit Anfang 2010 geltenden, revidierten TNM-Kriterien verbessern die prognostische Aussage des TNM-Systems nicht [Roscigno *et al.*, 2010].

1.2.4 Genetische Aberrationen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Sowohl das Von-Hippel-Lindau-Syndrom als vorrangige erbliche Form des kzNZK als auch seine somatische Variante weisen häufig Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 3 auf. Das in diesem Bereich lokalisierte Von-Hippel-Lindau (*VHL*)-Gen (3p25-26) gilt heute als wichtigstes Tumorsuppressorgen und als eine molekulare Ursache dieser Tumorentität [Kim & Kaelin, 2004; Enquist *et al.*, 2000]. Entsprechend der „two hits"-Theorie der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen [Hanahan & Weinberg, 2000] zeigen 86 % der kzNZK eine Aberration beider Allele (Heterozygotieverlust und Mutation/Hypermethylierung) [Young *et al.*, 2009].

VHL besitzt eine entscheidende Funktion in der Reaktion der Zelle auf Hypoxie. Als Bestandteil eines E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes ubiquitinyliert es bei Normoxie die hydroxylierte Form von HIF1A und EPAS1 und markiert diese damit für den Abbau durch das Proteasomsystem. Bei Hypoxie liegen diese Proteine dehydroxyliert vor, werden somit nicht mehr von VHL erkannt, akkumulieren in der Zelle und bilden mit ihrem Partner ARNT heterodimere Transkriptionsfaktorkomplexe [Patel *et al.*, 2006]. Um eine Sauerstoffversor-

gung der Zellen im hypoxischen Areal sicherzustellen, induzieren diese die Transkription von Genen, deren Proteine angiogenese- und wachstumsfördernde Funktionen besitzen (z. B. *VEGFA*, *EGFR*, *CXCR4*, *CA9*) [Patel *et al.*, 2006; Grabmaier *et al.*, 2004; Staller *et al.*, 2003]. Ist VHL wie im kzNZK inaktiviert, werden HIF1A und EPAS1 auch bei Normoxie nicht abgebaut. Somit wird einerseits stetig die Bildung neuer Gefäße stimuliert, andererseits werden die Tumorzellen selbst zu unkontrolliertem Wachstum angeregt [Bratslavsky *et al.*, 2007]. Infolge dessen sind kzNZK sehr stark vaskularisiert. Daneben spielt VHL auch eine Rolle in der Reorganisation des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix, so dass seine Inaktivierung die Invasivität und Metastasierung der Tumorzellen begünstigen kann [Kim & Kaelin, 2004].

Neben einem 3p-Verlust treten im kzNZK Verluste der Chromosomenarme 4q, 6q, 8p, 9p und 14q sowie Zugewinne von 5q, 7p und 16q auf [Junker *et al.*, 2003; Wilhelm *et al.*, 2002; Gunawan *et al.*, 2001; Bissig *et al.*, 1999]. Weiterhin wurden Mikrodeletionen auf dem langen Arm von Chromosom 6 identifiziert [Toma *et al.*, 2008]. Zugewinne von 5q sind mit einem längeren OS [Gunawan *et al.*, 2001], Heterozygotieverluste von 8p mit einem kürzeren DFS der Patienten assoziiert [Presti *et al.*, 2002].

1.2.5 Biomarker des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Bisher wurden nur wenige molekulare Faktoren identifiziert, die als unabhängige Marker zur Prognoseabschätzung von kzNZK-Patienten geeignet erscheinen. Das Transmembranprotein **CA9**, dessen Transkription durch HIF1A aktiviert wird, kann spezifisch in etwa 90 % der kzNZK nachgewiesen werden, während nichtmaligne Nierengewebe meist CA9-negativ sind [Sandlund *et al.*, 2007b; Bui *et al.*, 2003]. Ein hoher Anteil CA9-positiver Tumorzellen im Primärtumor ist ein unabhängiger prognostischer Faktor für ein längeres tumorspezifisches Überleben („tumor-specific survival“, TSS) von kzNZK-Patienten [Sandlund *et al.*, 2007b; Bui *et al.*, 2004; Bui *et al.*, 2003].

Ein hoher Anteil von Tumorzellen im Primärtumor, die den Proliferationsmarker **MKI67** produzieren, stellt einen unabhängigen prognostischen Marker für ein kürzeres OS dar [Bui *et al.*, 2004; Kramer *et al.*, 2005]. In Kombination mit CA9 war es in einer multivariaten Analysen sogar dem Tumorgrad überlegen [Bui *et al.*, 2004].

Weiterhin wurden eine hohe **BIRC5**-Proteinmenge [Byun *et al.*, 2007; Parker *et al.*, 2006], eine hohe ***MMP9***-Expression [Cho *et al.*, 2003] sowie die Präsenz des Transkriptionsfaktors **IMP3** [Hoffmann *et al.*, 2008] bzw. des mesenchymalen Markers **VIM** [Moch *et al.*, 1999] als unabhängige prognostische Marker für ein verkürztes DFS (BIRC5, *MMP9*, IMP3), TSS (BIRC5) und OS (IMP3, VIM) beschrieben.

Bisher wird keiner dieser Marker in die routinemäßige Prognoseabschätzung von kzNZK-Patienten einbezogen. Grund hierfür ist vor allem, dass zu jedem Marker nur wenige unabhängige Studien existieren, deren Ergebnisse sich zum Teil widersprechen [Eichelberg *et al.*, 2009]. Allerdings zeigten Kim *et al.* [2004] an 318 kzNZK, dass die Einbeziehung der molekularen Faktoren TP53, CA9 und VIM die Vorhersagekraft des UISS-Systems bezüglich des OS der Patienten verbessert (Konkordanzindex 0,79 *vs.* 0,75).

1.3 „Microarray“-Analysen zur Identifikation prognostisch relevanter molekularer Faktoren

„Microarray“ sind molekularbiologische Testverfahren, die in Form einer miniaturisierten Anordnung die simultane Durchführung mehrerer tausend Einzelnachweise erlauben [Zabel, 2001]. Die bekannteste Anwendung dieser Technologie ist die Expressionsmessung, aber auch die genomweite, hochauflösende Untersuchung von Einzelnukleotidpolymorphismen und DNA-Kopienzahlen sowie die Proteinanalytik sind heute wichtige Anwendungsgebiete.

Im Fall von Oligonukleotid-„Microarrays“ sind Oligonukleotidmoleküle (je nach „Array“-Plattform 15 – 70 nt lang) bekannter Sequenz als Sonden in einem geordneten Raster auf einem Glasträger immobilisiert [McLachlan *et al.*, 2004]. Für Expressionsmessungen sind diese komplementär zu dem jeweils zu detektierenden Gentranskript. Die komplementären Transkriptsequenzen der zugegebenen markierten Probe hybridisieren spezifisch mit diesen Sonden. Die Position des erhaltenen Signals auf dem „Array“ ermöglicht eine Aussage über die Identität des entsprechenden Transkripts, die Signalstärke über seine Expressionshöhe in der untersuchten Probe [McLachlan *et al.*, 2004].

Seit der Entwicklung einer geeigneten Technologie zur Herstellung von „Microarrays“ Mitte der 90er Jahre [Schena *et al.*, 1995] hat sich die Verwendung von „Array“-Plattformen in der Forschung etabliert. Eindrucksvoll verdeutlicht wird dies durch die steigende Zahl der hierzu publizierten Studien (Abb. 1.3 A). Auch im Bereich der onkologischen Forschung werden „Microarrays“ zunehmend eingesetzt (Abb. 1.3 B). Hier besteht der Nutzen zum einen darin, neue molekulare Faktoren zu identifizieren, die für die Diagnose, als Therapietargets oder als prognostische Marker verwendet werden können. Zum anderen ermöglicht die „Microarray“-Technologie die Identifikation sog. Gensignaturen, einer Kombination einer Vielzahl von Genen, die in ihrer Gesamtheit eine Aussage über den Krankheitsverlauf des Patienten erlauben. Gerade im Bereich der multifaktoriell bedingten Tumorerkrankungen und der immer stärker in den Vordergrund rückenden „personalisierten Medizin“ erlangen solche Signaturen große Bedeutung [Niederacher, 2004; Ramaswamy & Golub, 2002].

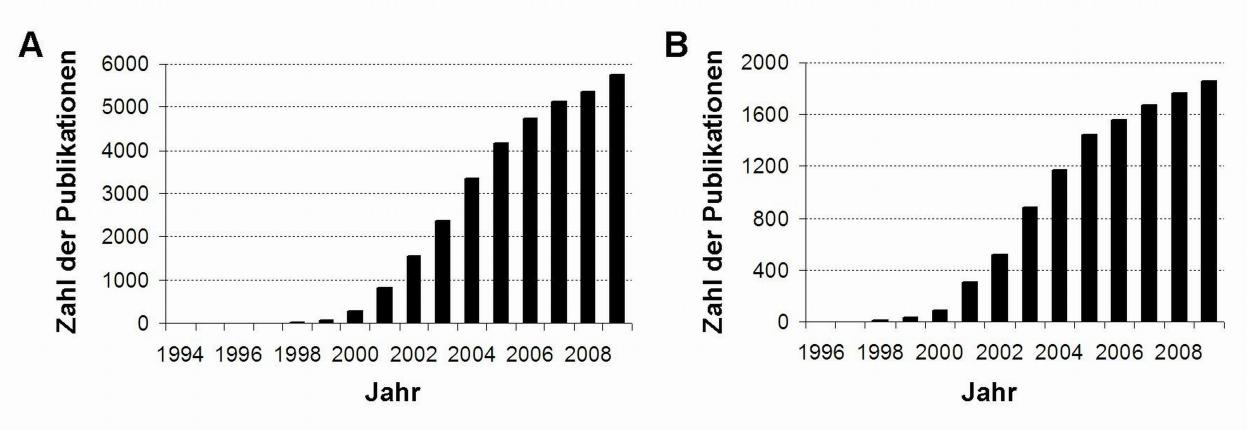


Abb. 1.3: Zahl der publizierten Studien zu (A) „Microarray“-Analysen und (B) „Microarray“-Analysen in der Tumorforschung in den Jahren 1995 bis 2009. Die Daten wurden mit der Statistik-Anwendung der Internet-Plattform GoPubmed anhand der Suche nach „microarrays“ bzw. „microarrays AND cancer“ erhoben [Doms & Schroeder, 2005].

Auf dem Gebiet der NZK-Forschung wurden mittels „Microarray“-Analysen bisher vorwiegend Gene oder Signaturen identifiziert, die tumorhaltige und nichtmaligne Nierengewebe differenzieren [Boer *et al.*, 2001; Lenburg *et al.*, 2003] bzw. sich in den verschiedenen histologischen Subtypen des NZK unterscheiden [Higgins *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2003]. Außerdem erlauben die Expressionsmuster primärer NZK bereits eine prognostische Aussage hinsichtlich einer Metastasierung oder des Überlebens der Patienten. Kosari *et al.* [2005], Vasselli *et al.* [2003] und Takahashi *et al.* [2001] identifizierten Expressionssignaturen, die aggressive von nicht aggressiven NZK unterscheiden. Aggressive NZK waren dabei z. B. durch eine Metastasierung oder das Versterben des Patienten innerhalb von vier Jahren nach Nephrektomie definiert [Kosari *et al.*, 2005]. Sültmann *et al.* [2005] identifizierten Expressionsmuster in Primärtumoren, die mit dem Vorhandensein von Metastasen zum Nephrektomiezeitpunkt assoziiert sind und zeigten deren Korrelation zu genetischen Aberrationen. Yao *et al.* [2008] fanden Gene, die mit dem Überleben von kzNZK-Patienten assoziiert sind, wovon sie drei als unabhängige prognostische Marker an einem großen Patientenkollektiv bestätigen konnten (*EDNRB*, *RGS5*, *VCAM1*). Trotz dieser viel versprechenden publizierten Daten werden bisher keine molekularen Faktoren in die Prognoseabschätzung von NZK-Patienten einbezogen. Dies liegt wahrscheinlich in den relativ inkonsistenten Ergebnissen der verschiedenen Studien begründet. Dennoch zeigen diese Studien, dass „Microarray“-Analysen an NZK sowohl zur Identifikation prognostisch relevanter Gensignaturen als auch einzelner prognostischer Marker geeignet sind und verdeutlichen ihr Potenzial hinsichtlich einer individuellen Prognoseabschätzung für NZK-Patienten.

Für das Mammakarzinom ist ein „Microarray“-basierter prognostischer *in vitro*-Test bereits kommerziell verfügbar. Dieser MammaPrint-Test wurde im Februar 2007 als solcher von der FDA („Food and Drug Administration“, USA) zugelassen und umfasst die Expressionsmessung von 70 an der Proliferation beteiligten Genen. Er erlaubt eine — im Vergleich zu klinischen Parametern verbesserte — Aussage hinsichtlich des Rezidivrisikos von Brustkrebspatientinnen [Simon, 2007; Buyse *et al.*, 2006; van de Vijver *et al.*, 2002; van't Veer *et al.*, 2002]. Niedrigrisikopatientinnen kann basierend auf seinem Ergebnis eine nebenwirkungsreiche adjuvante Chemotherapie erspart werden [van de Vijver *et al.*, 2002]. Somit stellt dieser Test einen ersten Schritt in der routinemäßigen Anwendung genetischer Signaturen in der individuellen Prognoseabschätzung von Tumorpatienten dar.

2 Zielstellung

Die molekularen Ursachen des Metastasierungsprozesses und insbesondere der Tumorzelllatenz im Sekundärorgan, die das krankheitsfreie Überleben (DFS) der Patienten bedingt, sind bisher weitestgehend unbekannt. Insbesondere für Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom (kzNZK) ist die Klärung dieser molekularen Prozesse entscheidend für eine optimale medizinische Versorgung. Etwa die Hälfte der kzNZK-Patienten entwickelt initial oder im Verlauf der Erkrankung manifeste Metastasen, so dass diese Tumorentität eine sehr hohe Sterblichkeit bedingt. Zudem gestaltet sich der Krankheitsverlauf der Patienten aufgrund verschieden langer DFS sehr unterschiedlich. Für ein optimales Nachbeobachtungs- und Therapieregime jedes einzelnen Patienten ist eine genaue und individuelle Vorhersage des Metastasierungsrisikos und des DFS unerlässlich. Allerdings sind für das kzNZK bisher keine geeigneten molekularen Faktoren zur routinemäßigen Abschätzung des Krankheitsverlaufs bekannt, die das unzureichende prognostische Potenzial der bisher genutzten klinischen Parameter verbessern könnten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit Hilfe genomweiter Expressionsanalysen Gene oder Gensignaturen zu identifizieren, die zum einen die Abschätzung der Dauer der Tumorzelllatenzphase im Sekundärorgan und somit des DFS von kzNZK-Patienten erlauben. Zum anderen sollten diese Gene Tumoren, die im Verlauf der Erkrankung manifeste Metastasen bedingen von solchen differenzieren, die keine manifesten Metastasen entwickeln. Die bisher publizierten „Microarray“-Studien bezogen nahezu ausschließlich Primärtumoren des kzNZK ein und lieferten keine konsistenten Ergebnisse hinsichtlich für eine Prognoseabschätzung geeigneter Gene. In der vorliegenden Arbeit sollte daher durch die Untersuchung von Metastasen ein neuer Ansatz zur Identifikation DFS-assoziierter Gene verfolgt werden. Zunächst sollten Gene identifiziert werden, die in spät *vs.* früh entstandenen kzNZK-Metastasen differenziell exprimiert sind. Da diese Metastasen den zu prognostizierenden Phänotyp charakterisieren, könnten die identifizierten Gene funktionell am Wachstum der Tumorzellen zur Makrome-tastase und möglicherweise auch an der Dauer ihrer Latenzphase beteiligt sein. Anschließend sollten durch den Vergleich primärer kzNZK mit verschiedenen DFS aus diesen Genen die selektiert werden, deren Expression bereits im Primärtumor dereguliert ist. Da der Primärtumor in der Regel bei jedem Patienten operativ entfernt wird und somit für molekulare Untersuchungen zur Verfügung steht, sind solche Gene potenziell prognostisch nutzbar. Erlauben diese Gene zudem eine Identifikation solcher Patienten, die im Krankheitsverlauf keine makroskopischen Metastasen entwickeln werden, könnten sie dazu beitragen, diesen Patienten eine belastende Nachbeobachtung und Therapie zu ersparen.

Aus den identifizierten Genen sollten anschließend viel versprechende Kandidaten ausgewählt werden, deren differenzielle Expression und prognostische Relevanz an einem großen und unabhängigen Patientenkollektiv durch Messung ihrer Expression (quantitative Polymerasekettenreaktion) oder Proteinmenge (Immunhistochemie) bestätigt werden sollte.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Im Folgenden sind die in der Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien (Tab. 3.1) sowie Reagenzien und Kits (Tab. 3.2) aufgelistet.

Tab. 3.1: Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Produkt	**Hersteller**
7900HT Fast Real-Time PCR System; Hardware Upgrade; Chemical Installation Kit; SDS Software (1.3)	Applied Biosystems, Darmstadt
Bioanalyzer 2100; -Software (B.02.02); Priming Station	Agilent, Böblingen
Combitips Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Cutfix Surgical Disposable Scalpel	Braun, Melsungen
Dampfsterilisator Varioklav 400	H+P Labortechnik, Oberschleissheim
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einwegpipetten (5; 10; 25; 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Färbeautomat Autostainer 360	Lab Vision, Fremont (USA)
Filterspitzen SafeSeal (10; 100; 1000 μl)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Folieneindeckautomat Tissue-Tek Film Coverslipper	Sakura, Staufen
GeneChip Fluidics Station 450; Scanner 3000 7G; GCOS 1.4; Human Genome (HG)-U133 Plus 2.0 arrays; Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara (USA)
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Kryotom Leica CM3050 S	Leica,Wetzlar
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
LightCycler 480; -Software (1.5.0)	Roche, Mannheim
Magnetrührwerk Monotherm	Faust, Schaffhausen (Schweiz)
Microtome Blade C35, N35	pfm, Köln
Mikrotom Microm HM 440E	Microm, Walldorf
Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Objektträger, silanisiert	Dako, Hamburg
Objektträger, SuperFrost-Plus	R. Langenbrinck, Teningen
PCR softtubes (0,5 ml)	Biozym, Hessisch Oldendorf
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Pipetboy Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Fernwald
Plattenzentrifuge Heraeus Laborfuge 400	Heraeus, Wehrheim
Standardtips (10; 100; 100 μl)	Nerbe, Winsen/Luhe

... Fortsetzung der Tabelle auf folgender Seite

Produkt	Hersteller
Präzisionsküvetten (Quarzglas)	Hellma, Müllheim
PTC-100 Programmable Thermal Controller	MJ Research, Watertown (USA)
Reaktionsgefäße (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spektrophotometer Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SPSS 16.0/ PASW 18.0.0	SPSS, Chicago (USA)
TLDA custom buckets; card holders	Heraeus, Wehrheim
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Präzisionswaage 510	Kern, Balingen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg

Tab. 3.2: Reagenzien, Kits und Zelllinien

Produkt	Hersteller
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-V-WT-MT-Platten; Seal Film	Biozym, Hessisch Oldendorf
A498-Zellen	Cell Lines Service, Eppelheim
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Aqua dest. für Injektionszwecke	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Anti-CD31-Antikörper (Klon JC70A, aus Maus; M0823)	Dako, Hamburg
Anti-Streptavidin-Antikörper (aus Ziege, biotinyliert)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Anti-TSPAN7-Antikörper (polyklonal, aus Kaninchen; HPA003140)	Atlas Antibodies, Stockholm (Schweden)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Citronensäure-Monohydrat (z.A.)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, München
Desoxyribonukleotid-Mix (je 10 mM)	Promega, Mannheim
1,4-Dithiothreit	Roth, Karlsruhe
DU-145-Zellen (HTB-81)	ATCC-LGC, Wesel
EDTA-Dinatriumsalz-Lösung (0,5 M)	Sigma-Aldrich, München
Entellan Neu	Merck, Darmstadt
EnVision Dual Link System-HRP	Dako, Hamburg
Eosin	Sigma-Aldrich, München
epT.I.P.S. (300 μl	Eppendorf, Hamburg
Ethanol (absolut)	VWR, Darmstadt
Ethanol (96%)	Klinikapotheke, UKD
Hämatoxylin	SAV LP, Flintsbach
Heringsperma-DNA	Promega, Mannheim
HUVEC	Promocell, Heidelberg
IgG aud Ziege (Goat IgG)	Sigma-Aldrich, München
Invisorb Spin Tissue RNA Mini Kit	Invitek, Berlin
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kochpuffer (pH = 6,0)	Medac, Hamburg
Liquid DAB Plus Substrate Chromogen System	Dako, Hamburg
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt

... Fortsetzung der Tabelle auf folgender Seite

Produkt	Hersteller
MES-Hydrat (SigmaUltra)	Sigma-Aldrich, München
MES-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München
Mikrozid	Schülke & Mayr, Norderstedt
Natriumchlorid (5 M)	Ambion, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
One-Cycle Target Labeling and Control Reagents	Affymetrix, Santa Clara (USA)
Probenverdünnungspuffer VIR-GIL	Medac, Hamburg
R-Phycoerythrin Streptavidin	Invitrogen, Karlsruhe
random hexamer primer	GE Healthcare, München
Rinderserumalbumin (10 mg/ml)	Promega, Mannheim
Rinderserumalbumin (50 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
RNA 6000 Nano Kit	Agilent, Böblingen
RNaseZap	Sigma-Aldrich, München
RNeasy Mini Kit; RNase-Free DNase Set; QiaShredder	Qiagen, Hilden
Salzsäure (rauchend)	Klinikapotheke, UKD
Sekusept plus	Ecolab, Düsseldorf
SSPE-Puffer (20x)	BioWhittaker Molecular Applications/Cambrex, Wiesbaden
Stickstoff (flüssig)	AirLiquide, Düsseldorf
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
TaqMan Gene Expression Assays; Gene Expression Master Mix; Low Density Arrays; Universal PCR Master Mix (2x, no AmpErase UNG)	Applied Biosystems, Darmstadt
TBS-Puffer	Medac, Hamburg
Tissue-Tek	Sakura, Staufen
Tris Ultra	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich, München
UltraVision LP Detection System HRP Polymer; DAB Plus Chromogen	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Vectastain Universal Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Wasserstoffperoxidlösung (35 %)	Merck, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe

3.1.2 Puffer und Lösungen

Die Tabellen 3.3 und 3.4 zeigen die Herstellungsprozeduren der verwendeten Puffer und Lösungen getrennt nach Versuchsprotokollen.

Tab. 3.3: Puffer für die Immunhistochemie

Puffer	Herstellung
TBS-Puffer (0,05 M)	6,06 g Tris; 8,77 g NaCl; 1,0 l A. dest. → mit konzentrierter Salzsäure auf pH = 7,6 einstellen
Citratpuffer (0,01 M)	2,10 g Citronensäure-Monohydrat; 1,0 l A. dest. → mit konzentrierter Natronlauge auf pH = 6,0 einstellen

Tab. 3.4: Puffer und Lösungen für die Oligonukleotid-„Microarray"-Analysen

Puffer/Lösung	Herstellung
MES-Puffer (12x)	64,61 g MES-Hydrat; 193,30 g MES-Natriumsalz; 800,0 ml A. dest. → ggf. pH-Wert einstellen (6,5 - 6,7) → durch 0,2 μm-Filter steril filtrieren → lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C
Hybridisierungspuffer (2x)	8,3 ml 12x MES-Puffer; 17,7 ml 5 M NaCl-Lösung; 4,0 ml 0,5 M EDTA; 0,1 ml 10 % Tween-20; 19,9 ml A. dest. → durch 0,2 μm-Filter steril filtrieren → lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C
Waschpuffer A (nicht-stringenter Waschpuffer)	300,0 ml 20x SSPE-Puffer; 1,0 ml 10 % Tween-20; 699,0 ml A. dest. → durch 0,2 μm-Filter steril filtrieren → Lagerung bei 4 °C
Waschpuffer B (stringenter Waschpuffer)	83,3 ml 12x MES-Puffer; 5,2 ml 5 M NaCl-Lösung; 1,0 ml 10 % Tween-20; 910,5 ml A. dest. → durch 0,2 μm-Filter steril filtrieren → lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C
Färbepuffer (2x)	41,7 ml 12x MES-Puffer; 92,5 ml 5 M NaCl-Lösung; 2,5 ml 10 % Tween-20; 113,3 ml A. dest. → durch 0,2 μm-Filter steril filtrieren → lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C
Goat IgG-Lösung (10 mg/ml)	50,0 mg Goat IgG; 5,0 ml 150 mM NaCl-Lösung → lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C
Phycoerythrin-Streptavidin (SAPE)-Lösung	600,0 μl 2x Färbepuffer; 48,0 μl 50 mg/ml BSA; 12,0 μl 1 mg/ml SAPE; 540,0 μl A. dest. → täglich frisch herstellen
Anti-Streptavidin-Antikörperlösung	300,0 μl 2x Färbepuffer; 24,0 μl 50 mg/ml BSA; 6,0 μl 10 mg/ml Goat IgG-Lösung; 3,6 μl Anti-Streptavidin-Antikörper (biotinyliert); 266,4 μl A. dest. → täglich frisch herstellen

3.1.3 Primer-Sonden-Gemische

Für die Expressionsmessung mittels qPCR wurden optimierte „TaqMan Gene Expression Assays" der Fa. Applied Biosystems verwendet, die genspezifische Primer und Sonden enthalten. Diese Assays wurden zum einen zur Expressionsmessung einzelner Gene verwendet und waren zum anderen auch in den „TaqMan Low Density Arrays" (TLDAs) enthalten. Alle Sonden sind Hydrolyse (TaqMan)-Sonden, deren Fluoreszenzsignal während der Amplifikationsphase der PCR gemessen wird. Sie sind an ihrem 5´-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) markiert, am 3´-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden Quencher, an den eine „minor groove binder"-Gruppe gebunden ist.

Tab. 3.5: „TaqMan Gene Expression Assays“ für die quantitative PCR. Gezeigt sind die Identifikationsnummer des „Assays“, die Zielsequenz der Amplifikation (mittlerer Bereich des Amplifikats), das Gensymbol des Zielgens sowie die Länge des entstehenden Amplifikats und die Lokalisation der Targetsequenz im Gen. (ID = Identifikationsnummer)

„Assay“-ID	Zielsequenz	Gensymbol	Amplikonlänge [bp]	Lokalisation in Exon(s)
Hs03063352_s1	TTGCAGGCTGTCGCCATGTGGAAAG	*BIRC5*	66	3
Hs00426343_m1	AACTACCCCTGCTTGGTGCCAGTCA	*CA4*	58	2 – 3
Hs00560073_m1	TCCCCAGGACATCTGTGATGACCCC	*CAPN6*	69	2 – 3
Hs00396457_m1	GACACCTTTGAATACCAGGGCCTGG	*CENPV*	59	1 – 2
Hs00266671_s1	GCTCTGCCCTGGCTGGCCTGTCCTG	*DARC*	103	1
Hs00247426_m1	GTGGAAGAGATGGAGGCAGAAGAAG	*DKK3*	83	1 – 2
Hs00240747_m1	TCAATGTCTACAAGCTGCTGGCAGA	*EDNRB*	77	1 – 2
Hs00212212_m1	AACCCAAGACTGAAACTCAGAGTTC	*EMCN*	100	4 – 5
Hs00361426_m1	ATGGTTATGACCCTTACTTTTGGTG	*FABP7*	96	3 – 4
Hs99999905_m1	GGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTT	*GAPDH*	122	3
Hs00181213_m1	GCAAGTCAAGATCGAGAGAGACTCC	*IGFBP5*	85	1 – 2
Hs00152924_m1	ACAATGCTGGGAAGGTGAAGACCTA	*IL13RA2*	83	8 – 9
Hs00609711_m1	GTGGCTCCGCCAGCAGAACCCACAA	*LDB2*	59	6 – 7
Hs00183624_m1	TTAAAATGGATGCCAGCTAATTTTC	*NMU*	64	9 – 10
Hs00209875_m1	ATGCATTAAGTTCAGGCAGCATCGC	*PARM1*	80	2 – 3
Hs01065279_m1	AAATGTCCAGGCCAGCAGTACCACT	*PECAM1*	78	9 – 10
Hs99999904_m1	TTCATCTGCACTGCCAAGACTGAGT	*PPIA*	98	4
Hs00186212_m1	AAGACCCAGAAAACCTCGCTGGACG	*RGS5*	78	2 – 3
Hs00761940_s1	CTCTCAGGAGATCTGGCTGTGAGGC	*SAA1/2*	89	4
Hs00326493_m1	CGCGGCATGCACGGCTCAGGAGGAG	*SYNPO2*	102	3 – 4
Hs00427620_m1	TGTACCGCAGCTGCAAAATATTGTA	*TBP*	91	3 – 4
Hs00165949_m1	CAACTCCGACATCGTGATCCGGGCC	*TIMP3*	59	1 – 2
Hs00190284_m1	TTCGTCTTCTGGATCACTGGGGTGA	*TSPAN7*	64	1 – 2
Hs00985157_m1	CAGGAAGGCCAATGTCGGGTAGATG	*UCHL1*	80	6 – 7

3.2 Probenmaterial und -bearbeitung

3.2.1 Humanes Probenmaterial

Die Nephrektomiepräparate wurden in den Kliniken für Urologie in Dresden bzw. Jena gewonnen. Die Konservierung von tumorhaltigen und tumorfreien Gewebeproben dieser tumortragenden Nieren in flüssigem Stickstoff erfolgte zeitnah nach der Operation. Gewebeproben pulmonaler Metastasen wurden im Fachkrankenhaus Coswig kryokonserviert, wo diese Tumorherde mit Hilfe einer speziellen Lasertechnik operativ entfernt wurden. Allen Patienten, deren pulmonale Metastasen in dieser Arbeit untersucht wurden, war der Primärtumor vor der Metastasenresektion operativ entfernt worden. Für die Asservierung der Gewebeproben und ihre Verwendung für Forschungszwecke liegen entsprechende Ethikvoten (EK 195092004, EK 194092004, EK 249112006) sowie die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten vor.

Für die Erstellung der „Tissue Microarrays“ wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE-) Gewebeproben primärer kzNZK sowie deren autologe Metastasen und nichtmalignen Nierengewebe verwendet (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Dresden). Alle FFPE-Gewebeproben sind mindestens drei Jahre alt und dürfen somit für Forschungsstudien herangezogen werden (EK 59032007).

Die Gewebeproben wurden von einem erfahrenen Pathologen nach den bis Ende 2009 gültigen Kriterien der UICC aus dem Jahr 2002 und der Thoenes-Gradierung [Thoenes *et al.*, 1986] beurteilt.

3.2.2 Anfertigung und Hämalaun-Eosin-Färbung von Gefriergewebeschnitten

Die in flüssigem Stickstoff kryokonservierten Gewebeproben wurden in Tissue-Tek eingebettet. Mittels eines Kryotoms wurden, in Abhängigkeit von der Größe des Gewebequerschnitts 30 bis 200, 4 μm dicke Gewebeschnitte für die anschließende RNA-Isolation angefertigt (Kammertemperatur -27 °C bis -26 °C, Objekttemperatur -18 °C bis -16 °C). Im Falle der pulmonalen Metastasen wurde sichtbares Lungengewebe vor dem Schneiden mit einem Skalpell entfernt. Außerdem wurden pro Gewebeprobe mindestens zwei Schnitte — jeweils der erste und letzte, bei mehr als 100 Schnitten auch ein mittlerer Schnitt — auf SuperFrost-Objektträger (OT) aufgezogen und anschließend für eine histologische Beurteilung mit Mayers Hämalaun und Eosin gefärbt. Die Gewebeschnitte für die RNA-Isolation wurden in 2-ml-Reaktionsgefäßen gesammelt, gewogen und möglichst zeitnah in einer geeigneten Menge des entsprechenden Lysepuffers lysiert und gegebenenfalls homogenisiert (vgl. 3.2.3) sowie bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Für die Hämalaun-Eosin-Färbung wurden die OT mit destilliertem Wasser (A. dest.) befeuchtet, anschließend 3 min in frisch filtriertem Mayers Hämalaun gefärbt, nochmals mit A. dest. abgespült und kurz in 0,15 %ige Salzsäure eingetaucht. Es folgten drei je einminütige Waschschritte mit Leitungswasser. Im Anschluss wurden die OT 1 min mit Eosin gefärbt. Nach je fünf- bis sechsmaligem Schwenken der OT in 80 %igem und 96 %igem Ethanol folgte ein einminütiges und anschließend zweiminütiges Waschen in Isopropanol. Die OT

wurden dann 3 min und im Anschluss 5 min in Xylol geschwenkt und verblieben bis zur Permanenteindeckung mit Entellan in Xylol. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden von einem erfahrenen Pathologen begutachtet, um den Gehalt an Tumor- und nekrotischen Zellen in der Probe zu bestimmen sowie die klarzellige Histologie der Präparate zu sichern.

3.2.3 Isolation von Total-RNA aus kryokonserviertem Gewebe

Isolation von Total-RNA mittels „RNeasy Mini Kit“

Es wurden bis zu 30 mg Gewebeschnitte in 600 μl RLT-Puffer, dem frisch 1/10 Volumeneinheiten (VE) β-Mercaptoethanol zugegeben wurden, lysiert. Das Lysat wurde mit Hilfe eines QIAshredder-Säulchens durch zweiminütige Zentrifugation bei 16.000 x g homogenisiert und anschließend bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Das Lysat wurde 3 min bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand mit 600 μl 70 %igem Ethanol vermischt. Sukzessive wurden jeweils 700 μl dieser Mischung auf die RNA-bindende Membran eines Säulchens gegeben, je 30 s bei 8.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Membran wurde mit 400 μl RW1-Puffer gewaschen (30 s, 8.000 x g).

Für die anschließende DNA-Verdauung wurden 1.500 U DNase zunächst in 550 μl RNase-freiem A. dest. gelöst. Auf die Membran des Säulchens wurden dann 10 μl dieser Stammlösung, verdünnt mit 70 μl RDD-Puffer, gegeben und 15 min bei Zimmertemperatur (RT) inkubiert.

Dann wurde die Säule mit 400 μl RW1-Puffer und anschließend mit 500 μl RPE-Puffer, dem vor der ersten Verwendung 4 VE absoluter Ethanol zugegeben wurden, gewaschen (je 30 s, 8.000 x g). Danach erfolgte ein zweiter Waschschritt mit 500 μl ethanolhaltigem RPE-Puffer (2 min, 8.000 x g). Um Ethanolreste zu entfernen, wurden die geöffneten Reaktionsgefäße 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte mit 30 μl A. dest. (1 min, 8.000 x g). Die Konzentrations- und Integritätsbestimmung der RNA erfolgte mittels Bioanalyzer 2100. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Isolation von Total-RNA mittels „Invisorb Spin Tissue RNA Mini Kit“

Bis zu 20 mg Gewebeschnitte wurden in 900 μl Lysepuffer TR, dem frisch 1/100 VE 1 M Dithiothreitol zugegeben wurden, lysiert. Das Lysat wurde sofort weiter verarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

Das Lysat wurde 2 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 μl absolutem Ethanol gemischt und sukzessive je 750 μl der Mischung auf die RNA-bindende Membran eines Säulchens gegeben und jeweils 1 min inkubiert, 1 min zentrifugiert (10.000 x g) und der Durchfluss verworfen. Die Membran wurde mit 500 μl Waschpuffer R1, dem vor der ersten Verwendung 1 VE absoluter Ethanol zugegeben wurde, gewaschen. Anschließend erfolgten zwei Waschschritte mit je 700 μl Waschpuffer R2, dem vor der ersten Verwendung 4 VE absoluter Ethanol zugegeben wurden (je 30 s, 10.000 x g). Danach wurde die Membran bei geöffnetem Deckel des Reaktionsgefäßes getrocknet (5 min, 16.000 x g). Die Elution erfolgte mit 30 μl A. dest. nach zweiminütiger Inkubation auf der Membran (1 min, 10.000 x g). Die Konzentrations- und Integritätsbestimmung der RNA erfolgte mittels Bioanalyzer 2100. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.2.4 RNA-Quantifizierung und -Qualitätskontrolle

Bestimmung von RNA-Konzentration und -Integrität am Bioanalyzer 2100

Die Bestimmung der Konzentration und Integrität von Total-RNA sowie der Größenverteilung von fragmentierter cRNA im Rahmen der Probenbearbeitung für die Oligonukleotid-„Microarray"-Analysen erfolgte mittels des „RNA 6000 Nano Kit" am Bioanalyzer 2100. Die Integrität der RNA wird in Form der sog. RIN („RNA integrity number") angegeben. Die RIN ist eine Zahl zwischen 1 und 10, wobei 1 vollständig degradierter und 10 vollständig intakter RNA entspricht. Sie wird anhand der Signale im gesamten Bereich des Elektropherogramms berechnet und bezieht damit u. a. das 28S/18S-rRNA-Verhältnis und die Anwesenheit von Signalen im niedermolekularen Bereich ein [Müller *et al.*, 2004].

Für die Messung von (c)RNA am Bioanalyzer 2100 wurde an der Basisplatte der „Priming Station" Position C und an der Spritzenhalterung die oberste Position eingestellt. Alle Reagenzien wurden vor der Messung 30 min auf RT erwärmt. Vor jeder Messung wurden die Elektroden des Gerätes mit RNaseZAP (1 min) und A. dest. (10 s) gereinigt und anschließend getrocknet (10 s, RT). 550 μl des Nanogels wurden 10 min bei 1.500 x g durch einen Filter zentrifugiert. 65 μl dieses Gels wurden dann mit 1 μl Nano-Farbstoffkonzentrat (vorher 10 s mittels Vortex-Schüttler homogenisiert) versetzt und mittels Vortex-Schüttler gemischt. Die Gel-Farbstoff-Mischung wurde 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert und bei ihrer anschließenden Verwendung darauf geachtet, die DMSO-Fraktion am Boden des Reaktionsgefäßes nicht zu berühren. In die mit einem fetten „G" markierte Kavität des RNA-Nanochips wurden 9 μl der Gel-Farbstoff-Mischung pipettiert. Anschließend wurde die „Priming Station" geschlossen, die Spritze bis zur eingestellten Position vorsichtig nach unten gedrückt und 30 s der Druck aufrecht erhalten. Anschließend wurden je 9 μl der Gel-Farbstoff-Mischung in die beiden mit einem dünnen „G" markierten Kavitäten gegeben. In die Kavitäten zur Messung der Proben bzw. des Leiters wurden je 5 μl des RNA-Nanomarkers pipettiert. Anschließend wurde 1 μl frisch aufgetauter Nanoleiter (vorher 2 min bei 70 °C denaturiert) bzw. je 1 μl der Proben in die entsprechenden Kavitäten gegeben. Nicht benötigte Kavitäten wurden mit je 1 μl A. dest. aufgefüllt. Danach wurde der Chip 60 s bei 2.400 rpm mittels Vortex-Schüttler gemischt. Die Aufzeichnung und Auswertung der Messung erfolgte mit Hilfe der Software „Agilent 2100 expert" (B.02.02). Zwischen mehreren Läufen und nach Beendigung der Messungen wurden die Elektroden des Geräts mit A. dest. gereinigt (10 s).

Bestimmung von RNA-Konzentration und -Reinheit mittels Absorptionsspektrometrie

Zur Konzentrations- (Gl. 3.1) und Reinheitsbestimmung von RNA bzw. cRNA wurde die optische Dichte (OD) der Proben bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und der Referenzwellenlänge 320 nm gemessen. Von einer proteinfreien und somit reinen Präparation kann ausgegangen werden, wenn das Verhältnis (OD_{260}/OD_{280}) $\geq$ 1,8 ist.

$$c_{RNA}\ (\mu g/\mu l) \ = \ \frac{(OD_{260} - OD_{320}) \ \cdot \ 40 \ \cdot \ V}{1000} \tag{3.1}$$

c_{RNA} ($\mu g/\mu l$)	...	Konzentration der RNA in $\mu g/\mu l$
OD_{260}, OD_{320}	...	optische Dichte der Probe bei 260 bzw. 320 nm
V	...	Verdünnungsfaktor der Probe

3.2.5 cDNA-Synthese

Mittels „random hexamer primer“ (pd(N)$_6$) und des Enzyms „SuperScript II Reverse Transcriptase“ wurden bis zu 500 ng RNA, die nach einem der Protokolle aus 3.2.3 isoliert wurden, in cDNA umgeschrieben (Tab. 3.6). Die unverdünnte cDNA wurde bei -20 °C, verdünnte cDNA bei 4 °C gelagert.

Tab. 3.6: Pipettierschema und Temperaturprogramm für die cDNA-Synthese

Reagenz	**Volumen**	**Temperaturprogramm**
RNA	variabel (100 – 500 ng)	
dNTPs (je 10 mM)	1,0 μl	
pd(N)$_6$-Primer (200 ng/μl)	1,0 μl	
A. dest.	variabel (auf 10,0 μl)	
Gesamtvolumen	**12,0 μl**	→ 5 min, 65 °C
		→ 5 min, auf Eis
„First Strand Buffer“ (5x)	4,0 μl	
DTT (100 mM)	2,0 μl	
Gesamtvolumen	**18,0 μl**	→ 2 min, 42 °C
„SuperScript II Reverse Transcriptase“ (200 U/μl)	1,0 μl	
Gesamtvolumen	**19,0 μl**	→ 10 min, 25 °C
		→ 50 min, 42 °C
		→ 15 min, 70 °C
		→ HOLD, 4 °C

3.3 „Microarray“-Analysen

Mit den in dieser Arbeit verwendeten HG-U133 Plus 2.0-Oligonukleotid-„Microarrays“ (im Folgenden als „Microarray“ oder „Array“ bezeichnet) kann die Expression von 47.400 humanen Transkripten, die 38.500 Gene umfassen, simultan detektiert werden. Die Detektion der Genexpression erfolgt anhand von 25 nt langen Sonden, deren Sequenz einem Teil des 3´-Bereichs des jeweiligen Targettranskripts entspricht. Die mRNA der Proben wird in Form komplementärer RNA (cRNA) auf die „Array“-Oberfläche hybridisiert. Jedes Gen wird mit Hilfe mindestens eines sog. Sondensets detektiert, welches aus jeweils 11 – 20 „perfect match“- und zugehörigen „mismatch“-Sondensequenzen besteht, die statistisch über den gesamten Chip verteilt sind. Die „perfect match“-Sonden entsprechen zu 100 % der Sequenz des Targettranskripts; die analogen „mismatch“-Sonden besitzen eine Fehlbasenpaarung in der Mitte der Sonde und können zur Korrektur unspezifischer Bindungen herangezogen werden [Müller & Röder, 2004; Affymetrix, 2004]. Im Anschluss an die Messungen werden alle Signale eines Sondensets zu einem Gesamtsignal kombiniert.

Die mittels „RNeasy Mini Kit“ isolierte Total-RNA der kryokonservierten Gewebeproben wurde mit dem „One-Cycle Target Labeling and Control Reagents“-Kit wie im Folgenden beschrieben bearbeitet (Abb. 3.1). In die „Microarray“-Analysen wurden nur Gewebeproben mit einem Tumorzellgehalt $\geq$ 70 % und einem Gehalt an nekrotischen Zellen $\leq$ 30 % einbezogen. Die RIN der RNA sollte $\geq$ 6,0 betragen; bei den Metastasengeweben wurden hier aufgrund der Seltenheit des Probenmaterials und der guten Qualität der „Microarray“-Signale Ausnahmen gestattet (vgl. Tab. A.1 & A.2).

3.3.1 Durchführung der „Microarray“-Analysen

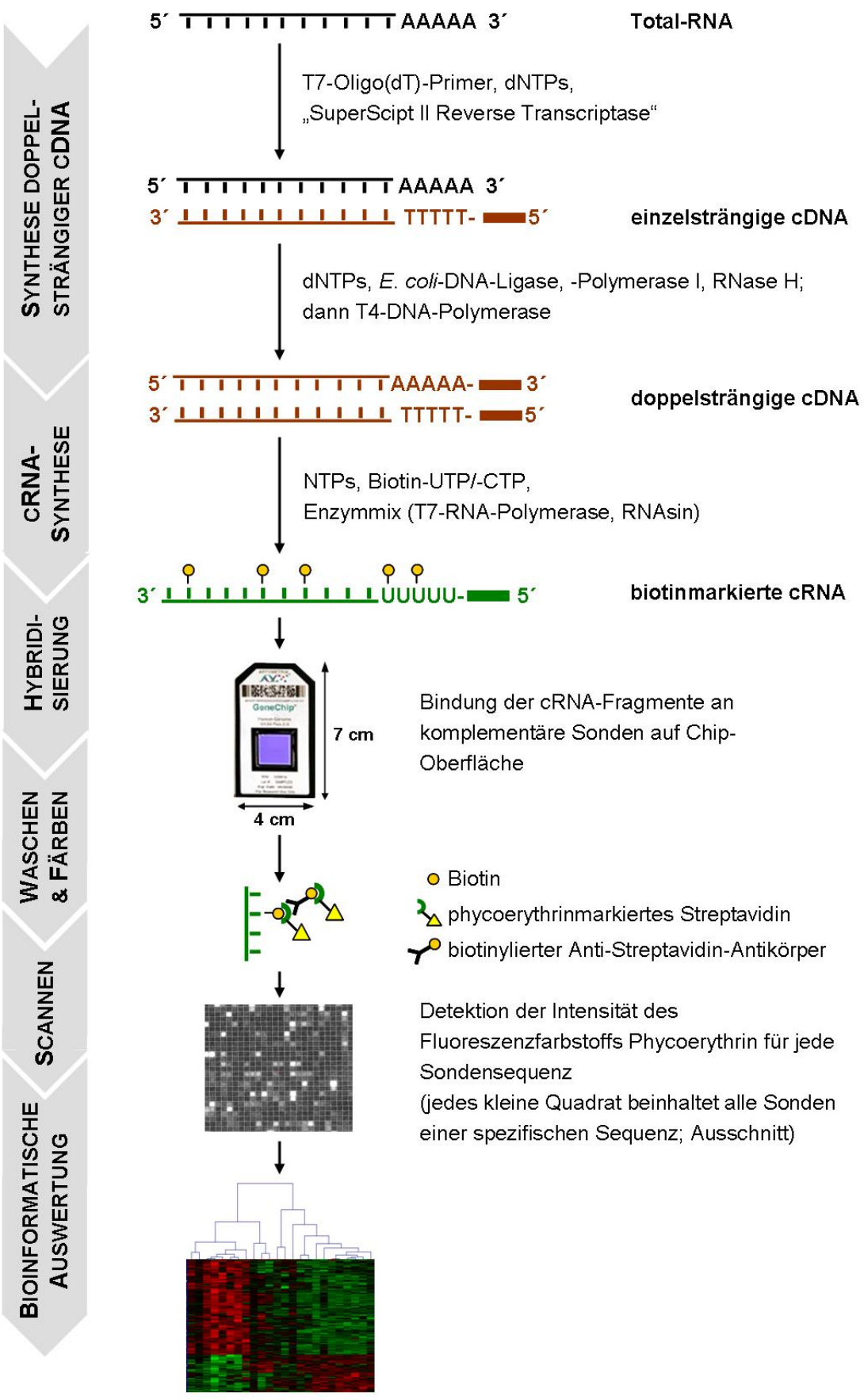
Synthese und Reinigung doppelsträngiger cDNA

Zunächst wurden 1,0 – 3,2 μg Total-RNA mit T7-Oligo(dT)-Primern und der reversen Transkriptase „SuperScript II“ in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (Tab. 3.7). In Abhängigkeit von der eingesetzten Total-RNA-Menge wurden dem Reaktionsmix 2,0 μl der Poly(A)-RNA-Kontrolle in folgender Verdünnung zugefügt: bei 1,0 μg Total-RNA 1:50.000, bei 5,0 μg 1:10.000. Die Verdünnung für alle dazwischen liegenden Total-RNA-Mengen wurde entsprechend angepasst.

Direkt im Anschluss wurde der komplementäre Gegenstrang der cDNA synthetisiert, wobei erst alle zuzugebenden Komponenten gemischt und anschließend zum cDNA-Syntheseansatz gegeben wurden (Tab. 3.8).

Danach wurde die doppelsträngige cDNA sofort gereinigt. Dabei wurden 600 μl „cDNA Binding Buffer“ zum Syntheseansatz der doppelsträngigen cDNA gegeben und mittels Vortex-Schüttler gemischt. Sukzessive wurden dann je max. 500 μl der Lösung auf ein cDNA-Reinigungssäulchen gegeben und 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Dann wurde die Säule mit 750 μl cDNA-Waschpuffer, dem vor dem ersten Gebrauch 4 VE absoluter Ethanol zugefügt wurden, gewaschen (1 min bei 10.000 x g). Die geöffneten Reaktionsgefäße wurden 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert, um Ethanolreste von der Säule zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 14,0 μl cDNA-Elutionspuffer, der 1 min bei RT auf der Säule inkubiert wurde (1 min, 16.000 x g).

Abb. 3.1: Arbeitsablauf der Oligonukleotid-„Microarray“-Analysen. Die mRNA der Probe wird mittels Oligo-(dT)-Primern in doppelsträngige cDNA umgeschrieben und anschließend in einer *in vitro*-Transkription in Form von cRNA vervielfältigt und biotinmarkiert. Die fragmentierte cRNA wird auf HG-U133 Plus 2.0-„Arrays“ hybridisiert. Beim Wasch- und Färbeprozess wird die Biotinmarkierung durch Wechselwirkung mit phycoerythrinmarkiertem Streptavidin in ein Fluoreszenzsignal überführt, welches durch einen biotinylierten Anti-Streptavidin-Antikörper verstärkt wird. Beim anschließenden Scannen wird die Fluoreszenzintensität des Phycoerythrins für jede Sondensequenz erfasst. Die Intensität dieses Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge des jeweiligen Targettranskripts. Anschließend erfolgt die bioinformatische Auswertung der Daten. →


SYNTHESE DOPPEL-STRÄNGIGER cDNA
cRNA-SYNTHESE
HYBRIDI-SIERUNG
WASCHEN & FÄRBEN
SCANNEN
BIOINFORMATISCHE AUSWERTUNG
5´ AAAAA 3´
Total-RNA
T7-Oligo(dT)-Primer, dNTPs,
„SuperScipt II Reverse Transcriptase“
5´ AAAAA 3´
3´ TTTTT- 5´
einzelsträngige cDNA
dNTPs, E. coli-DNA-Ligase, -Polymerase I, RNase H;
dann T4-DNA-Polymerase
5´ AAAAA- 3´
3´ TTTTT- 5´
doppelsträngige cDNA
NTPs, Biotin-UTP/-CTP,
Enzymmix (T7-RNA-Polymerase, RNAsin)
3´ UUUUU- 5´
biotinmarkierte cRNA
7 cm
4 cm
Bindung der cRNA-Fragmente an
komplementäre Sonden auf Chip-
Oberfläche
Biotin
phycoerythrinmarkiertes Streptavidin
biotinylierter Anti-Streptavidin-Antikörper
Detektion der Intensität des
Fluoreszenzfarbstoffs Phycoerythrin für jede
Sondensequenz
(jedes kleine Quadrat beinhaltet alle Sonden
einer spezifischen Sequenz; Ausschnitt)

Tab. 3.7: Pipettierschema und Temperaturprogramm für die cDNA-Erststrangsynthese

Reagenz	Volumen	Temperaturprogramm
Total-RNA	variabel (1 – 8 μg)	
poly(A)-RNA-Kontrolle	2,0 μl	
T7-Oligo(dT)-Primer	2,0 μl	
RNase-freies A. dest.	variabel (auf 12,0 μl)	
Gesamtvolumen	**12,0 μl**	→ 10 min, 70 °C
		→ 2 min, 4 °C
„First Strand Reaction Mix“ (5x)	4,0 μl	
DTT (0,1 M)	2,0 μl	
dNTPs (je 10 mM)	1,0 μl	
	→ mischen	→ zum cDNA-Synthese-ansatz geben
Gesamtvolumen	**19,0 μl**	→ 2 min, 42 °C
„SuperScript II Reverse Transcriptase“	1,0 μl	
Gesamtvolumen	**20,0 μl**	→ 1 h, 42 °C
		→ HOLD, 4 °C

Tab. 3.8: Pipettierschema und Temperaturprogramm für die Synthese des komplementären cDNA-Strangs

Reagenz	Volumen	Temperaturprogramm
RNase-freies A. dest.	91,0 μl	
„Second Strand Reaction Mix“ (5x)	30,0 μl	
dNTPs (je 10 mM)	3,0 μl	
E. coli-DNA-Ligase	1,0 μl	
E. coli-DNA-Polymerase I	4,0 μl	
RNase H	1,0 μl	
Gesamtvolumen	**130,0 μl**	→ zum cDNA-Synthseansatz geben
Gesamtvolumen	**150,0 μl**	→ 2 h, 16 °C
T4 DNA Polymerase	2,0 μl	→ 5 min, 16 °C
EDTA (0,5 M)	10,0 μl	

Synthese, Reinigung und Fragmentierung biotinmarkierter cRNA

In der folgenden *in vitro*-Transkription wurde mit Hilfe einer T7-RNA-Polymerase und biotinylierten Nukleotiden (Biotin-11-CTP, -UTP) biotinmarkierte cRNA erzeugt. Die gereinigte doppelsträngige cDNA diente als Matrize. Der Reaktionsansatz für die *in vitro*-Transkription wurde bei RT in der in Tab. 3.9 angegebenen Reihenfolge pipettiert.

Tab. 3.9: Pipettierschema und Temperaturprogramm für die *in vitro*-Transkription

Reagenz	Volumen	Temperaturprogramm
doppelsträngige cDNA	12,0 μl	
RNase-freies A. dest.	8,0 μl	
„IVT Labeling Buffer“ (10x)	4,0 μl	
„IVT Labeling NTP Mix“	12,0 μl	
„IVT Labeling Enzyme Mix“	4,0 μl	
Gesamtvolumen	**40,0 μl**	→ 16 h, 37 °C

Die cRNA wurde direkt nach ihrer Synthese gereinigt. Hierzu wurden dem *in vitro*-Transkriptionsansatz 60 μl RNase-freies A. dest. und anschließend 350 μl cRNA-Bindepuffer zugesetzt und jeweils mittels Vortex-Schüttler gemischt. Nach der Zugabe von 250 μl absolutem Ethanol und vorsichtigem Mischen wurde die gesamte Lösung (700 μl) auf ein cRNA-Reinigungssäulchen gegeben und 30 s bei 10.000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend einmal mit 500 μl cRNA-Waschpuffer, dem vor dem ersten Gebrauch 4 VE absoluter Ethanol zugesetzt wurden, und einmal mit 80 %igem Ethanol gewaschen (30 s, 10.000 x g). Anschließend wurden die geöffneten Reaktionsgefäße 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert, um Ethanolreste von der Säule zu entfernen. Die Elution der cRNA erfolgte durch sukzessive Zugabe von 11 μl und anschließend 10 μl RNase-freiem A. dest. und jeweilige Zentrifugation bei 16.000 x g (1 min).

Die cRNA wurde mittels photometrischer Messung quantifiziert und auf ihre Reinheit geprüft. Die tatsächliche Menge an markierter cRNA ergab sich aus der Differenz der RNA-Gesamtmenge (cRNA & RNA) und der Menge an RNA, die für die cDNA-Synthese eingesetzt wurde.

Anschließend wurden 20 μg der markierten cRNA durch metallioneninduzierte Hydrolyse in Fragmente von 35 – 200 nt gespalten (Tab. 3.10). Die Größe der Fragmente wurde durch Messung am Bioanalyzer 2100 geprüft und die fragmentierte cRNA bis zur Hybridisierung bei -80 °C gelagert.

Tab. 3.10: Pipettierschema und Temperaturprogramm für die cRNA-Fragmentierung

Reagenz	Volumen	Temperaturprogramm
gereinigte cRNA	1,0 – 21,0 μl (20,0 μg)	
„Fragmentation Buffer“ (5x)	8,0 μl	
RNase-freies A. dest.	variabel (auf 40,0 μl)	
Gesamtvolumen	**40,0 μl**	→ 35 min, 94 °C → HOLD, 4 °C

Hybridisierung biotinmarkierter cRNA auf HG-U133 Plus 2.0-„Arrays“

Zunächst wurde ein Hybridisierungsmix hergestellt, der die jeweilige fragmentierte cRNA-Probe enthielt (Tab. 3.11). Dieser Hybridisierungsmix wurde direkt nach der Herstellung

verwendet oder bei -20 °C gelagert. Bei einer geringeren cRNA-Ausbeute als 20 μg wurden sowohl das Volumen der Fragmentierungsreaktion als auch das des Hybridisierungsmixes entsprechend angepasst, sofern noch ein Gesamtvolumen des Hybridisierungsmixes von $\geq$ 220 μl erreicht wurde.

Direkt vor der Verwendung wurde der Hybridisierungsmix 5 min bei 99 °C erhitzt, kurz bei 4 °C abgekühlt und anschließend 5 min bei 45 °C erwärmt. Anschließend wurden eventuell unlösliche Bestandteile durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 16.000 x g von der Lösung abgetrennt. Zwischenzeitlich wurden die vorher auf RT erwärmten HG-U133 Plus 2.0-„Arrays“ luftblasenfrei mit 250 μl Hybridisierungspuffer (1x) befüllt und 10 min bei 45 °C im Hybridisierungsofen (60 rpm) inkubiert. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer in den „Arrays“ durch 200 μl des jeweiligen Hybridisierungsmixes ersetzt. Die Befüllungsöffnungen der „Arrays“ wurden abgeklebt. Im Anschluss wurden die „Arrays“ im Hybridisierungsofen 16 h bei 45 °C und 60 rpm inkubiert. Es wurden maximal acht „Arrays“ zeitgleich hybridisiert.

Tab. 3.11: Pipettierschema und Temperaturprogramm zur Herstellung des Hybridisierungsmixes

Reagenz	**Volumen**
fragmentierte cRNA (0,5 μg/μl)	40,0 μl
Kontroll-Oligonukleotid B2	5,0 μl
eukaryotische Hybridisierungskontrollen (20x)	15,0 μl
Heringsperma-DNA (10,0 mg/ml)	3,0 μl
BSA (10 mg/ml)	15,0 μl
Hybridisierungspuffer (2x)	150,0 μl
DMSO	30,0 μl
A. dest.	42,0 μl
Gesamtvolumen	**300,0 μl**

Waschen und Färben der HG-U133 Plus 2.0-„Arrays“

Nach der Hybridisierung wurde der Hybridisierungsmix aus den „Arrays“ entfernt und diese luftblasenfrei mit Waschpuffer A befüllt. Der Hybridisierungsmix wurde wieder bei -20 °C gelagert und im Falle experimenteller Schwierigkeiten oder einer schlechten „Array“-Qualität noch einmal verwendet. An der „GeneChip Fluidics Station“ konnten zeitgleich vier „Arrays“ bearbeitet werden. Wurden mehr als vier „Arrays“ hybridisiert, so wurden die verbleibenden „Arrays“ bei 4 °C gelagert, vor dem Wasch- und Färbeprozess jedoch zunächst wieder auf RT erwärmt.

Für die Färbung jedes „Arrays“ wurden je 1.200 μl Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE)-Lösung (undurchsichtige Reaktionsgefäße) und 600 μl Anti-Streptavidin-Antikörperlösung frisch hergestellt. Vor dem Gebrauch wurden die Schläuche der Wasch- und Färbestation mit den Waschpuffern A bzw. B gefüllt. Anschließend wurden die „Arrays“ sowie die SAPE- und Anti-Streptavidin-Antikörperlösung (je 600 μl) enthaltenden Reaktionsgefäße in die Station eingesetzt und der Wasch- und Färbeprozess laut dem Protokoll EukGe-WS2v5 durchgeführt (Tab. 3.12). Nach dem Wasch- und Färbeprozess wurde kontrolliert, ob die

„Arrays“ luftblasenfrei mit Waschpuffer A gefüllt waren und ggf. per Hand mit frischen Waschpuffer A luftblasenfrei befüllt. Nachdem alle „Arrays“ bearbeitet waren, wurden die Schläuche der Wasch- und Färbestation zunächst mit A. dest. gespült und anschließend geleert.

Tab. 3.12: Wasch- und Färbeprotokoll EukGe-WS2v5 für HG-U133 Plus 2.0-„Arrays“ (Durchmischung = Absaugen des Puffers aus dem „Array“ und Wiederbefüllung mit demselben Puffer)

Schritt	**Prozedur**
Spülen	10 Zyklen à 2 Durchmischungen, Waschpuffer A, 30 °C
Spülen	6 Zyklen à 15 Durchmischungen, Waschpuffer B, 50 °C
1. Färbeschritt	5 min, SAPE-Lösung, 35 °C
Spülen	10 Zyklen à 4 Durchmischungen, Waschpuffer A, 30 °C
2. Färbeschritt	5 min, Anti-Streptavidin-Antikörperlösung, 35 °C
3. Färbeschritt	5 min, SAPE-Lösung, 35 °C
Spülen	15 Zyklen à 4 Durchmischungen, Waschpuffer A, 35 °C
HOLD	25 °C

Scannen und primäre Qualitätskontrolle der HG-U133 Plus 2.0-„Arrays“

Das Scannen der „Arrays“ und die primäre Qualitätskontrolle erfolgten mittels „GeneChip Scanner 3000 7G“ und den Grundeinstellungen der Software GCOS. Vor dem Scannen wurden die Befüllungsöffnungen der „Microarrays“ abgeklebt. Jeder „Array“ wurde einmal gescannt.

Als primäre Qualitätskontrolle wurde zunächst das Scan-Bild (*.dat) beurteilt. Es wurde geprüft, ob alle Hybridisierungskontrollen die erwarteten Signale liefern [vgl. Affymetrix, 2004], der Schriftzug „GeneChip HG-U133 Plus2“ auf dem Bild erkennbar ist und das automatisch gelegte Gitter die Signale der verschiedenen Sondensequenzen gut voneinander abgrenzt. Als nächster Schritt erfolgte eine primäre Analyse der Daten jedes einzelnen „Arrays“ mit der Software GCOS, wobei die mittlere Intensität jedes „Microarrays“ auf den Wert 500 skaliert wurde. Die „Arrays“ sollten anschließend den folgenden Qualitätsmerkmalen genügen [Affymetrix, 2004]:

- Hintergrundsignal ≤ 100 und für alle „Arrays“ in etwa gleich hoch
- möglichst kleiner Skalierungsfaktor (≈ 5), der über alle „Arrays“ um einen Faktor von max. 3 variiert
- Anteil der „present calls“ (berechnet aus Vergleich von „perfect match“- und „mismatch“-Sondensignalen) beträgt ≈ 50 %
- 3´/5´-Verhältnis für die Referenzgene *GAPDH* sowie *ACTB* beträgt 1 – 3
- Hybridisierungs- und Poly(A)-Kontrollen liefern „present“-Signal und Signalstärke steigt mit Konzentration der Kontrollen an.

Waren mehr als zwei dieser Forderungen nicht erfüllt, wurde der „Array“ nicht in die weitere Auswertung einbezogen. Die Qualitätsparameter der einzelnen „Microarrays“ können

dem Anhang (A.1 & A.2) entnommen werden. Die erhaltene *.txt-Datei wurde später für ein Filtern nach „present calls“ verwendet. Für die Auswertung wurden die Rohdaten (*.cel) genutzt.

3.3.2 Bioinformatische Auswertung der „Microarray“-Daten

Hintergrundkorrektur, Normalisierung, Signalberechnung und Filtern

Zunächst wurde eine globale Hintergrundkorrektur sowie eine Quantilnormalisierung aller „Microarray“-Daten mittels der Software RMAExpress 4.1 vorgenommen [Bolstad *et al.*, 2003]. Bei der Normalisierung wird die Intensitätsverteilung der Sondensignale der verschiedenen „Microarrays“ auf eine mittlere Verteilung angeglichen und somit die durch technische Varianz hervorgerufenen Signalunterschiede weitestgehend eliminiert [Irizarry *et al.*, 2003]. Die Signale der verschiedenen Sondensets wurden basierend auf den logarithmierten Signalenintensitäten der jeweils zugehörigen „perfect match“-Sonden berechnet [Irizarry *et al.*, 2003a].

Gegebenenfalls wurden die Daten anschließend gefiltert. Hierzu wurden all jene Sondensets aus der weiteren Analyse ausgeschlossen, deren Differenz zwischen maximaler und minimaler Signalintensität eines Sondensets über alle Proben ≤ 100 bzw. deren Quotient aus beiden Werten ≤ 3 betrug [Coller *et al.*, 2000]. Weiterhin wurden Werte > 16.000 auf 16.000 skaliert und Werte < 20 auf 20 [Coller *et al.*, 2000].

Anschließend wurden die Daten logarithmiert (log_2), um eine annähernde Normalverteilung zu generieren [Affymetrix, 2004]. Alle im Folgenden beschrieben Analysen wurden an den logarithmierten Daten vorgenommen.

Korrektur von „batch“-Effekten

Technische Variationen, die beispielsweise zwischen verschiedenen Chargen der Probenbearbeitung oder Hybridisierung auftreten können, wurden mit Hilfe einer parametrischen Bayesschen Methode mit dem R-Modul Combat korrigiert [Johnson *et al.*, 2007; Venables & Smith, 2010]. Im Vorfeld der „batch“-Korrektur wurden alle Gene herausgefiltert, die in < 10 % der Proben „present“ waren und die Daten log_2-transformiert.

Identifikation differenziell exprimierter Gene

Als differenziell exprimiert wurden solche Gene definiert, die eine minimale n-fache Änderung der mittleren Expression und zudem eine signifikant unterschiedliche Expression zwischen den verglichenen Gruppen aufwiesen. Dabei wurden die Signale aller Sondensets, auch wenn sie ein und dasselbe Gen detektierten, separat betrachtet. Somit kann ein und dasselbe Gen mehrfach als differenziell exprimiert identifiziert werden, wenn mehr als ein Sondenset die genannten Forderungen erfüllt. Zum besseren Verständnis werden die Signalintensitäten, die die einzelnen Sondensets lieferten, im Folgenden als Expressionswerte dieser Sondensets bezeichnet, obwohl ein Sondenset natürlich nicht exprimiert wird.

Die **minimale n-fache Änderung der mittleren Expression** wurde entweder auf einem konstanten Niveau von $\geq 1{,}8$ (entspricht Differenz von 0,848 in logarithmischer Skala)

für Gene aller Expressionshöhen festgelegt oder es wurde eine intensitätsabhängige minimale 1,8-fache Änderung gefordert (Gl. 3.2). Bei Sondensets mit medianen Expressionswerten entspricht diese intensitätsabhängige Änderung einer 1,8-fachen Änderung. Sondensets mit geringeren mittleren Expressionswerten mussten eine größere und Sondensets mit höheren mittleren Expressionswerten eine kleinere n-fache Änderung aufweisen, um der Forderung nach einer minimalen intensitätsabhängigen 1,8-fachen Änderung zu genügen. Für Sondensets mit den höchsten mittleren Expressionswerten log_2(Expression) = 13,69 beträgt die minimale n-fache Änderung dementsprechend 1,4, für Sondensets mit den geringsten mittleren Expressionswerten log_2(Expression) = 4,32 2,7.

$$log_2(FC_{int,i}) = log_2(FC_i) \cdot \frac{\mu\left\{log_2(E_{i,j=1\ldots k})\right\}}{M\left\{log_2(E_{i=1\ldots m,j=1\ldots n})\right\}} \stackrel{!}{\geq} 0,848 \tag{3.2}$$

$log_2(FC_{int,i})$	...	Logarithmus der intensitätsabhängigen Änderung der mittleren Expressionswerte des Sondensets i der verglichenen Gruppen
$log_2(FC_i)$	...	Logarithmus des Quotienten der mittleren Expressionswerte des Sondensets i der verglichenen Gruppen
$\mu\left\{log_2(E_{i,j=1\ldots k})\right\}$	...	Mittelwert der logarithmierten Expressionswerte E des Sondensets i aller in die jeweilige Analyse einbezogenen Proben k
$M\left\{log_2 E_{i=1\ldots m,j=1\ldots n}\right\}$	...	Median der logarithmierten Expressionswerte E aller Sondensets i aller Proben j (nach „batch“-Korrektur und Filtern); = 7,364 (Einbeziehung aller 24 Metastasen und 24 Primärtumoren)
m	...	Gesamtzahl der untersuchten Sondensets (nach „batch“-Korrektur und Filtern)
n	...	Gesamtzahl aller untersuchten Proben/„Microarrays“
k	...	in die jeweilige Analyse einbezogene Proben/„Microarrays“

Statistisch signifikant unterschiedlich exprimierte Gene wurden mittels permutationsbasierter parametrischer Tests und anschließender Korrektur für multiples Testen identifiziert. Für Zwei-Gruppenvergleiche wurde ein zweiseitiger t-Test mit dem „comparative marker selection modul“ der Software GenePattern 3.1.1 [Gould *et al.*, 2006; Reich *et al.*, 2006], für Drei-Gruppenvergleiche eine „analysis of variance“ (ANOVA) mit Hilfe des im Internet verfügbaren „array analysis tool“ [Sharov *et al.*, 2005] durchgeführt. Als eine ANOVA-Anpassung für multiples Testen wurde die Varianz der Expressionswerte für jedes Sondenset in Form eines gewichteten Mittels aus der Varianz dieses Sondensets und der mittleren Varianz aller Sondensets mit ähnlicher Signalintensität berechnet (Bayessches Netzwerk) [Cui & Churchill, 2003,Baldi & Long, 2001]. Im Falle eines signifikanten Unterschieds der Expressionswerte zwischen den drei verglichenen Gruppen wurden mit einem Tukey-HSD („honestly significant difference“)-PostHoc-Test (SPSS 16.0) und anschließender Korrektur für multiples Testen (Excel-Macro) [Horgan, 2010] die Gruppen identifiziert, zwischen denen dieser Unterschied bestand.

Anhand der Teststatistiken t und F von t-Test bzw. ANOVA wurde die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit p, ein falsch positives Ergebnis zu erhalten, anhand einer Permutationsanalyse empirisch abgeschätzt. Im Falle des t-Tests wurde, wenn nicht anders angegeben,

die maximale Anzahl an Permutationen $r = \binom{n1+n2}{n1} - 1$ (für n1 ≠ n2; n1, n2 ... Probenzahl der Gruppe 1 bzw. 2), max. aber 10.000 Permutationen, durchgeführt, bei der ANOVA 500 Permutationen.

Die erhaltenen Irrtumswahrscheinlichkeiten p wurden mittels der sog. „false discovery rate“ (FDR) nach Benjamini & Hochberg für multiples Testen korrigiert [Dudoit *et al.*, 2002; Benjamini *et al.*, 2001 & 1995]. Diese schätzt die Anzahl falsch positiver unter allen positiven Ergebnissen und skaliert die Irrtumswahrscheinlichkeiten p entsprechend nach oben (q-Werte). Ein Gen galt dann als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert, wenn mindestens ein dieses Gen repräsentierendes Sondenset einen q-Wert < 0,050 (t-Test, ANOVA) bzw. < 0,100 (Tukey-HSD-PostHoc-Test) lieferte.

Im Ergebnisteil ist stets die Anzahl der differenziell exprimierten Gene sowie die Zahl der zugehörigen Sondensets in Klammern gezeigt. Die Anzahl der Sondensets umfasst alle Sondensets, deren Expressionswerte den Kriterien einer differenziellen Expression genügten. Dazu gehören auch Sondensets für „expressed sequence tags“ oder gegebenenfalls mehrere Sondensets, die ein und dasselbe Gen detektieren. Die Anzahl der Gene umfasst die zugehörigen annotierten Gene und enthält keinerlei Dopplungen. Die im Ergebnisteil angegebenen positiven bzw. negativen n-fachen Änderungen in Gruppe A *vs.* Gruppe B repräsentieren den Faktor, um den ein Gen in Gruppe A höher bzw. geringer exprimiert ist als in Gruppe B.

Hierarchisches Clustern von Proben

Beim hierarchischen Clustern wurden die Proben hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit in Form eines Dendrogramms angeordnet (Genesis 1.7.5) [Sturn *et al.*, 2002]. Vor dem Clustern wurden die Expressionswerte jedes Sondensets mittelwertzentriert und auf eine Standardabweichung = 1 skaliert. Anschließend wurden für jede Probe die Expressionswerte aller in die Clusteranalyse einbezogenen Sondensets m zu einem Vektor kombiniert und zur Abschätzung der Ähnlichkeit zweier Proben der Pearson-Korrelationskoeffizient der entsprechenden Vektoren berechnet. Die Baumstruktur wurde mittels eines iterativen Verfahrens erstellt, in welchem die einzelnen Objekte durch paarweisen Vergleich nach und nach zu Clustern zusammengefügt wurden. Als Abstand zwischen zwei Clustern wurde der Mittelwert der Korrelationskoeffizienten aller Kombinationen aus jeweils zwei Objekten der Cluster angesehen („average linkage clustering“) [Sturn, 2000].

Die grafische Darstellung der Clusterstruktur erfolgte basierend auf der Genexpressionsmatrix („heat map“). Jede Zeile dieser Matrix repräsentiert jeweils ein Sondenset, jede Spalte eine Probe. Die Expressionswerte jedes Sondensets wurden auf seinen Mittelwert über alle Proben normiert (schwarz dargestellt). Rote Felder bedeuten Expressionswerte höher, grüne Felder Expressionswerte geringer als der Mittelwert. Je stärker die Farbsättigung, desto mehr weicht der jeweilige Expressionswert vom Mittelwert ab. Je näher zwei Proben in der Baumstruktur beieinander liegen und je kürzer die sie verbindenden Äste sind, desto ähnlicher sind sie sich [Parmigiani *et al.*, 2003].

Clustern von Genen

Um Gene mit einem ähnlichen Expressionsverlauf über verschiedene Proben zu identifizieren, wurden die Expressionswerte der sie repräsentierenden Sondensets mittels „k-means clustering“ in einzelne Gruppen unterteilt. Vor dem Clustern wurden die Expressionsdaten jedes Sondensets mittelwertzentriert und auf eine Standardabweichung = 1 skaliert. Die betrachteten Sondensets wurden dann in einem iterativen Vefahren (50 Iterationsschritte) einer definieren Clusterzahl zugeordnet. Jedes Sondenset wurde dabei dem Cluster zugeordnet, dessen mittlerer Expressionswert über alle im Cluster enthaltenen Proben seinem Expressionswert am nächsten lag (Abstandsmaß: Euklidischer Abstand).

Identifikation überrepräsentierter biologischer Prozesse

Die sog. Genontologie ordnet humanen Genen Kategorien bezüglich der Funktion ihrer Proteine (“molecular function“), deren zellulärer Lokalisation („cellular component“) und den biologischen Prozessen („biological process“), an denen sie beteiligt sind, zu [Ashburner *et al.*, 2000].

Basierend auf dieser Terminologie wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des „functional annotation tool“ des im Internet zugänglichen Annotationsprogramms DAVID („database of annotation, visualization and integrated discovery“; Stand April 2010) [Huang *et al.*, 2007] biologische Prozesse identifiziert, die in einer Liste von differenziell exprimierten Genen überrepräsentiert waren. Dabei wurde jeweils die Liste der Sondensets, die diese differenziell exprimierten Gene repräsentieren, mit der Liste aller Sondensets des HG-U133 Plus 2.0-„Microarrays“ hinsichtlich der ihnen zugeordneten biologischen Prozesse verglichen. Auf Grundlage eines modifizierten Fisher-Tests („EASE score“) wurde geprüft, welche biologischen Prozesse in der Liste der differenziell exprimierten Gene häufiger vorkommen als es zu erwarten wäre [Hosack *et al.*, 2003]. Der erhaltene p-Wert wurde anschließend durch Schätzung der FDR für multiples Testen korrigiert [Benjamini & Hochberg, 1995]. Alle biologischen Prozesse mit $q < 0{,}050$ wurden als überrepräsentiert in der Liste der differenziell exprimierten Gene angesehen.

Identifikation der Top-50-Kandidatengene

Die Sondensets, die zwei Gruppen A und B am besten voneinander differenzieren, wurden mit Hilfe des Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses $S2N = (\mu_A - \mu_B)/(\sigma_A + \sigma_B)$ berechnet, wobei $\mu_{A,B}$ bzw. $\sigma_{A,B}$ den Mittelwert bzw. die Standardabweichung der Expressionswerte des jeweils betrachteten Sondensets in Gruppe A bzw. B darstellen (GeneCluster 2.1.7) [Reich *et al.*, 2004]. Die Gene, die von den 50 Sondensets mit dem höchsten S2N-Verhältnis repräsentiert werden, wurden als Top-50-Gene definiert.

Erstellung von Vorhersagemodellen

Die Erstellung und Validierung von Vorhersagemodellen erfolgte mit einem „k-nearest neighbouring“ (KNN)- oder einem „weighted voting“ (WV)-Algorithmus in dem Programm GeneCluster (Version 2.1.7) [Reich *et al.*, 2004]. Die Proben werden dabei als Vektoren im n-dimensionalen Raum betrachtet, wobei n der Zahl der im Modell enthaltenen Gene ent-

spricht. Beim KNN wird der Vektor der zu klassifizierenden Probe mit denen der Proben bekannter Gruppenzugehörigkeit verglichen. Die zu klassifizierende Probe wird der Gruppe zugeordnet, die die Mehrzahl ihrer drei nächsten Nachbarn (k = 3; Abstandsmaß: Kosinus) stellt [Reich *et al.*, 2004]. Beim WV wird jedem im Modell enthaltenen Gen der zu klassifizierenden Probe ein gewichteter Wert zugeordnet. Dieser gibt an, wie weit der Expressionswert des jeweiligen Gens von dem Mittelwert aller Proben der betrachteten Gruppe abweicht. Für jede mögliche Gruppenzugehörigkeit werden die gewichteten Werte aller Gene des Modells summiert. Die Probe wird dann der Gruppe zugeordnet, für die diese Summe maximal ist [Golub *et al.*, 1999].

Mittels KNN oder WV wurde zunächst eine Kombination von Sondensets identifiziert, die eine korrekte „leave one out"-Kreuzvalidierung der Proben des initialen Probenkollektivs zuließ. Die Güte dieses Modells wurde mit einem Fisher-Test geprüft. Im Falle einer richtigen Kreuzvalidierung wurden die entsprechenden Sondensets genutzt, um ein Vorhersagemodell basierend auf dem verwendeten Algorithmus zu erstellen. Mit dessen Hilfe wurden dann unabhängige Proben anhand der Expressionswerte der ausgewählten Sondensets in eine passende Gruppe eingeordnet.

3.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion

3.4.1 Expressionsmessung mittels „TaqMan Low Density Arrays"

Um die differenzielle Expression möglichst vieler Gene mittels qPCR zu prüfen, wurden TLDAs verwendet. Dabei handelt es sich um ein Kartenformat mit 384 kleinen Reaktionsräumen, die jeweils genspezifische „TaqMan Gene Expression Assays" enthalten. Die Beschichtung der verwendeten kundenspezifischen Karten ist in Abb. 3.2 schematisch dargestellt. Die Messungen erfolgten am 7900HT Fast Real-Time PCR System am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie in Leipzig.

Die RNA der zu messenden Proben wurde mittels „RNeasy Mini Kit" isoliert und je 500 ng der Total-RNA mittels „SuperScript II Reverse Transcriptase" in cDNA umgeschrieben. Zu jeder cDNA-Probe (19,0 μl) wurden direkt vor der Messung 50 μl „TaqMan Universal PCR Master Mix" gegeben und der Reaktionsansatz mit A. dest. auf 100 μl aufgefüllt. In jeden der acht Eingänge einer Karte wurde der gesamte Reaktionsansatz jeweils einer Probe eingefüllt. Dann wurde die Karte zentrifugiert (757 x g, 2x 1 min) und anschließend mit dem „TLDA Sealer" verschlossen. Die leeren Probenreservoire wurden entfernt. Die Messung der Karten erfolgte im „relative quantification"-Modus der SDS-Software (Version 2.3) mit dem in Tab. 3.13 angegebenen Temperaturprogramm, welches von der Firma entsprechend der kundenspezifischen Belegung der TLDAs vorgeschlagen wurde.

Tab. 3.13: Sequenzspezifisches Temperaturprogramm zur Messung der „TaqMan Low Density Arrays"

Schritt	Temperaturprogramm	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	50,0 °C, 2 min, Heizrate 100 %	1
	94,5 °C, 10 min, Heizrate 100 %	1
Amplifikation	97,0 °C, 30 s, Heizrate 50 % 59,7 °C, 30 s, Heizrate 100 %	40

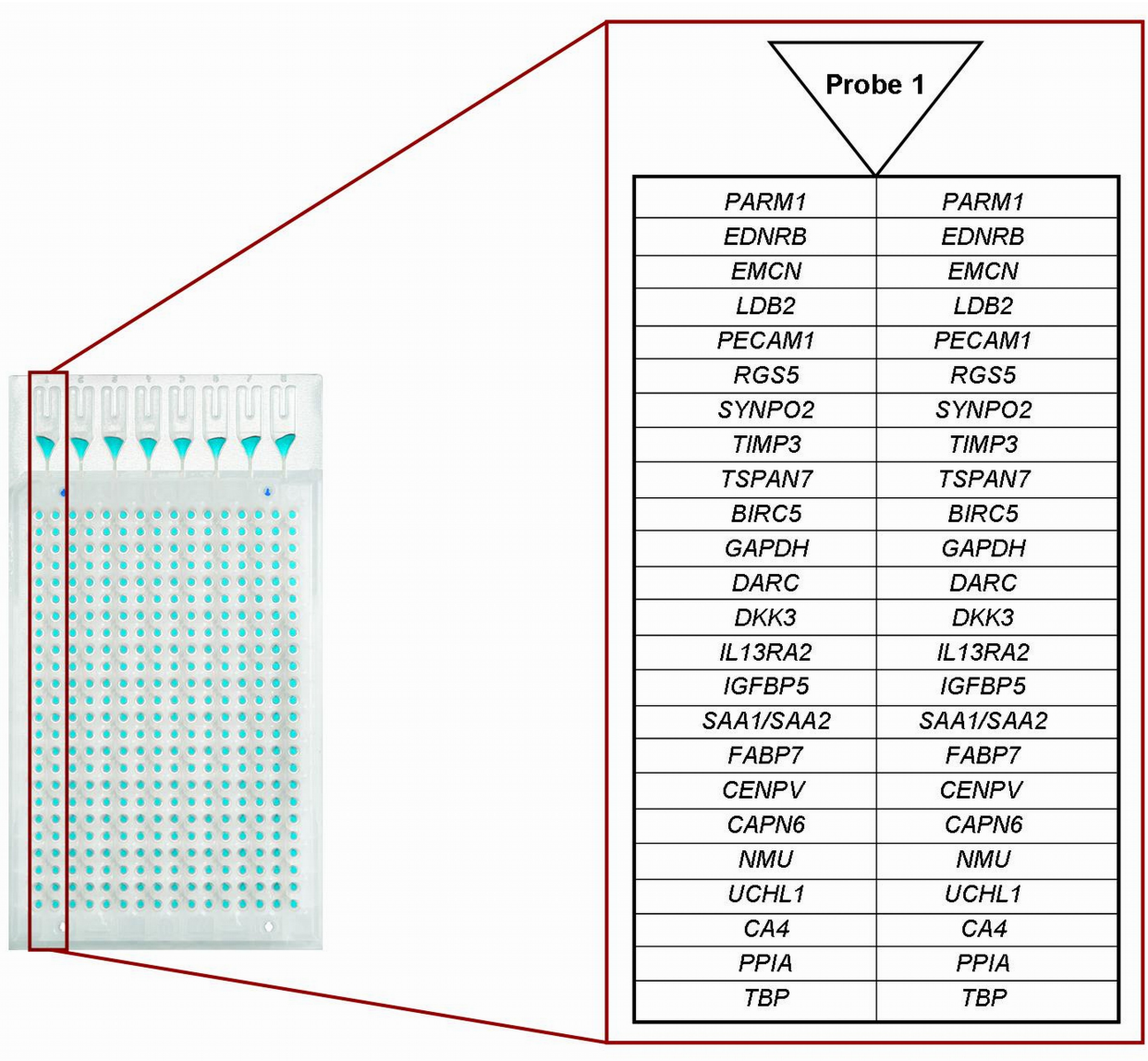


Abb. 3.2: Kundenspezifische Belegung der „TaqMan Low Density Arrays“. Links ist eine Karte mit 384 Reaktionsräumen dargestellt [Applied Biosystems, 2009]. In der vorliegenden Arbeit wurde pro Karte die Expression von 24 Genen in Doppelbestimmung in acht Proben gemessen. Die vergrößerte Darstellung zeigt die entsprechende Belegung der Reaktionsräume mit den genspezifischen Primern und Sonden (Gensymbole angegeben) am Beispiel der ersten Probe. Die Belegung für die anderen sieben Proben entspricht diesem Schema. *GAPDH* wurde als firmeninterne Kontrolle mitgeführt.

Neben dem zur Matrizen-DNA proportionalen FAM-Fluoreszenzsignal war in jedem Reaktionsansatz eine konstante Konzentration des passiven Referenzfarbstoffs ROX (5-Carboxyrhodamin) enthalten. Die Messung der Fluoreszenzsignale erfolgte kontinuierlich im Wellenlängenbereich 500 – 660 nm. Mittels eines automatisierten Rechenalgorithmus der SDS-Software wurden die erhaltenen Signale anschließend den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen zugeordnet. Für jeden Messpunkt wurde der Quotient aus dem jeweiligen FAM- und ROX-Signal gebildet, um ortsabhängige Messfehler des Fluoreszenzsignals in den verschiedenen Reaktionskammern und TLDAs zu korrigieren. Dieses normierte Reportersignal wurde für die Ermittlung der Basislinie und des Schwellenwerts („threshold cycle“; CT-Wert) herangezogen. Der CT-Wert entspricht dem PCR-Zyklus, in welchem sich das gemessene Signal erstmals vom Hintergrund abhebt und ist abhängig von der Ausgangsmenge der Matrizen-DNA [Mülhardt, 2002].

Die Basislinie wurde manuell in einen Zyklenbereich gelegt, in welchem noch kein Signal messbar war. Der CT-Wert wurde ebenfalls manuell anhand einer logarithmischen Skaleneinteilung so gewählt, dass er im exponentiellen Bereich der Amplifikationskurven des jeweiligen Gens lag. Basislinie und CT-Wert wurden für jedes Gen extra festgelegt und für ein und dasselbe Gen in allen TLDAs konstant gehalten. Für die weiteren Berechnungen wurden die CT-Werte der Doppelbestimmungen jeweils gemittelt.

3.4.2 Expressionsmessung am LightCycler 480

Die Quantifizierung der Expression ausgewählter Gene erfolgte mittels genspezifischer „TaqMan Gene Expression Assays“ am LightCycler 480 in 96-Kavitäten-Platten. Die RNA der zu messenden Proben wurde mittels „Invisorb Spin Tissue RNA Mini Kit“ isoliert und je 100 – 500 ng der Total-RNA mittels „SuperScript II Reverse Transcriptase“ in cDNA umgeschrieben. Das Pipettierschema der qPCR ist in Tab. 3.14 A angegeben. Unter Kühlung der 96-Kavitäten-Platte wurden zunächst 18 μl Mastermix in jede Kavität pipettiert, anschließend je 2 μl 1:5 verdünnte cDNA oder A. dest (Negativkontrolle). Die Platten wurden mit einer Folie verschlossen und 2 min bei 2.000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die qPCR mit dem in Tab. 3.14 B angegebenen Temperaturprogramm.

Tab. 3.14: (A) Pipettierschema und (B) Temperaturprogramm für die quantitative PCR am LightCycler 480 unter Verwendung von „TaqMan Gene Expression Assays“

A	**Reagenz**	**Volumen**	
	„TaqMan Gene Expression Mastermix“ (2x)	10,0 μl	
	„TaqMan Gene Expression Assay“ (20x)	1,0 μl	
	A. dest.	7,0 μl	
	Gesamtvolumen	**18,0 μl**	→ mischen → in Reaktionsgefäß geben
	cDNA (1:5)	2,0 μl	→ zum Mastermix geben
	Gesamtvolumen	**20,0 μl**	

B	**Schritt**	**Temperaturprogramm**	**Zyklenzahl**
	initiale Denaturierung	95 °C, 10 min, Heizrate 4,4 °C/s	1
	Amplifikation	95 °C, 15 s, Heizrate 4,4 °C/s 60 °C, 60 s, Heizrate 2,2 °C/s	45
	Kühlen	40 °C, 60 s, 1,5 °C/s	1

Die Expression aller Targetgene und des Referenzgens *PPIA* einer Probe wurden als Einfachbestimmung auf ein und derselben Platte gemessen. Eine zweite Bestimmung erfolgte in entsprechender Weise auf einer unabhängigen Platte. In jedem qPCR-Lauf wurde die 1:5 verdünnte cDNA einer Zelllinie als Positivkontrolle sowie A. dest. als Negativkontrolle mitgeführt. In Abhängigkeit vom zu detektierenden Gen dienten die humane kzNZK-Zelllinie A498 (*DKK3*, *PPIA*), die Zelllinie DU-145 aus der Hirnmetastase eines Prostatakarzinoms (*TIMP3*), primäre Vorhautfibroblasten (Kinderklinik UKD; *CA4*) oder Nabelschnurendothelzellen (HUVEC; *EDNRB*, *PECAM1*) als Positivkontrolle.

Die Messung des Fluoreszenzsignals (FAM) erfolgte im Wellenlängenbereich 483 – 533 nm. Die Auswertung der Messungen erfolgte im „absolut quantification“-Modus der LightCycler 480 Software (Version 1.5). Die CT-Werte wurden automatisch anhand des „second derivate maximum“-Algorithmus berechnet. Für die weiteren Berechnungen wurden die CT-Werte der Doppelbestimmung gemittelt. War die mittlere Abweichung dieser CT-Werte $> 0{,}25$, wurde eine dritte Messung durchgeführt und anschließend der Mittelwert aus allen drei Messungen für die weitere Auswertung verwendet.

3.4.3 Relative Quantifizierung mittels ΔΔCT-Methode

Die Auswertung der Messergebnisse der qPCR erfolgte relativ mittels der ΔΔCT-Methode [Livak & Schmittgen, 2001]. Hierbei wurde die Expression des jeweiligen Targetgens zunächst auf die des Referenzgens PPIA normiert. Mit Gl. 3.3 wird die n-fache normierte Expression des Targetgens in einer Probe im Vergleich zu einer Referenzprobe berechnet. Für alle „TaqMan Gene Expression Assays“ wird vom Hersteller eine 100 %ige Effizienz der PCR für Target- und Referenzgen garantiert. Verwendet man zudem für alle zu vergleichenden Proben ein und dieselbe Referenzprobe oder nimmt man eine Referenzprobe mit $\Delta\Delta\mathrm{CT} = 0$ an, so berechnet sich der Expressionswert jeder Probe nach Gl. 3.4. Diese vereinfachte Berechnung wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet.

$$\frac{X_P}{X_C} \;=\; \frac{(1+E)^{-\Delta CT_P}}{(1+E)^{-\Delta CT_C}} \;=\; (1+E)^{-\Delta\Delta CT} \tag{3.3}$$

$$X_P \;=\; 2^{-\Delta CT_P} \tag{3.4}$$

X_P, X_C	...	normierter Expressionswert des betrachteten Targetgens in der Probe P bzw. der Referenzprobe C
E	...	mittlere Effizienz der PCR von Target- und Referenzgen
ΔCT_P, ΔCT_C	...	CT-Differenz zwischen Target- und Referenzgen für die Probe P bzw. Referenzprobe C; $\Delta CT = CT_{Targetgen}$ - $CT_{Referenzgen}$
-$\Delta\Delta CT$	...	-(ΔCT_P - ΔCT_C)

3.5 Immunhistochemische Färbungen

3.5.1 Probenmaterial

Die Validierung der „Microarray“-Ergebnisse mittels Immunhistochemie erfolgte an „tissue microarrays“ (TMAs), die im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit (K. Kalman) im Labor der Klinik für Urologie erstellt wurden. Ein TMA ist ein Paraffinblock, der kleine Stanzzylinder von vielen verschiedenen FFPE-Geweben enthält. In Abhängigkeit vom Durchmesser der Stanzen können mehrere hundert solcher Stanzzylinder auf einem TMA vereint werden. An Dünnschnitten dieser TMAs kann somit mit geringem Zeit- und Materialaufwand eine große Zahl an Gewebeproben immunhistochemisch gefärbt werden.

Das Probenkollektiv umfasste neun TMAs mit Gewebeproben von 146 Patienten, die im Zeitraum von 1993 bis 2006 archiviert worden waren. Darunter waren 133 NZK verschiedener Histologien (123 klarzellig, 10 papillär) und deren autologe nichtmaligne Nierengewebe, die aus der tumortragenden Niere gewonnen wurden. Von den 99 metastasierten primären NZK wurden außerdem 219 autologe Lokalrezidive bzw. Metastasen verschiedener Lokalisationen (Lymphknoten, Lunge, Knochen, Gehirn, Niere, Pankreas, Schilddrüse, Leber, Nebenniere, andere) einbezogen. Weiterhin waren in diesem Kollektiv 13 benigne Nierenläsionen (Onkozytome) enthalten. Pro Gewebeprobe wurden, je nach Verfügbarkeit, 1 – 4 Stanzen (Durchmesser 0,6 mm; Fläche 0,283 mm^2) angefertigt. Alle Proben eines Patienten waren jeweils auf ein und demselben TMA angeordnet.

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden 2 μm dicke Schnitte der TMAs angefertigt und auf silanisierte OT aufgezogen, die dann für die immunhistochemischen Färbungen herangezogen wurden. Außerdem wurde von einem erfahrenen Pathologen die Histologie der Gewebestanzen an repräsentativen, mit Hämalaun und Eosin gefärbten Schnitten gesichert.

3.5.2 Immunhistochemische PECAM1-Färbung — Beurteilung der Mikrogefäßdichte

PECAM1-Färbeprotokoll

Die immunhistochemische Färbung von PECAM1 — besser bekannt als CD31 — dient der Beurteilung der Mikrogefäßdichte (MVD) des untersuchten Präparats. Die Färbung erfolgte im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Dresden. Die Dünnschnitte der TMAs wurden zur Entparaffinierung und Demaskierung mit Kochpuffer (pH = 6,0) 20 min in einem Dampfgarer gekocht und dann 5 min in TBS-Puffer (Fa. Medac) gewaschen.

Die Immunreaktion und Detektion erfolgte bei RT mit dem „UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen“-Kit in einem Färbeautomaten. Zunächst wurde die endogene Peroxidaseaktivität geblockt („Hydrogen Peroxide Block“-Lösung, 10 min), dann wurden die OT 30 min mit dem Anti-CD31-Antikörper (1:3.000 in Probenverdünnungspuffer) und 10 min mit „Primary Antibody Enhancer“ inkubiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation mit HRP-Polymerlösung wurden die OT 8 min mit verdünnter Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (40 μl DAB Plus-Chromogen in 2 ml DAB Plus-Substratpuffer) inkubiert. Zwischen allen Schritten wurden die OT mit TBS-Puffer gespült. Danach erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne durch eine dreißigsekündige Inkubation in saurem Hämatoxylin und anschließendem fünfminütigen Bläuen in lauwarmem Leitungswasser. Dann erfolgte eine Entwässerung der TMA-Schnitte (je 1 min 50 %iger, 80 %iger und 96 %iger Ethanol, 2 min absoluter Ethanol, 3 min Xylol, 5 min Xylol) und die Permanenteindeckung in einem Folieneindeckautomaten.

Beurteilung der PECAM1-Färbung

Zur Beurteilung der Färbung einer Stanze wurde jeweils die gesamte Stanze in einer 100-fachen Vergrößerung betrachtet. Es wurden alle Gefäßanschnitte des vitalen Tumorgewebes bzw. des nichtmalignen Gewebes pro Stanze gezählt, unabhängig von ihrer Färbeintensität. Jeder unabhängige Endothelzellverband wurde als Gefäß gezählt, auch wenn er kein voll-

ständiges Lumen enthielt. Sobald zwischen zwei Gefäßlumina eine Brücke bestand, wurden sie als ein Gefäß gewertet. In die Auswertung wurden alle auswertbaren Stanzen, minimal jedoch zwei Stanzen, einbezogen (2 – 4 Stanzen/Probe). Eine Stanze war auswertbar, wenn sie zu mindestens 30 % aus zusammenhängendem vitalen Tumurgewebe bzw. nichtmalignem Gewebe bestand. Die Gefäßzahl dieser Stanzen wurde, falls nur ein Teil der Stanze auswertbar war, jeweils auf 100 % der Stanze skaliert und anschließend über alle Stanzen gemittelt. Die MVD ergab sich durch Teilung der mittleren Gefäßzahl durch die Fläche der Stanze (0,283 mm^2).

3.5.3 Immunhistochemische TSPAN7-Färbung

TSPAN7-Färbeprotokoll

Die Dünnschnitte der TMAs wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert: 30 min Xylol, 15 min Xylol, 5 min Isopropanol, 5 min Isopropanol, 5 min 96 %iger Ethanol, 5 min 80 %iger Ethanol, 5 min 50 %iger Ethanol und 5 min A. dest. Danach erfolgte eine zehnminütige Demaskierung mittels 0,01 M Citratpuffer (pH = 6,0) bei 121 °C im Autoklaven. Dann wurden die Dünnschnitte innerhalb von 30 min bei RT abgekühlt. Durch zehnminütige Inkubation in 0,05 M, 0,3 % H_2O_2 enthaltenden TBS-Puffer erfolgte eine Umpufferung und Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität des Gewebes. Dann wurden die Schnitte zweimal je 5 min mit TBS-Puffer gewaschen. Für die Immunreaktion wurde der „Vectastain Universal Elite ABC Kit“ verwendet. Für alle folgenden Schritte wurden je 200 μl Lösung pro OT verwendet, die OT während der Inkubation mit einem Deckgläschen abgedeckt und in einer feuchten Kammer gelagert. Zunächst wurden die TMA-Schnitte 45 min mit „Blocking serum“ (1:100 in TBS-Puffer) blockiert und anschließend mit dem Anti-TSPAN7-Antikörper (1:120 in 1:100-verdünntem „Blocking serum“) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Schnitte wurden viermal je 3 min in TBS-Puffer gewaschen und anschließend 45 min bei RT mit dem „EnVision Dual Link System-HRP“ inkubiert. Nach viermaligem Waschen in TBS-Puffer wurden die OT lichtgeschützt und unter mikroskopischer Kontrolle 7 – 10 min mit verdünnter DAB-Lösung (20 μl DAB Plus-Chromogen in 1 ml Substratpuffer) inkubiert. Dann wurden die OT viermal je 3 min in Leitungswasser und einmal 5 min in A. dest. gewaschen. Die Zellkerne wurden 30 s mit frisch filtriertem Mayers Hämalaun gefärbt, anschließend dreimal in Leitungswasser gespült und dann 5 – 10 min in Leitungswasser gebläut. Danach erfolgte eine Entwässerung der TMA-Schnitte (je 1 min 50 %iger, 80 %iger und 96 %iger Ethanol, 2 min absoluter Ethanol, 3 min Xylol, 5 min Xylol) und die Permanenteindeckung mit Entellan.

Beurteilung der TSPAN7-Färbung

Zur Beurteilung der Färbung einer Stanze wurde jeweils die gesamte Stanze in einer 100-fachen Vergrößerung betrachtet. Im Tumorgewebe wurde die Färbung von Tumorzellen, im nichtmalignen Gewebe die von Tubuli- und Glomerulizellen beurteilt. Dabei wurde für die einzelnen Zelltypen die zelluläre TSPAN7-Lokalisation notiert und für jede beobachtete Lokalisation sowohl die Färbeintensität (0 = negativ, 1 = sehr schwach, 2 = schwach, 3 = moderat, 4 = stark) als auch der Anteil TSPAN7-positiver Zellen abgeschätzt. Darüber hin-

aus wurden, analog zur Auswertung der PECAM1-Färbung, die TSPAN7-positiven Gefäße gezählt. In die Auswertung wurden jeweils zwei auswertbare Stanzen (vgl. PECAM1) einbezogen. War nur eine Stanze mit 30 % zusammenhängendem vitalen Tumorgewebe bzw. nichtmalignem Gewebe vorhanden, wurde in dieser Probe trotzdem die Färbung der Tumorzellen beurteilt, da diese in den verschiedenen Stanzen nahezu identisch war. Für eine Auswertung der Gefäßzahl wurden jedoch zwei auswertbare Stanzen vorausgesetzt. Die Ergebnisse dieser Stanzen wurden, falls nur ein Teil der Stanze auswertbar war, jeweils auf 100 % der Stanze skaliert und anschließend über beide Stanzen gemittelt.

3.6 Statistik

Alle im Folgenden beschriebenen statistischen Analysen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit der Software PASW Statistics (Version 18.0.0) vorgenommen. Die in dieser US-amerikanischen Software erstellten Grafiken enthalten Punkte als Dezimaltrennzeichen. Irrtumswahrscheinlichkeiten $p < 0{,}050$ wurden als statistisch signifikant angesehen, $p < 0{,}010$ als sehr signifikant und $p < 0{,}001$ als höchst signifikant. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0{,}100$ wurde als statistischer Trend betrachtet.

3.6.1 Test auf Normalverteilung, Gruppenvergleiche und Korrelationen

Test auf Normalverteilung

Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests ($n \geq 50$; Ein-Stichprobentest) bzw. des Shapiro-Wilks-Tests ($n < 50$) wurde geprüft, ob die zu analysierenden Daten einer Normalverteilung entstammen. Ergab der Test einen p-Wert $< 0{,}050$, wurde von einer Nicht-Normalverteilung ausgegangen. Für die folgenden Analysen wurden dann nicht-parametrische statistische Tests verwendet. Für alle mittels qPCR und Immunhistochemie erhobenen Daten war dies der Fall, so dass für deren statistische Auswertung ausschließlich nicht-parametrische Tests herangezogen wurden.

Gruppenvergleiche

Für den Vergleich der Mediane gepaarter bzw. ungepaarter Proben zweier Gruppen wurde der Wilcoxon- bzw. der (Mann-Whitney)-U-Test verwendet. Waren die Messwerte in einem Zwei-Gruppenvergleich nicht metrisch sondern kategorial, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test (Zwei-Stichprobentest) anstatt des U-Tests verwendet.

Für Drei-Gruppenvergleiche wurde der (Kruskal-Wallis)-H-Test herangezogen. Da für nicht-parametrische Tests keine PostHoc-Tests existieren, wurden im Fall eines signifikanten Ergebnisses des Kruskal-Wallis-Tests ($p < 0{,}050$) U-Tests für die einzelnen Gruppenvergleiche eingesetzt [Köhler *et al.*, 1995].

Die Darstellung von Messwerten einzelner Gruppen erfolgte mit Hilfe von Boxplots. Diese zeigen jeweils den Median (waagerechter Strich) der Gruppe, die Werte zwischen dem ersten und dritten Quartil (Kasten) sowie den kleinsten und größten nicht-extremen Wert

(senkrechte Striche). Weiterhin werden Werte, die mehr als 1,5 Kastenlängen außerhalb des Kastens liegen (Ausreißer; Kreis) und Werte, die mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen (Extremwerte; Stern) dargestellt.

Korrelationen

Mittels des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ρ wurde geprüft, wie gut eine beliebige monotone Funktion den Zusammenhang zwischen zwei Variablen beschreibt. Für $\rho = 0$ besteht keine Korrelation zwischen den untersuchten Parametern, für $0 < \rho \leq 0{,}2$ eine sehr schwache, für $0{,}2 < \rho \leq 0{,}5$ eine schwache, für $0{,}5 < \rho \leq 0{,}7$ eine mittlere, für $0{,}7 < \rho \leq 0{,}9$ eine starke und für $\rho > 0{,}9$ eine sehr starke Korrelation. Für $p < 0{,}050$ wurde ρ als statistisch signifikant von Null verschieden angesehen.

3.6.2 Überlebensanalysen

Mit Hilfe von Überlebensanalysen wurde untersucht, ob klinische oder molekulare Parameter bzw. ihre Kombination mit der Überlebenszeit der Patienten assoziiert sind. Als Überlebenszeiten wurden dabei die Zeiträume von der Nephrektomie bis zur Diagnose von Metastasen oder eines Lokalrezidivs (DFS), bis zum NZK-bedingten Tod des Patienten (TSS) bzw. bis zum Tod des Patienten unabhängig von der Todesursache (OS) untersucht. Als Endpunkt/Ereignis für diese Überlebenszeiten wurde ein Rezidiv (Metastase/Lokalrezidiv; DFS), der NZK-bedingte Tod (TSS) bzw. der Tod des Patienten (OS) angesehen. Für die DFS-Analysen wurden Patienten mit initialen Fernmetastasen (M1) oder unbekanntem initialen Metastasierungszustand (Mx) aus der Analyse ausgeschlossen. In jede der unten beschriebenen Überlebensanalysen können Fälle einbezogen werden, für die der Endpunkt der Analyse noch nicht erreicht, aber eine definierte Nachbeobachtungszeit ohne Eintritt des Ereignisses sicher verfügbar ist (zensierte Fälle).

Kaplan-Meier-Analysen und Sterbetafeln

Zur Veranschaulichung der Überlebensverteilung in verschiedenen Patientengruppen wurden Kaplan-Meier-Kurven verwendet. Die Patienten wurden dabei z. B. anhand der Expressionshöhe eines Gens in distinkte Gruppen unterteilt. Jede Kaplan-Meier-Kurve zeigt den Anteil der Patienten, die noch kein Ereignis erlitten, in Abhängigkeit vom Beobachtungszeitraum. Für jedes eingetretene Ereignis erscheint eine Stufe nach unten in der Kurve, für jeden zensierten Fall ein senkrechter Strich. Je steiler die Überlebenskurve verläuft, desto kürzer ist die Überlebenszeit der Patienten der entsprechenden Gruppe [Altman, 1999]. Ob ein Unterschied bezüglich der Lebenserwartung der Patienten der verschiedenen Gruppen bestand, wurde mit dem (Mantel-Cox)-Log-Rank-Test (2 Gruppen) bzw. dem Log-Rank-Trendtest (> 2 Gruppen) untersucht [Altman, 1999].

Gegebenenfalls wurde mit Hilfe eines exakten Fisher-Tests geprüft, ob sich die Anzahl der eingetretenen Ereignisse in den einzelnen Gruppen signifikant unterscheidet (R 2.10.1) [Venables & Smith, 2010].

Die 5- und 10-Jahresüberlebensraten wurden Sterbetafeln als kumulierter Anteil der überlebenden Individuen zum Zeitpunkt 60 bzw. 120 Monate entnommen.

Regressionsanalyse nach Cox

Das Ausmaß des Einflusses bestimmter Variablen (Kovariaten) auf DFS, TSS bzw. OS wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse nach Cox (proportionale Hazard-Regressionsanalyse) geschätzt. Wurde nur eine Kovariate untersucht (univariates Modell), so ergab die Analyse die „hazard ratio“ (HR) für diese Kovariate. Der Hazard ist die Wahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit, dass eine Person innerhalb eines kleinen Zeitintervalls ein Ereignis erfährt, wenn sie bis zum Beginn dieses Zeitintervalls überlebt hat. Die HR zweier verglichener Gruppen gibt also das Verhältnis der Risiken, ein Ereignis zu erreichen, in Gruppe 1 *vs.* Gruppe 2 an (unter der Annahme einer über die Zeit konstanten HR). Bei kontinuierlichen Variablen gibt die HR die Erhöhung bzw. Verringerung dieses Risikos an, wenn die betrachtete Kovariate in der angegebenen Maßeinheit um eine Einheit steigt (z. B. Tumorgröße 4 *vs.* 5 cm) [Ziegler *et al.*, 2007; Altman, 1999]. Wurden in der Cox-Regressionsanalyse mehrere Kovariaten simultan untersucht (multivariates Modell), so wurden die entsprechenden HRs aufeinander adjustiert. In die multivariaten Analysen wurden nur Kovariaten mit $p < 0{,}100$ in der univariaten Analyse einbezogen. Alle Parameter, die keinen zusätzlichen Einfluss auf den betrachteten Überlebensparameter ausübten (basierend auf der „likelihood ratio“; $p > 0{,}050$), wurden schrittweise aus dem Modell entfernt. Das heißt, das Modell enthielt am Ende nur noch die Kovariaten, die unabhängig voneinander einen Einfluss auf den Überlebensparameter ausübten mit ihren zugehörigen, auf die anderen Parameter adjustierten HR.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der „Microarray“-Analysen an pulmonalen Metastasen und anschließend an Primärtumoren des kzNZK dargelegt. Danach wird die Validierung ausgewählter Kandidaten mittels qPCR und Immunhistochemie beschrieben. Das DFS bezeichnet, wenn nicht anders angegeben, die Zeit von der Nephrektomie bis zur Entstehung (Diagnose/Operation) der Metastasen. Die Begriffe „späte Metastasen“ und „frühe Metastasen“ bzw. „spät metastasiert“ und „früh metastasiert“ geben ebenfalls den Zeitraum von der Nephrektomie bis zur Diagnose manifester Metastasen wieder.

4.1 „Microarray“-Analysen

4.1.1 Spät *vs.* früh entwickelte pulmonale Metastasen

Insgesamt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 24 pulmonale kzNZK-Metastasen, die zwischen März 2003 und August 2006 operativ entfernt worden waren, hinsichtlich ihrer genomweiten Expression untersucht. Hierbei wurden Unterschiede zwischen unterschiedlich langen DFS sowie verschiedenen Metastasenzahlen ermittelt. Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf dem erstgenannten Punkt. Die Daten aller 21 initial analysierten Metastasen (vgl. Anhang) wurden in die Hintergrundkorrektur und Normalisierung der Expressionswerte einbezogen und die erhaltenen präprozessierten Daten für die Identifizierung der differenziell exprimierten Gene und die Genontologieanalysen genutzt. Zu einem späteren Zeitpunkt, zusammen mit den Primärtumoren, wurden drei weitere Metastasen (vgl. Anhang) zu Validierungszwecken in die Analysen einbezogen. Um die Expressionsdaten der zu den verschiedenen Zeitpunkten untersuchten Metastasen und Primärtumoren vergleichen zu können, wurden die Daten aller Proben gemeinsam hintergrundkorrigiert und normalisiert. Die dabei erhaltenen Expressionswerte der zuvor ermittelten differenziell exprimierten Gene wurden dann als Ausgangspunkt zur Erstellung und Validierung der Vorhersagemodelle verwendet.

Identifikation differenziell exprimierter Gene

Zunächst wurden die Expressionsprofile spät und früh entwickelter kzNZK-Metastasen miteinander verglichen. Erstere waren erst lange nach der Entfernung des Primärtumors entstanden (DFS $\geq$ 60 Monate); letztere waren bereits initial bzw. sehr früh nach der Nephrektomie diagnostiziert worden (DFS $\leq$ 9 Monate; Tab. 4.1). Es wurden zunächst die Gene identifiziert, deren mittlere Expression sich in den beiden Gruppen um das mindestens 1,8-fache unterschied. Aus diesen Genen wurden jene ermittelt, die sich zwischen den Gruppen statistisch signifikant in ihrer Expression unterschieden ($r = 1000$, $q < 0{,}050$). Dabei ergaben sich 306 Gene (414 Sondensets), die zwischen späten und frühen Metastasen differenziell exprimiert waren. Siebenundzwanzig (9 %) dieser Gene waren in späten Metastasen herunter- und 279 (91 %) heraufreguliert. Abb. 4.1 veranschaulicht die Expression dieser 306 Gene in den untersuchten Proben und zeigt, dass die Proben sich anhand der differenziell exprimierten Gene zwei Clustern zuordnen lassen, die genau der Gruppenzuordnung in späte und frühe Metastasen entspricht.

Tab. 4.1: Mittels „Microarrays“ analysierte pulmonale Metastasen klarzelliger Nierenzellkarzinome. Angegeben sind die interne Identifikationsnummer des Patienten, die Bezeichnung des „Microarrays“, die klinischen Parameter des entsprechenden Primärtumors und Daten zum Krankheitsverlauf des Patienten. Der Nachbeobachtungszeitraum ist die Zeitspanne von der Entfernung der Metastasen bis zur letzten ambulanten Vorstellung bzw. bis zum Tod des Patienten. Der Status bezeichnet den Krankheitszustand des Patienten zum Zeitpunkt der letzten ambulanten Vorstellung bzw. zum Todeszeitpunkt Die Gruppenzugehörigkeit kennzeichnet die Gruppe, der die jeweilige Gewebeprobe in der „Microarray“-Analyse zugeordnet wurde. Vor der Diagnose der untersuchten Lungenmetastasen wurden bei keinem Patienten Metastasen in einer anderen Lokalisation diagnostiziert. Keiner der Patienten hatte eine systemische Therapie vor der operativen Entfernung der Metastasen erhalten. (ANED = lebt, kein Anzeichen für ein kzNZK-Rezidiv; AWD = lebt mit manifestem kzNZK-Rezidiv; DFS = rezidivfreies Überleben = Zeitraum von Nephrektomie bis zur operativen Entfernung der Metastasen; DOD = am kzNZK verstorben; G = Tumorgrad; ID = Identifikationsnummer; kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarzinom; M = distante Metastasierung; Mets = Metastasen; N = Lymphknotenstatus; NA = Daten nicht verfügbar; T = Tumorstadium; [1] simultane Weichteilmetastasen; [2] stammen von ein und derselben Patientin, wurden aber als eigenständige biologische Tumorherde in die Analysen einbezogen)

Patienten-ID	„Microarray“-Bezeichnung	Geschlecht	Primärtumor pT	pN	M	G	DFS [Monate]	Nachbeobachtung [Monate]	Status	Mets im Verlauf (nach Monaten)	Gruppenzugehörigkeit
8	Met3	m	3	0	0	1	95	6	DOD	zerebral (4)	späte Mets
34	Met14	m	NA	NA	NA	NA	60	36	ANED		späte Mets
3	Met15	w	2	0	0	NA	156	53	AWD	pulmonal (53)	späte Mets
49	Met16 [1,2]	w	1	0	0	2	83	27	AWD	pulmonal (21)	späte Mets
49	Met17 [1,2]	w	1	0	0	2	83	27	AWD	pulmonal (21)	späte Mets
2	Met20	m	3	0	0	1	114	35	DOD	ossär (8)	späte Mets
28	Met1	m	3	0	0	3	1	9	DOD	zerebral (6)	frühe Mets
54	Met8	m	3	0	1	NA	2	16	AWD	pulmonal (14)	frühe Mets
42	Met9	m	2	x (cN0)	1	2	9	0	NA		frühe Mets
57	Met12	m	2	x (cN0)	1	3	1	11	AWD	pulmonal (8)	frühe Mets
37	Met13	m	3	0	1	3	1	12	AWD	zerebral (12)	frühe Mets

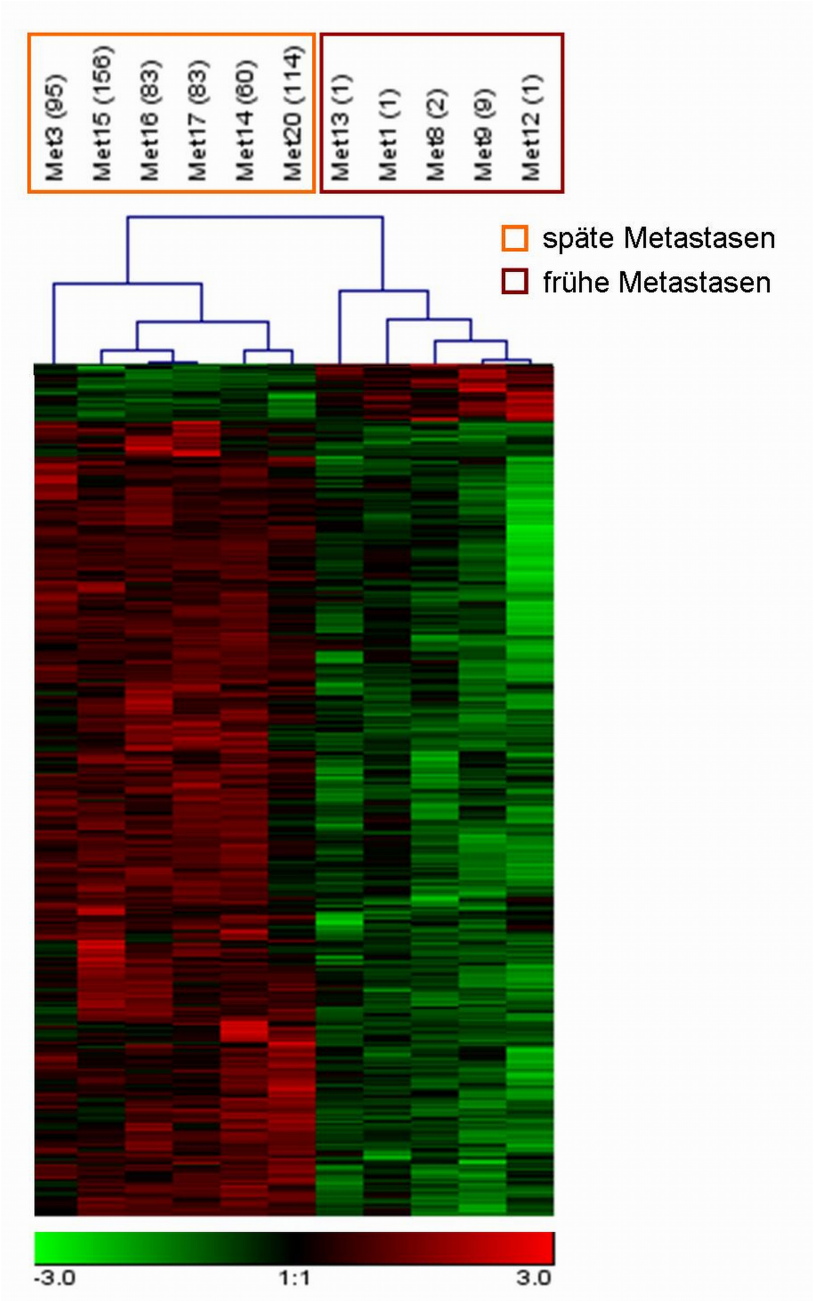


Abb. 4.1: Hierarchisches Clustern spät und früh entstandener pulmonaler Metastasen. Das Clustern erfolgte anhand der 306 zwischen späten und frühen Metastasen differenziell exprimierten Gene (414 Sondensets). Die Proben sind mit den „Microarray"-Bezeichnungen gekennzeichnet, in Klammern ist jeweils das rezidivfreie Überleben bis zur Entstehung der untersuchten Metastase in Monaten angegeben.

Überrepräsentierte biologische Prozesse

Unter den 306 zwischen späten und frühen Metastasen differenziell exprimierten Genen waren beispielsweise die Angiogenese, die Zellmigration oder die Zelladhäsion überrepräsentiert (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Überrepräsentierte biologische Prozesse innerhalb der in späten *vs.* frühen Metastasen differenziell exprimierten Gene. Dargestellt sind die Genontologieterme der relevanten, statistisch signifikant angereicherten biologischen Prozesse, die Anzahl der jeweils zugehörigen Gene innerhalb der differenziell exprimierten Gene, die n-fache Anreicherung dieses Prozesses innerhalb der differenziell exprimierten Gene im Vergleich zum gesamten „Microarray“ sowie deren statistische Signifikanz q.

Genontologieterm	Anzahl Gene	n-fache Anreicherung	q-Wert
„angiogenesis“	18	6,8	< 0,001
„blood vessel development“	24	6,9	< 0,001
„cell adhesion“	37	2,7	< 0,001
„cell fate commitment“	9	5,8	< 0,001
„cell migration“	21	4,3	< 0,001
„cell surface receptor linked signal transduction“	52	2,0	< 0,001
„regulation of signal transduction“	28	2,8	< 0,001

Erstellung eines Vorhersagemodells

Sechs der 306 differenziell exprimierten Gene reichten aus, um die elf untersuchten Metastasen in einer Kreuzvalidierung der jeweils richtigen Gruppe zuzuordnen (WV; p = 0,002; Tab. 4.3). Außerdem wurde anhand dieser sechs Gene die korrekte Gruppenzugehörigkeit für drei von vier weiteren Metastasen vorhergesagt (WV), deren DFS zu dem der initial verglichenen Gruppen passte (127, 2, 0 bzw. 0 für Met25, Met22, NZK21 bzw. NZK20). Die beiden Metastasen NZK20 und NZK21 wurden nicht zusammen mit dem initialen Kollektiv, sondern zu einem späteren Zeitpunkt untersucht. Eine dieser Metastasen (NZK20) wurde der Gruppe der späten Metastasen zugeordnet. Ein anhand aller 306 differenziell exprimierter Gene erstellter Vorhersagealgorithmus ergab eine identische Gruppenzuordnung der Proben.

Tab. 4.3: 6-Genmodell zur Einordnung der Metastasen mit unterschiedlich langen Manifestationszeiträumen. Die dargestellten n-fachen Expressionsänderungen und Irrtumswahrscheinlichkeiten q beziehen sich jeweils auf das genannte Sondenset. (DFS = rezidivfreies Überleben)

Gensymbol	Sondenset	n-fache Expressionsänderung (späte *vs.* frühe Metastasen)	q-Wert
HSPG2	201655_s_at	2,8	0,022
ICAM2	213620_s_at	2,6	0,022
PECAM1	208982_at	3,0	0,022
SFTPC	205982_x_at	17,6	0,022
TPM2	204083_s_at	2,6	0,049
TSPAN7	202242_at	6,5	0,022

4.1.2 Nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierte primäre Nierenzellkarzinome

Insgesamt wurde die Genexpression von 24 primären kzNZK, die zwischen November 1994 und Januar 2003 operativ entfernt worden waren, mittels „Microarray"-Analysen untersucht (Tab. 4.4). Bei sieben Patienten wurden in einem Nachbeobachtungszeitraum von mindestens acht Jahren nach Nephrektomie keine Metastasen diagnostiziert (nicht metastasiert), neun Patienten entwickelten 45 Monate oder später nach Nephrektomie Metastasen (spät metastasiert) und acht Patienten hatten Metastasen innerhalb von sechs Monaten nach Nephrektomie entwickelt. Da die Metastasen und Primärtumoren in weiterführenden Analysen vergleichend betrachtet werden sollten, wurden die „Microarrays" beider Gruppen gemeinsam hintergrundkorrigiert und normalisiert. Anschließend wurden die primären kzNZK einer „batch"-Korrektur unterzogen. Die Proben wurden unterschiedlichen „batches" zugeordnet, wenn sie mit einer neuen Charge des „One-Cycle Target Labeling and Control Reagents Kits" bearbeitet wurden („batch" 1), einer anderen Probenquelle entstammten („batch" 2 aus Klinik für Urologie, Jena) bzw. zeitlich deutlich früher (etwa 1 Monat) bearbeitet wurden („batch" 3). Alle anderen Proben unterlagen keinen so augenscheinlichen Einflüssen („batch" 4). Nach der „batch"-Korrektur wurden die Daten von primären kzNZK und Metastasen gemeinsam gefiltert. Diese „batch"-korrigierten und gefilterten Daten (18.672 Sondensets) dienten als Ausgangspunkt für die weitere Analyse der Primärtumoren.

Identifikation differenziell exprimierter Gene

In nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierten primären kzNZK waren 356 Gene (457 Sondensets) statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert (ANOVA: $q < 0{,}050$). Alle diese Gene waren auch im PostHoc-Test zwischen mindestens zwei Gruppen statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert und zeigten eine intensitätsabhängige $\geq 1{,}8$-fache Expressionsänderung zwischen diesen zwei Gruppen. Somit waren alle 356 Gene in mendestens zwei der betrachteten Gruppen differenziell exprimiert. In spät *vs.* früh metastasierten primären kzNZK waren 166 Gene (214 Sondensets) dieser 356 Gene differenziell exprimiert, in nicht *vs.* spät metastasierten Tumoren 139 Gene (177 Sondensets) und in nicht *vs.* früh metastasierten 350 Gene (450 Sondensets). Die 356 in nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierten primären kzNZK differenziell exprimierten Gene ordneten die kzNZK im hierarchischen Clustern nahezu vollständig entsprechend dieser drei Gruppen nebeneinander an (Abb. 4.2). Die Baumstruktur zeigte zwei große Cluster, wobei nicht und früh metastasierte Tumoren sich eindeutig unterschieden, spät metastasierte kzNZK ordneten sich zwischen diesen beiden Gruppen an. Die mittlere „Expression" von 337/457 Sondensets (74 %), die die 356 differenziell exprimierten Gene repräsentieren, zeigte eine kontinuierliche Deregulation von nicht über spät zu früh metastasierten Tumoren („k-means clustering"; nicht gezeigt). Zweiundsiebzig weitere Sondensets (17 %) wiesen eine ähnliche mittlere „Expression" in nicht und spät metastasierten kzNZK auf, die sich von der in früh metastasierten unterschied (nicht gezeigt).

Tab. 4.4: Mittels „Microarrays“ analysierte primäre klarzellige Nierenzellkarzinome. Angegeben sind die interne Identifikationsnummer des Patienten, die Bezeichnung des „Microarrays“ sowie die klinischen Parameter und Daten zum Krankheitsverlauf der Patienten. Der Status bezeichnet den Krankheitszustand des Patienten zur letzten ambulanten Vorstellung bzw. zum Tod. Außerdem sind die Gruppe sowie der „batch“ angegeben, denen die jeweilige Gewebeprobe in der Analyse zugeordnet wurde. Die metastasierten Tumoren umfassen sowohl die spät als auch die früh metastasierten. (ANED = lebt, kein Anzeichen für ein kzNZK-Rezidiv = kein bzw. operativ vollständig entferntes Rezidiv; AWD = lebt mit manifestem kzNZK-Rezidiv; DFS = rezidivfreies Überleben bis zur Metastasendiagnose; DOD = am kzNZK verstorben; DUC = verstorben an unbekannter Ursache; G = Tumorgrad; hep = hepatisch; ID = Identifikationsnummer; kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarzinom; LK = Lymphknoten; M = distante Metastasierung; m = männlich; med = mediastinal; met. = metastasiert; N = Lymphknotenstatus; NN = Nebenniere; oss = ossär; pulm = pulmonal; T = Tumorstadium; w = weiblich; [1] autolog zu Met16 und Met17; [2] Probe aus Universitätsklinikum Jena; [3] kutane Metastasen reseziert, aber erneute nicht-resezierte Metastasen 47 Monate nach Nephrektomie)

Patienten-ID	„Microarray“-Bezeichnung	Geschlecht	pT	pN	M	G	DFS [Monate]	Metastasenlokalisation	Nachbeobachtung [Monate]	Status	Gruppenzugehörigkeit	„batch“
276309	NZK6	m	2	0	0	2			155	ANED	nicht met.	4
215019	NZK18	w	1b	0	0	3			130	ANED	nicht met.	1
283326	NZK19_Wied	m	2	0	0	2			140	ANED	nicht met.	1
242420	NZK12	w	3b	0	0	2			143	ANED	nicht met.	4
177578	NZK14	m	1a	0	0	2			148	ANED	nicht met.	4
278661	NZK8	w	2	0	0	2			99	ANED	nicht met.	4
262303	NZK10	w	1b	0	0	3			112	ANED	nicht met.	4
241553	NZK1	m	1b	0	0	2	106	LK, oss, NN	121	AWD	spät met.	3
276395	NZK11	w	1a	0	0	3	63	pulm	75	ANED	spät met.	4
267976	NZK3 [1]	w	1b	0	0	2	83	pulm, Weichteil	111	ANED	spät met.	4
348763	NZK5	w	2	0	0	2	60	oss	60	AWD	spät met.	4
113585	NZK13	m	1a	0	0	2	96	LK, pulm	104	ANED	spät met.	4
366745	NZK9	w	2	0	0	2	45	pulm, oss, NN	48	AWD	spät met.	4
258166	NZK16	m	1b	0	0	2	60	NN, renal, Pankreas, Ohrspeicheldrüse	63	DOD	spät met.	1
14	NZK26 [2]	m	3a	0	0	2	82	pulm, kutan	85	AWD	spät met.	2
144	NZK27 [2]	m	3a	0	0	3	90	pulm	104	DOD	spät met.	2
193557	NZK7	m	1a	2	0	3	0	LK	20	DUC	früh met.	4
179659	NZK17	m	3b	0	1	3	0	pulm, med	9	DOD	früh met.	1
221838	NZK4	w	2	0	0	2	6	pulm, NN, renal	25	AWD	früh met.	4
226	NZK22 [2]	w	2	0	0	2	1	pulm	55	ANED	früh met.	2
269	NZK23 [2]	w	2	0	1	2	0	kutan	123	AWD [3]	früh met.	2
391	NZK24 [2]	m	2	0	1	2	0	pulm	36	ANED	früh met.	2
2558	NZK25 [2]	m	3a	1	0	2	0	LK	46	DOD	früh met.	2
217145	NZK2	m	1b	0	1	2	0	pulm, hep	18	DOD	früh met.	3

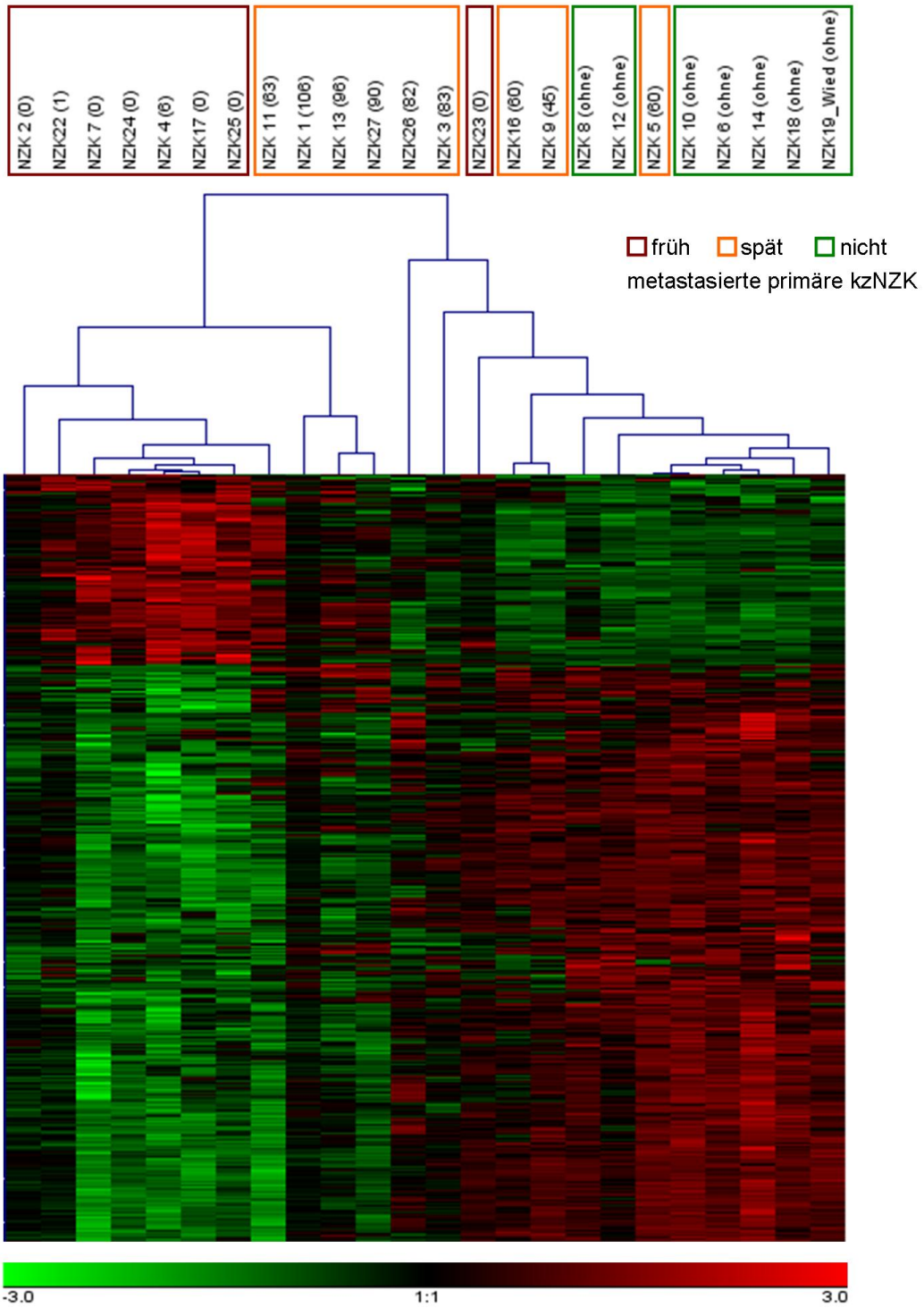


Abb. 4.2: Hierarchisches Clustern nicht, spät und früh metastasierter primärer klarzelliger Nierenzellkarzinome. Das Clustern erfolgte anhand der 356 in nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierten Primärtumoren differenziell exprimierten Gene (457 Sondensets). Die Proben sind mit den „Microarray“-Bezeichnungen gekennzeichnet. In Klammern ist das rezidivfreie Überleben des jeweiligen Patienten bis zur Metastasendiagnose in Monaten angegeben. (kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarzinom; ohne = nicht metastasiert mit Nachbeobachtungszeit $\geq$ 99 Monate)

Auch die 166 zwischen spät und früh metastasierten Primärtumoren differenziell exprimierten Gene trennten diese beiden Gruppen in einer Clusteranalyse nahezu vollständig voneinander (Abb. 4.3).

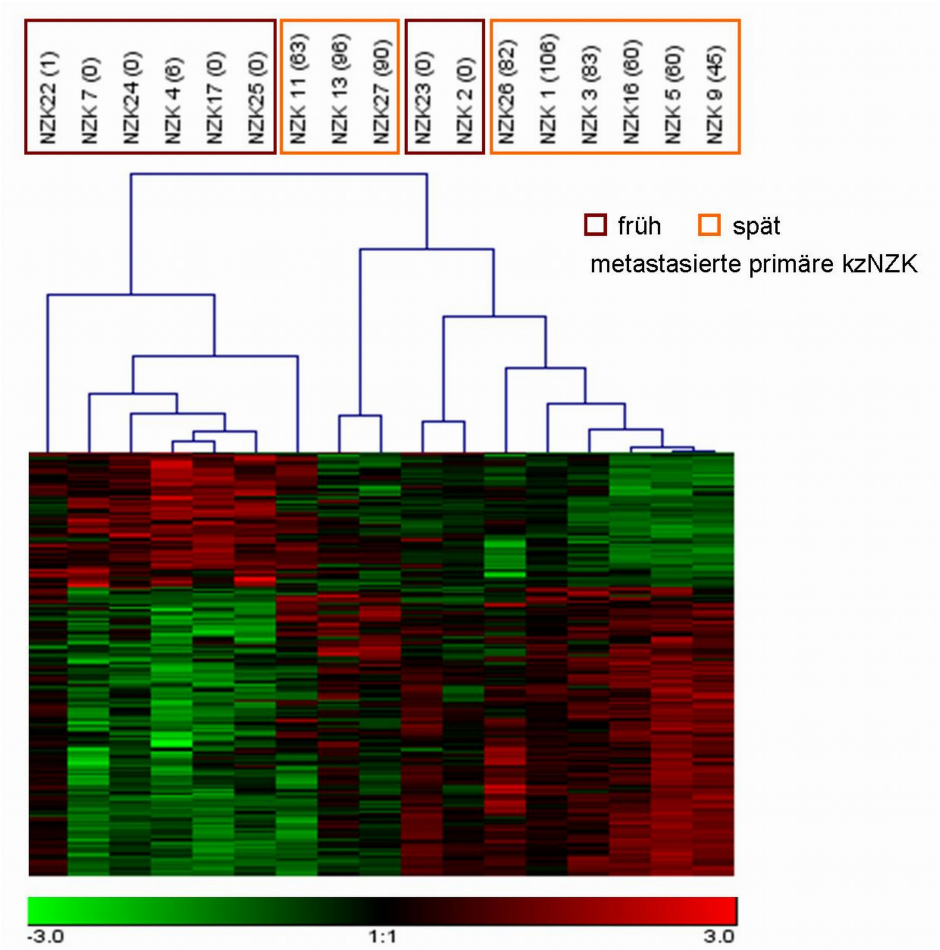


Abb. 4.3: Hierarchisches Clustern spät und früh metastasierter primärer klarzelliger Nierenzellkarzinome. Das Clustern erfolgte anhand der 166 in spät *vs.* früh metastasierten Primärtumoren differenziell exprimierten Gene. Die Proben sind mit den „Microarray"-Bezeichnungen gekennzeichnet. In Klammern ist das rezidivfreie Überleben des jeweiligen Patienten bis zur Metastasendiagnose in Monaten angegeben. (kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarzinom)

Überrepräsentierte biologische Prozesse

Unter den 356 in nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierten primären kzNZK differenziell exprimierten Genen (457 Sondensets) waren die Prozesse der Vaskularisierung, der Zelladhäsion, des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung und der Zellmigration überrepräsentiert (Tab. 4.5).

Unter den 166 zwischen spät und früh metastasierten Primärtumoren differenziell exprimierten Genen (214 Sondensets) waren keine biologischen Prozesse statistisch signifikant angereichert.

Tab. 4.5: Überrepräsentierte biologische Prozesse innerhalb der 356 in nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierten primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen differenziell exprimierten Gene (457 Sondensets). Dargestellt sind die Genontologieterme der relevanten, statistisch signifikant angereicherten biologischen Prozesse, die Anzahl der jeweils zugehörigen Gene innerhalb der differenziell exprimierten Gene, die n-fache Anreicherung dieses Prozesses innerhalb der differenziell exprimierten Gene im Vergleich zum gesamten „Microarray“ sowie deren statistische Signifikanz q.

Genontologieterm	Anzahl Gene	n-fache Anreicherung	q-Wert
„angiogenesis“	19	5,1	< 0,001
„blood vessel development“	22	4,2	< 0,001
„cell adhesion“	32	2,2	0,004
„cell cycle“	32	2,0	0,018
„cell differentiation“	64	1,9	< 0,001
„cell surface receptor linked signal transduction“	50	1,6	0,048
„cytoskeleton organization“	21	2,3	0,038
„endothelial cell differentiation“	6	18,0	0,002
„mitosis“	16	3,4	0,005
„regulation of cell differentiation“	23	2,3	0,027
„regulation of cell migration“	14	4,0	0,004
„regulation of cell proliferation“	31	1,9	0,045
„regulation of cell shape“	7	6,2	0,036

4.1.3 Vergleich der Ergebnisse der Metastasen- und Primärtumoranalysen

Sowohl bei der Untersuchung der pulmonalen Metastasen als auch bei der der primären kzNZK wurde der Vergleich späte *vs.* frühe Metastasierung vorgenommen. Zwischen spät und früh entwickelten Metastasen waren 306 Gene (414 Sondensets) differenziell exprimiert, zwischen spät und früh metastasierten Primärtumoren 166 Gene (214 Sondensets). Sechsunddreißig Gene (45 Sondensets) waren dabei in beiden Listen enthalten.

Die beiden Genlisten wurden außerdem mit Ergebnissen publizierter „Microarray“-Studien an primären kzNZK verglichen. In diesen Studien wurden ebenfalls Gene identifiziert, die mit der Metastasierung bzw. dem Überleben der Patienten assoziiert waren [Lane *et al.*, 2009; Kosari *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2001]. Von den insgesamt 105 verschiedenen Genen, die diese Studien lieferten, waren 23 auch zwischen späten und frühen Metastasen differenziell exprimiert und 17 zwischen spät und früh metastasierten primären kzNZK (Abb. 4.4). Elf Gene wurden sowohl im Vergleich der Metastasen- und Primärtumorsubgruppen dieser Arbeit als auch in anderen Arbeiten identifiziert (Tab. 4.6). Diese elf Gene waren in Metastasen und primären kzNZK in dieselbe Richtung reguliert, das heißt jeweils heraufreguliert in späten im Vergleich zu frühen Metastasen und in spät im Vergleich zu früh metastasierten primären kzNZK. Für neun dieser elf Gene war die n-fache Expressionsänderung in spät *vs.* früh entwickelten Metastasen deutlich höher als in spät *vs.* früh metastasierten primären kzNZK (Tab. 4.6).

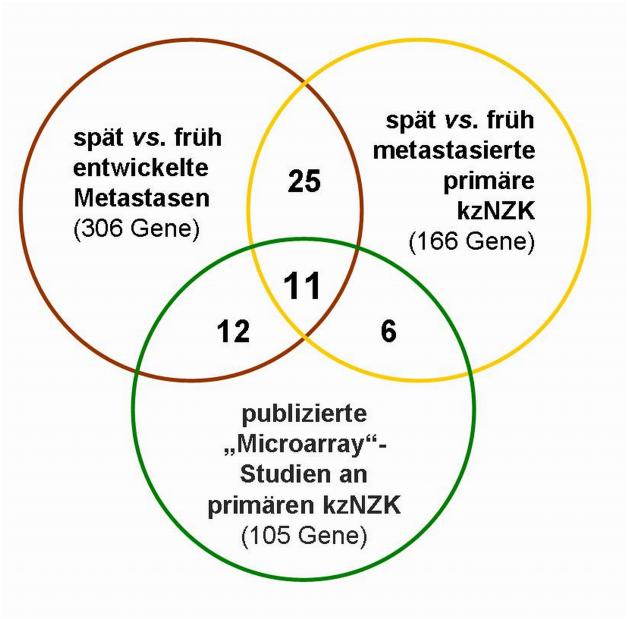


Abb. 4.4: Schnittmengen der zwischen später und früher Metastasierung differenziell exprimierten Gene in Metastasen und Primärtumoren des klarzelligen Nierenzellkarzinoms. Dargestellt ist die Gesamtheit der Gene, die in dieser Arbeit zwischen spät und früh entstandenen pulmonalen Metastasen (n = 11; rot) bzw. zwischen spät und früh metastasierten Primärtumoren (n = 17; gelb) als differenziell exprimiert identifiziert wurden. Der grüne Kreis repräsentiert eine Liste aus 105 Genen, die in publizierten „Microarray“-Studien an primären kzNZK eine Assoziation zu Metastasierung bzw. tumorspezifischem Überleben der Patienten zeigten [Lane *et al.*, 2009; Kosari *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2001]. Die Zahlen in den Schnittbereichen beziffern jeweils die Anzahl der Gene, die in den entsprechenden Studien überlappten. Aufgrund der Verwendung anderer „Array“-Plattformen in den publizierten Studien wurden hier lediglich annotierte Gene verglichen. (kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarzinom)

Tab. 4.6: In der vorliegenden Arbeit und in publizierten „Microarray“-Studien an klarzelligen Nierenzellkarziomen als metastasierungsassoziiert identifizierte Gene. Diese Gene waren sowohl in späten *vs.* frühen Metastasen als auch in spät *vs.* früh metastasierten Primärtumoren differenziell exprimiert. Sie wurden zudem in publizierten „Microarray“-Studien an primären kzNZK als assoziiert zur Metastasierung bzw. zum rezidivfreien Überleben identifiziert. Die n-fache Expressionsänderung entspricht jeweils dem Mittelwert aller für das jeweilige Gen auswertbaren Sondensets. (kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarziom)

	n-fache Expressionsänderung		
Gensymbol	**Metastasen** (spät *vs.* früh)	**primäre kzNZK** (spät *vs.* früh metastasiert)	**publizierte „Microarray“-Studien**
EDNRB	3,9	1,7	Takahashi *et al.* [2001]
EMCN	5,1	2,3	Kosari *et al.* [2005]
LDB2	3,3	2,0	Kosari *et al.* [2005]
PECAM1	2,8	1,3	Takahashi *et al.* [2001]
PARM1	2,1	2,0	Kosari *et al.* [2005]
PTPRB	2,7	1,8	Kosari *et al.* [2005]
RGS5	3,8	2,4	Takahashi *et al.* [2001]
SYNPO2	1,4	1,8	Kosari *et al.* [2005]
TEK	3,1	2,1	Kosari *et al.* [2005]
TIMP3	3,2	1,4	Takahashi *et al.* [2001]
TSPAN7	6,9	2,2	Takahashi *et al.* [2001]

4.1.4 Nicht metastasierte *vs.* metastasierte primäre Nierenzellkarzinome

Identifikation differenziell exprimierter Gene

Zwischen nicht metastasierten und metastasierten primären kzNZK, die sowohl spät als auch früh metastasierte Tumoren umfassten, waren 344 Gene (453 Sondensets) statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert ($q < 0{,}050$). Von diesen besaßen wiederum 128 Gene (169 Sondensets) einen intensitätsabhängigen Expressionsunterschied von mindestens 1,8 und waren somit definitionsgemäß differenziell exprimiert. Fünfzehn der 128 Gene waren in nicht metastasierten kzNZK herunter- und 113 heraufreguliert. Abb. 4.5 veranschaulicht die Expression dieser Gene in den untersuchten primären kzNZK. Die Proben ließen sich anhand dieser Gene zwei großen Clustern zuordnen, wobei die nicht metastasierten Tumoren ein eigenes Subcluster bildeten.

Die mittlere „Expression“ von 101 der 169 Sondensets (60 %), die die 128 differenziell exprimierten Gene repräsentieren, zeigte eine kontinuierliche Deregulation von nicht über spät zu früh metastasierten kzNZK („k-means clustering“; nicht gezeigt). Die Gene der restlichen 68 Sondensets zeigten in spät und früh metastasierten Primärtumoren eine ähnliche mittlere „Expressionshöhe“, die geringer als die der nicht metastasierten Tumoren war (nicht gezeigt).

Weiterhin waren 99 der 128 in nicht metastasierten *vs.* metastasierten kzNZK differenziell exprimierten Gene (77 %) auch in den 356 in nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierten primären kzNZK differenziell exprimierten Genen enthalten.

Überrepräsentierte biologische Prozesse

Unter den 128 in nicht metastasierten *vs.* metastasierten primären kzNZK differenziell exprimierten Genen waren die Vaskularisierung des Tumors und die Zellmigration überrepräsentiert (Tab. 4.7).

Tab. 4.7: Überrepräsentierte biologische Prozesse innerhalb der 128 in nicht metastasierten *vs.* metastasierten primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen differenziell exprimierten Gene (169 Sondensets). Dargestellt sind die Genontologieterme der relevanten, statistisch signifikant angereicherten biologischen Prozesse, die Anzahl der jeweils zugehörigen Gene innerhalb der differenziell exprimierten Gene, die n-fache Anreicherung dieses Prozesses innerhalb der differenziell exprimierten Gene im Vergleich zum gesamten „Microarray“ sowie deren statistische Signifikanz q.

Genontologieterm	Anzahl Gene	n-fache Anreicherung	q-Wert
„angiogenesis“	8	5,9	0,002
„blood vessel development“	11	8,1	0,009
„regulation of cell migration“	8	5,9	0,032

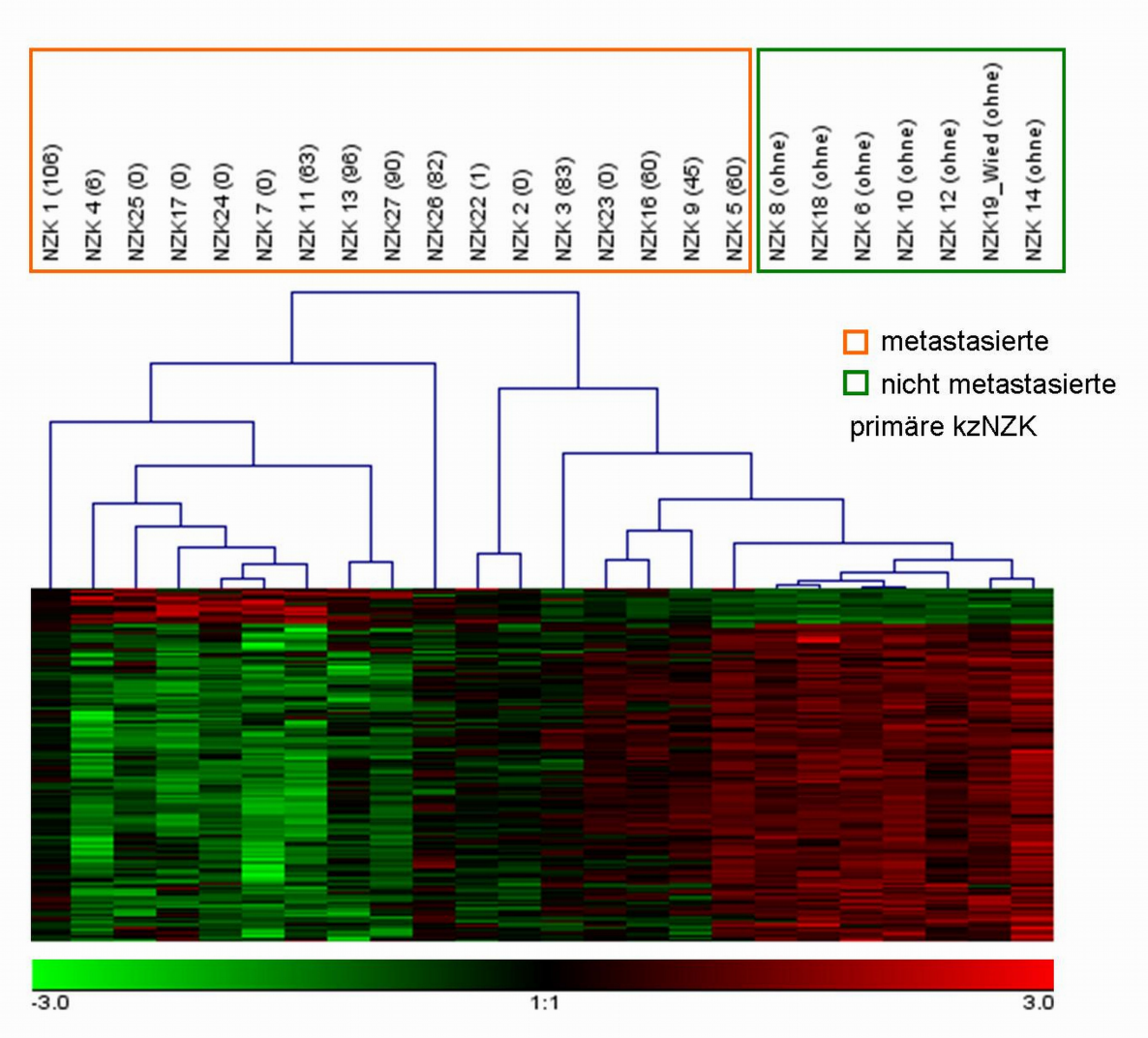


Abb. 4.5: Hierarchisches Clustern nicht metastasierter und metastasierter primärer klarzelliger Nierenzellkarzinome. Das Clustern erfolgte anhand der 128 in nicht metastasierten *vs.* metastasierten kzNZK differenziell exprimierten Gene. Die Proben sind mit den „Microarray"-Bezeichnungen gekennzeichnet, in Klammern ist jeweils das rezidivfreie Überleben in Monaten angegeben. (kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarziom; ohne = nicht metastasiert mit Nachbeobachtungszeit $\geq$ 99 Monate)

Erstellung eines Vorhersagemodells

Aus den 169 Sondensets der 128 differenziell exprimierten Gene wurden zunächst die Top-50 ermittelt, die anschließend als Ausgangspunkt zur Erstellung eines Vorhersagemodells dienten. Anhand eines KNN-Algorithmus wurden fünf Gene identifiziert, die in einer Kreuzvalidierung nicht metastasierte Primärtumoren sowohl von metastasierten als auch von spät metastasierten kzNZK eindeutig unterschieden ($p < 0{,}001$; Tab. 4.8).

Dieses 5-Genmodell ordnete außerdem 22 der 24 pulmonalen Metastasen der Gruppe der metastasierten primären kzNZK zu (Met8 & Met17 den nicht metastasierten kzNZK zugeordnet). Auch ein KNN-Modell basierend auf allen 169 Sondensets der 128 in nicht metastasierten *vs.* metastasierten kzNZK differenziell exprimierten Gene ordnete 22 der 24 Metastasen den metastasierten kzNZK zu (NZK15 & NZK20 den nicht metastasierten kzNZK zugeordnet).

Tab. 4.8: 5-Genmodell zur Unterscheidung nicht metastasierter und metastasierter primärer klarzelliger Nierenzellkarzinome. Die n-fachen Expressionsänderungen und q-Werte beziehen sich jeweils auf das genannte Sondenset. (kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarziom; met. = metastasiert)

Gensymbol	Sondenset	n-fache Expressions-änderung (nicht met. *vs.* met. kzNZK)	q-Wert
CAPN6	202965_s_at	-3,7	0,036
CENPV	226611_s_at	5,8	0,020
FABP7	205029_s_at	20,3	0,020
IGFBP5	1555997_s_at	4,7	0,020
SAA1/SAA2	214456_x_at	-5,3	0,030

4.2 Validierung der „Microarray“-Ergebnisse

4.2.1 Quantitative PCR — „Screening“ mittels „TaqMan Low Density Arrays“

Auswahl geeigneter Gene für die Validierungsstudien

Die in den „Microarray“-Analysen identifizierte differenzielle Expression sollte für 21 ausgewählte Targetgene mittels qPCR geprüft werden. Hierzu wurde die Expression dieser Gene und der beiden Referenzgene *PPIA* und *TBP* mittels TLDAs quantifiziert. In den „Microarray“-Analysen zeigten die Expressionswerte der *PPIA*- (226336_at) und *TBP*-Sondensets (203135_at), deren Genspezifität vorher anhand eines Sequenzabgleichs bestätigt wurde, eine geringe Variabilität über alle untersuchten Metastasen und Primärtumoren. Die Variationskoeffizienten betrugen 0,042 bzw. 0,034 im Vergleich zum medianen Variationskoeffizienten aller Sondensets von 0,073 (0,006 – 0,595; nach „batch“-Korrektur für primäre kzNZK und Filtern).

Die für die Validierung ausgewählten Targetgene zeigten in den „Microarray“-Analysen eine differenzielle Expression in spät *vs.* früh metastasierten und/oder in nicht metastasierten *vs.* metastasierten primären kzNZK:

- neun Gene, die sowohl in Metastasen als auch in primären kzNZK potenziell eine **Unterscheidung zwischen später und früher Metastasierung** erlauben und zudem in publizierten „Microarray“-Studien an primären kzNZK als prognoseassoziiert identifziert wurden: ***EDNRB***, ***EMCN***, ***LDB2***, ***PECAM1***, ***PARM1***, ***RGS5***, ***SYNPO2***, ***TIMP3***, ***TSPAN7***
- zwei funktionell interessante Gene, die sowohl in Metastasen als auch in primären kzNZK potenziell eine **Unterscheidung zwischen später und früher Metastasierung** erlauben: ***DKK3***, ***DARC***
- zwei funktionell interessante Gene zur Unterscheidung **spät *vs.* früh metastasierte primäre kzNZK**, die auch in anderen „Microarray“-Studien an kzNZK als progno-

seassoziiert identifziert wurden (***BIRC5***) [Kosari *et al.*, 2005] bzw. in einer Metastasierungssignatur enthalten waren (***IL13RA2***) [Minn *et al.*, 2005a]

- fünf Gene des 5-Genmodells (Tab. 4.8, S. 55) sowie fünf weitere funktionell interessante Gene zur Unterscheidung **nicht metastasierte *vs.* metastasierte** bzw. **nicht *vs.* spät metastasierte primäre kzNZK**: ***CA4***, ***CAPN6***, ***CENPV***, ***FABP7***, ***IGFBP5***, ***NMU***, ***RGS5***, ***SAA1/2***, ***TIMP3***, ***UCHL1***

Patientenkollektiv

In die Analysen wurden die Metastasen (n = 11) und Primärtumoren (n = 24) einbezogen, deren Expression auch in den „Microarray"-Analysen untersucht wurde, sowie neun weitere kzNZK-Metastasen und 28 zusätzliche primäre kzNZK. Die insgesamt 20 pulmonalen Metastasen hatten sich im Median 34 Monate nach Nephrektomie (DFS = 0 – 127 Monate) entwickelt und wurden zwischen April 2003 und Juli 2006 im Fachkrankenhaus Coswig reseziert.

Die 52 primären kzNZK waren zwischen Juli 1994 und Januar 2003 in den urologischen Kliniken der Universitätskliniken Dresden (n = 44) und Jena (n = 8) reseziert worden. Das mediane Alter der Patienten (35 männlich, 17 weiblich) bei Nephrektomie betrug 62 (35 – 83) Jahre. Die klinischen Daten der Patienten stellten sich wie folgt dar:

- Tumorstadium: 23x pT1, 14x pT2, 14x pT3, 1x pT4
- initiale Lymphknotenmetastasierung: 45x pN0, 6x p/cN+, 1x pNx
- initiale distante Metastasierung: 41x M0, 10x M1, 1x Mx
- Tumorgrad: 5x G1, 32x G2, 15x G3

Von den 52 primären kzNZK wiesen 36 initiale Metastasen auf oder entwickelten Metastasen im weiteren Krankheitsverlauf (medianes DFS = 15 Monate; 0 – 106 Monate). Die Hauptmetastasierungsorte waren die Lunge (27/36, 75 %), die Lymphknoten (8/36, 22 %), die Nebennieren (7/36, 19 %) sowie die kontralaterale Niere (6/36, 17 %). Die verbleibenden 16 kzNZK entwickelten während eines minimalen Nachbeobachtungszeitraums von 92 Monaten (mediane Nachbeobachtungszeit 124 Monate) keine Metastasen.

Definition der Nachweisgrenze, Referenzgene und allgemeine Auswertung

Zusätzlich zu den TLDA-Messungen wurde die Expression des Referenzgens *PPIA* mit dem entsprechenden „TaqMan Gene Expression Assay" am LightCycler 480 quantifiziert. Dieser „Assay" beinhaltete die gleichen Primer und Sonden, wie sie in den TLDAs verwendet wurden. Die mittels „TaqMan Gene Expression Assays" bestimmten CT-Werte waren, trotz gleicher eingesetzter cDNA- (RNA-) Menge pro Reaktionsansatz, im Mittel 4,9 (Median: 4,8) CT höher als die mittels TLDAs gemessenen. Da die Nachweisgrenze der Messungen am LightCycler 480 erfahrungsgemäß bei einem CT von 35 liegt, wurde sie für die mittels TLDAs gemessenen Werte fünf CT eher, also bei CT = 30, definiert. Die Gene *BIRC5*, *IL13RA2* und *NMU* wurden darauf basierend von der weiteren Auswertung ausgeschlossen, da ihre Expression in 63, 54 bzw. 67 der gemessenen 72 Proben unter der Nachweisgrenze (CT $\geq$ 30) lag.

Das Referenzgen *PPIA* (medianer CT = 18,8; CT-Bereich = 17,2 – 20,8) war deutlich höher exprimiert als *TBP* (medianer CT = 25,6; CT-Bereich = 23,2 – 27,9). Für die Auswertung der Expressionsdaten der Targetgene wurde *PPIA* als Referenzgen verwendet.

Die in den TLDA-Analysen ermittelten Expressionswerte der 18 auswertbaren Targetgene zeigten eine mittlere bis sehr starke, sehr signifikante ($p < 0{,}010$) Korrelation zu den mittels „Microarrays“ gemessenen Expressionswerten (Tab. 4.9).

Tab. 4.9: Korrelation der mittels „Microarrays“ und „TaqMan Low Density Arrays“ gemessenen Expressionswerte in primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen und pulmonalen Metastasen. Die Korrelationskoeffizienten und Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden mittels Spearman-Test berechnet. Die Werte außerhalb der Klammer entsprechen der Korrelation zwischen den TLDA-Ergebnissen und dem Mittelwert aller auswertbaren, also nicht gefilterten, „Microarray“-Sondensets des jeweiligen Gens. In Klammern ist, für den Fall mehrerer auswertbarer Sondensets, der Bereich der Korrelationskoeffizienten bei Betrachtung der einzelnen Sondensets angegeben. (TLDA = „TaqMan Low Density Array“; ** $p < 0{,}010$)

	Korrelationskoeffizienten	
Gensymbol	**Metastasen**	**primäre Nierenzellkarzinome**
CA4	0,87 (0,77-0,90) **	0,94 (0,90-0,95) **
CAPN6	0,96 (0,76-0,96) **	0,86 (0,84-0,86) **
CENPV	0,93 (0,92-0,93) **	0,84 (0,82-0,84) **
DARC	0,96 **	0,62 **
DKK3	0,91 (0,77-0,94) **	0,57 (0,56-0,58) **
EDNRB	0,93 (0,93-0,94) **	0,92 (0,88-0,93) **
EMCN	0,96 (0,93-0,96) **	0,79 (0,79-0,84) **
FABP7	0,98 (0,98-0,98) **	0,75 (0,73-0,79) **
IGFBP5	0,79 (0,48-0,92) **	0,79 (0,74-0,84) **
LDB2	0,89 **	0,79 **
PARM1	0,89 (0,89-0,89) **	0,79 (0,77-0,84) **
PECAM1	0,92 (0,85-0,94) **	0,82 (0,70-0,91) **
RGS5	0,96 (0,87- 0,97) **	0,86 (0,79-86) **
SAA1/2	0,93 (0,88-0,97) **	0,74 (0,72-0,74) **
SYNPO2	0,94 (0,69-0,95) **	0,73 (0,55-0,72) **
TIMP3	0,85 (0,74-0,88) **	0,84 (0,76-0,86) **
TSPAN7	0,96 **	0,88 **
UCHL1	0,91 **	0,90 **

Späte *vs.* frühe Metastasierung

Für den Vergleich späte *vs.* frühe Metastasierung wurden in den TLDA-Analysen weniger strenge DFS-Grenzen gewählt (DFS > 24 *vs.* ≤ 24 Monate) als in den „Microarray“-Analysen. Die differenzielle Expression in spät *vs.* früh entwickelten Metastasen wurde für alle elf ausgewählten und auswertbaren Gene bestätigt (Tab. 4.10). Für den Vergleich spät *vs.* früh metastasierte Primärtumoren wurde eine differenzielle Expression mit mindestens einem statistischen Trend ($p < 0{,}100$) für sechs der elf Gene (55 %) bestätigt (Tab. 4.10).

Die Expression von neun der elf untersuchten Gene in Metastasen zeigte eine tendenzielle ($p < 0{,}100$), schwache bis starke Korrelation zum DFS, während in den Primärtumoren die Expression zweier Gene eine schwache Korrelation zum DFS aufwies ($p < 0{,}100$; Tab. 4.11).

Tab. 4.10: Validierung der „Microarray“-Daten mittels „TaqMan Low Density Arrays“ in Metastasen und primären kzNZK für den Gruppenvergleich späte *vs.* frühe Metastasierung. In den „Microarray“-Analysen wurden strenge, in den TLDA-Analysen erweiterte Grenzen des rezidivfreien Überlebens genutzt. Gezeigt sind jeweils die n-fachen Expressionsänderungen zwischen den Mittelwerten der verglichenen Gruppen, die zugehörigen Irrtumswahrscheinlichkeiten sowie die genauen DFS-Bereiche der verwendeten Proben. Für die Metastasen wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit mittels t-Test („Microarrays“, Mittelwert aller Sondensets des jeweiligen Gens mit signifikantem Unterschied der Expressionswerte) bzw. U-Test (TLDAs) berechnet. Für die primären kzNZK wurden die Irrtumswahrscheinlichkeiten im PostHoc-Test nach dem Drei-Gruppenvergleich nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierte kzNZK erhalten („Microarrays“: ANOVA & Tukey-HSD, Mittelwert aller Sondensets des jeweiligen Gens mit signifikantem Unterschied der Expressionswerte in der ANOVA; TLDA: Kruskal-Wallis- & U-Test). (DFS = rezidivfreies Überleben; Mon. = Monate; n.s. = nicht signifikant; TLDA(s) = „TaqMan Low Density Array(s)“; [1] Mittelwert aller auswertbaren Sondensets; [2] Kruskal-Wallis-Test ergab statistischen Trend)

	spät *vs.* früh entwickelte pulmonale Metastasen				**spät *vs.* früh metatsasierte primäre kzNZK**			
	„Microarrays“ (DFS $\geq$ 60 *vs.* $\leq$ 9 Mon.)		**TLDAs** (DFS $>$ 24 *vs.* $\leq$ 24 Mon.)		**„Microarrays“** (DFS $\geq$ 45 *vs.* $\leq$ 6 Mon.)		**TLDAs** (DFS $>$ 24 *vs.* $\leq$ 24 Mon.)	
Gensymbol	**n-fache Änderung** [1]	**q-Wert**	**n-fache Änderung**	**p-Wert**	**n-fache Änderung** [1]	**q-Wert**	**n-fache Änderung**	**p-Wert**
Probenzahl	6 *vs.* 5		11 *vs.* 9		9 *vs.* 8		14 *vs.* 22	
medianes DFS [Monate]	93 *vs.* 1		90 *vs.* 1		82 *vs.* 0		72 *vs.* 0	
(DFS-Bereich [Monate])	(60 – 156) *vs.* (1 – 9)		(31 – 156) *vs.* (0 – 15)		(45 – 106) *vs.* (0 – 6)		(32 – 106) *vs.* (0 – 22)	
DARC	4,3	0,049	1,2	0,022	3,5	0,008	2,0	0,019 [2]
DKK3	2,5	0,046	2,2	0,025	2,5	0,012	2,4	0,003
EDNRB	3,9	0,036	3,6	0,004	1,7	0,072	1,7	n.s.
EMCN	5,1	0,029	3,6	0,002	2,3	0,078	1,4	n.s.
LDB2	3,3	0,022	2,6	0,009	2,0	0,054	1,6	0,048
PARM1	2,1	0,049	2,9	0,003	2,0	0,012	1,5	n.s.
PECAM1	2,8	0,029	2,8	0,003	1,3	0,043	1,5	0,048
RGS5	3,8	0,036	5,3	0,001	2,4	0,032	1,2	n.s.
SYNPO2	1,4	0,036	2,3	0,004	1,8	0,058	2,5	n.s.
TIMP3	3,2	0,022	2,8	0,003	1,4	0,088	1,4	0,085
TSPAN7	6,9	0,022	2,6	0,003	2,2	0,057	1,7	0,062

Tab. 4.11: Korrelation der mittels „TaqMan Low Density Arrays“ quantifizierten Expression ausgewählter Gene in Metastasen bzw. primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen zum rezidivfreien Überleben der Patienten. Die Korrelationskoeffizienten und Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden mittels Spearman-Test berechnet. (n.s. = nicht signifikant; ^{T} $p < 0{,}100$; * $p < 0{,}050$; ** $p < 0{,}010$; *** $p < 0{,}001$)

	Korrelationskoeffizient	
Gensymbol	**Metastasen**	**primäre Nierenzellkarzinome**
DARC	n.s.	n.s.
DKK3	n.s.	0,45 **
EDNRB	0,46 *	n.s.
EMCN	0,52 *	n.s.
LDB2	0,38 ^{T}	0,31 ^{T}
PARM1	0,44 ^{T}	n.s.
PECAM1	0,49 *	n.s.
RGS5	0,77 ***	n.s.
SYNPO2	0,42 ^{T}	n.s.
TIMP3	0,46 *	n.s.
TSPAN7	0,47 *	n.s.

Nicht metastasierte *vs.* metastasierte primäre Nierenzellkarzinome

Für die Validierung des Vergleichs nicht metastasierte *vs.* metastasierte primäre kzNZK wurden neun Gene ausgewählt, wobei die mittels TLDAs gemessenen Expressionswerte von *NMU* nicht auswertbar waren. Zwei dieser Gene, *RGS5* unf *TIMP3*, wurden bereits für die Validierung des Vergleichs späte *vs.* frühe Metastasierung ausgewählt. Außerdem war *EMCN*, das ebenfalls ursprünglich zur Validierung des Vergleichs späte *vs.* frühe Metastasierung ausgewählt wurde, zwischen nicht metastasierten und metastasierten kzNZK in den „Microarray“-Analysen differenziell exprimiert. In den TLDA-Messungen wurde die differenzielle Expression zwischen nicht metastasierten und metastasierten primären kzNZK für fünf von diesen insgesamt neun auswertbaren Genen (56 %) mit mindestens einem statistischen Trend ($p < 0{,}100$) bestätigt (Tab. 4.12). Sechs weitere Gene, die ursprünglich ebenfalls im Vergleich spät *vs.* früh bzw. nicht *vs.* spät metastasierte kzNZK als differenziell exprimiert identifiziert wurden, zeigten zwar nicht in den „Microarray“-Daten, aber in den TLDA-Messungen einen zumindest tendenziellen ($p < 0{,}100$) Expressionsunterschied zwischen nicht metastasierten und metastasierten kzNZK (*CA4*, *EDNRB*, *LDB2*, *PARM1*, *PECAM1*, *TSPAN7*; Tab. 4.12). Vier der untersuchten Gene zeigten zudem in den „Microarray“-Analysen eine differenzielle Expression in nicht *vs.* spät metastasierten kzNZK. Für drei der vier Gene wurde diese in den TLDA-Analysen bestätigt (Tab. 4.12).

Tab. 4.12: Validierung der „Microarray"-Daten mittels „TaqMan Low Density Arrays" für die Vergleiche (A) nicht metastasierte *vs.* metastasierte und (B) nicht *vs.* spät metastasierte primäre klarzellige Nierenzellkarzinome. Für die nicht metastasierten Tumoren ist jeweils die mediane Nachbeobachtungszeit nach Nephrektomie, für die metastasierten Tumoren das rezidivfreie Überleben angegeben. Gezeigt sind jeweils die n-fachen Expressionsänderungen zwischen den Mittelwerten der verglichenen Gruppen sowie die zugehörigen Irrtumswahrscheinlichkeiten. Für den Vergleich nicht metastasierte *vs.* metastasierte Tumoren wurden die Irrtumswahrscheinlichkeiten mittels t-Test („Microarray", Mittelwert aller Sondensets des jeweiligen Gens mit signifikantem Unterschied der Expressionswerte) bzw. U-Test (TLDAs) berechnet. Für den Vergleich nicht *vs.* spät metastasierte kzNZK wurden die Irrtumswahrscheinlichkeiten im PostHoc-Test nach dem Drei-Gruppenvergleich nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierte kzNZK erhalten („Microarray": ANOVA & Tukey-HSD, Mittelwert aller Sondensets des jeweiligen Gens mit signifikantem Unterschied der Expressionswerte in der ANOVA; TLDA: Kruskal-Wallis- & U-Test). (DFS = rezidivfreies Überleben; kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarzinom; Mon. = Monate; Nachbeob. = Nachbeobachtungszeit; n.s. = nicht signifikant; TLDAs = „TaqMan Low Density Arrays"; [1] Mittelwert aller auswertbaren Sondensets)

	„Microarrays"		**TLDAs**	
Gensymbol	**n-fache Änderung** [1]	**q-Wert**	**n-fache Änderung**	**p-Wert**
A nicht metastasierte *vs.* (spät *und* früh) metastasierte primäre kzNZK				
Probenzahl	7 *vs.* 17		16 *vs.* 36	
mediane Nachbeob./DFS [Mon.]	140 *vs.* 45		124 *vs.* 15	
(Bereich [Mon.])	(99 – 155) *vs.* (0 – 106)		(92 – 155) *vs.* (0 – 106)	
CA4	1,5	n.s.	3,8	0,005
CAPN6	-2,6	0,036	-2,4	n.s.
CENPV	5,2	0,020	2,5	0,001
EDNRB	3,0	n.s.	1,8	0,029
EMCN	5,8	0,020	2,0	0,009
FABP7	21,7	0,020	1,3	n.s.
IGFBP5	3,1	0,020	1,5	n.s.
LDB2	3,4	n.s.	1,4	0,032
PARM1	2,3	n.s.	1,4	0,057
PECAM1	2,4	n.s.	1,4	0,052
RGS5	3,7	0,034	1,6	0,074
SAA1/2	-4,8	0,030	-5,3	n.s.
TIMP3	2,5	0,030	1,6	0,018
TSPAN7	4,1	n.s.	1,8	0,016
UCHL1	-4,9	0,062	-4,4	0,018
B nicht *vs.* spät metastasierte primäre kzNZK				
Probenzahl	7 *vs.* 9		16 *vs.* 14	
mediane Nachbeob./DFS [Mon.]	140 *vs.* 82		124 *vs.* 72	
(Bereich [Mon.])	(99 – 155) *vs.* (45 – 106)		(92 – 155) *vs.* (32 – 106)	
CA4	2,7	0,041	3,5	0,061
CENPV	4,3	0,014	2,4	0,009
EMCN	3,9	0,046	1,8	0,081
IGFBP5	2,8	0,029	1,3	n.s.

Kontinuierliche Deregulation der Expression

Die mittels TLDAs quantifizierte Expression wies für zehn von 18 auswertbaren Genen (56 %) eine kontinuierliche Abfolge ihrer Mittelwerte von nicht metastasierten über spät metastasierte zu früh metastasierten primären kzNZK auf (Abb. 4.6). Dies war auch für Gene der Fall, die zwischen den einzelnen Subgruppen, z. B. spät *vs.* früh metastasierten kzNZK, keinen statistisch signifikanten Expressionsunterschied aufwiesen (z. B. *EDNRB*, *PARM1*, *RGS5*). Drei weitere Gene zeigten eine vergleichbare Expression in nicht und spät metastasierten (*DKK3*) bzw. spät und früh metastasierten kzNZK (*CA4*, *CENPV*). Die anderen fünf Gene zeigten keinen eindeutigen Trend (Abb. 4.6 bzw. nicht gezeigt).

Basierend auf ihrer potenziellen Fähigkeit, nicht, spät und früh metastasierte primäre kzNZK zu differenzieren, ihrer funktionellen Relevanz sowie ihrer Expressionshöhe wurden *CA4*, *DKK3*, *EDNRB*, *PECAM1*, *TIMP3* und *TSPAN7* für weiterführende Analysen ausgewählt. Die medianen in den TLDA-Analysen gemessenen CT-Werte betrugen 26,7 für *CA4*, 24,1 für *DKK3*, 23,8 für *EDNRB*, 20,8 für *PECAM1*, 21,6 für *TIMP3* und 25,0 für *TSPAN7*. In den weiterführenden Analysen sollte geprüft werden, inwiefern diese Gene für eine Prognoseabschätzung im kzNZK geeignet sind.

4.2.2 Quantitative PCR — Untersuchung der Expression ausgewählter Gene

Die Expression der Gene *CA4*, *DKK3*, *EDNRB*, *PECAM1* und *TIMP3* wurde auf mRNA-Ebene in einem größeren Probenkollektiv von 86 primären kzNZK sowie in bis zu 30 autologen nichtmalignen Nierengeweben mittels „TaqMan Gene Expression Assays“ am LightCycler 480 quantifiziert. Zweiundzwanzig dieser Tumoren waren bereits in den 52 primären kzNZK des vorherigen „Screenings“ enthalten. Die Patienten wurden im Zeitraum von April 1994 bis März 2001 in der urologischen Klinik des Universitätsklinikums Dresden nephrektomiert. Das mediane Alter bei Nephrektomie betrug 64 (32 - 88) Jahre. Die Angaben über Geschlechterverteilung und Häufigkeit der klinischen Parameter sind in Tab. 4.13 aufgeführt. Für 85/86 Patienten waren Nachbeobachtungsdaten vorhanden, wobei der mediane Nachbeobachtungszeitraum 92 (9 – 152) Monate betrug. Neun Patienten (10 %) hatten initiale Metastasen (3x distante, 6x Lymphknotenmetastasen), 23 Patienten (27 %) entwickelten ein Rezidiv im weiteren Verlauf der Erkrankung (21 Metastasen, 3 Lokalrezidive; medianes DFS = 23 Monate). Die Hauptmetastasierungsorte waren die Lunge (43 %), die Knochen (26 %) und die Lymphknoten (26 %). Achtundzwanzig der 86 Patienten (33 %) sind verstorben, 14 (50 %) davon kzNZK-bedingt. Fünf der 86 Patienten erhielten nachweislich eine medikamentöse Therapie (Immunchemotherapie, Vakzinierung), drei eine Strahlentherapie im Verlauf der Erkrankung. Einschlusskriterien für die Verwendung der Gewebeproben waren das Vorhandensein kryokonservierten Gewebes mit einem Tumorzellgehalt von $\geq$ 70 %, aus dem eine ausreichende Menge RNA isoliert werden konnte ($\geq$ 100 ng). Des weiteren wurden nur Proben von Patienten einbezogen, von denen Nachbeobachtungsdaten verfügbar waren bzw. die initial schon Metastasen aufwiesen.

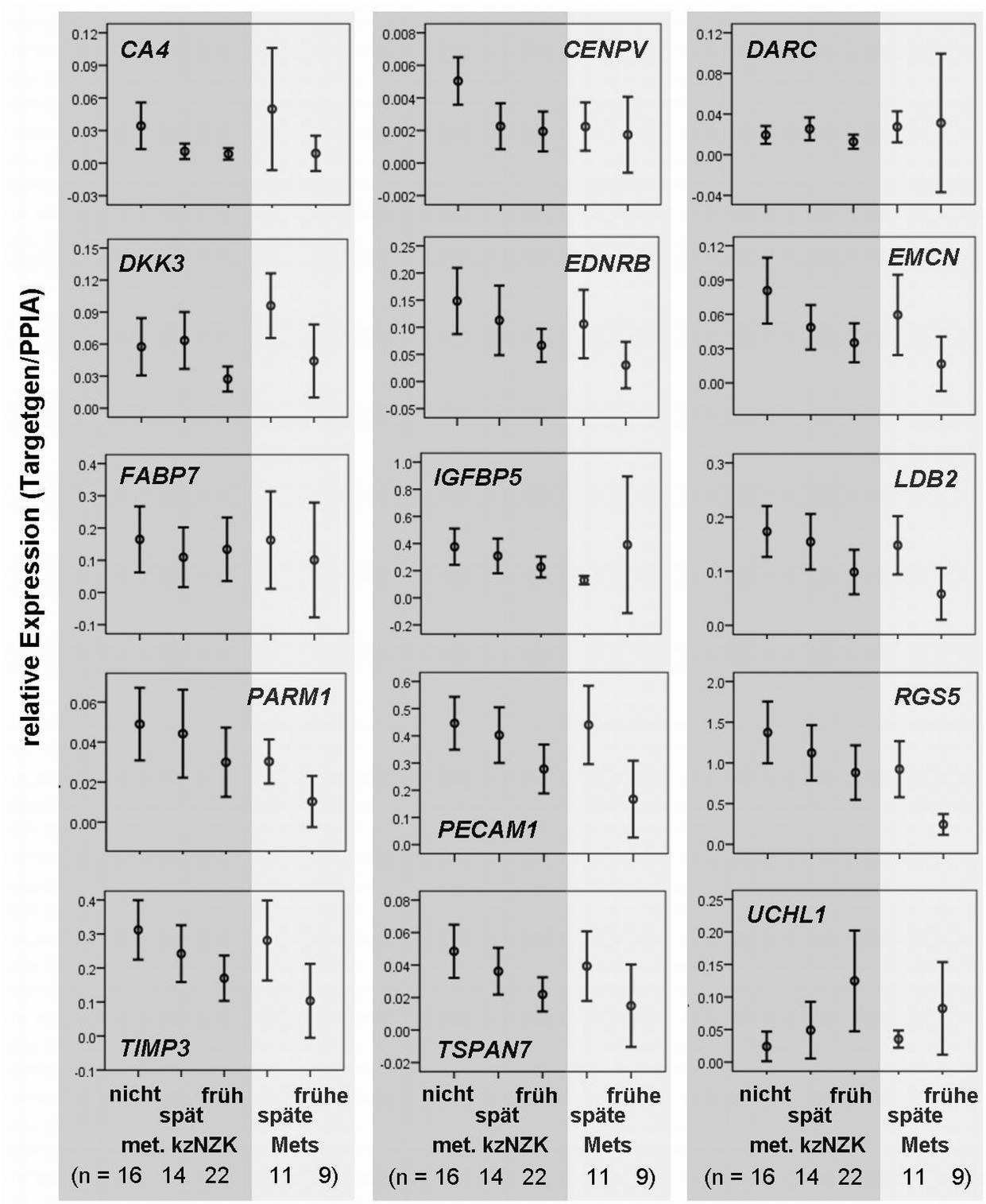


Abb. 4.6: Relative Expression ausgewählter Targetgene in nicht, spät und früh metastasierten primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen sowie in früh und spät entwickelten Metastasen. Die Expressionswerte wurden mittels „TaqMan Low Density Arrays“ gemessen. Die Gruppeneinteilung der x-Achse ist unter der jeweiligen Bildspalte angegeben. Für jedes Gen und jede Gruppe ist jeweils die mittlere Expression (Kreis) sowie deren 95 %-Konfidenzintervall dargestellt. „Spät“ bedeutet ein rezidivfreies Überleben $>$ 24 Monate, „früh“ eines $\leq$ 24 Monate. (kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarzinom; met. = metastasiert, Mets = Metastasen; n = Probenzahl)

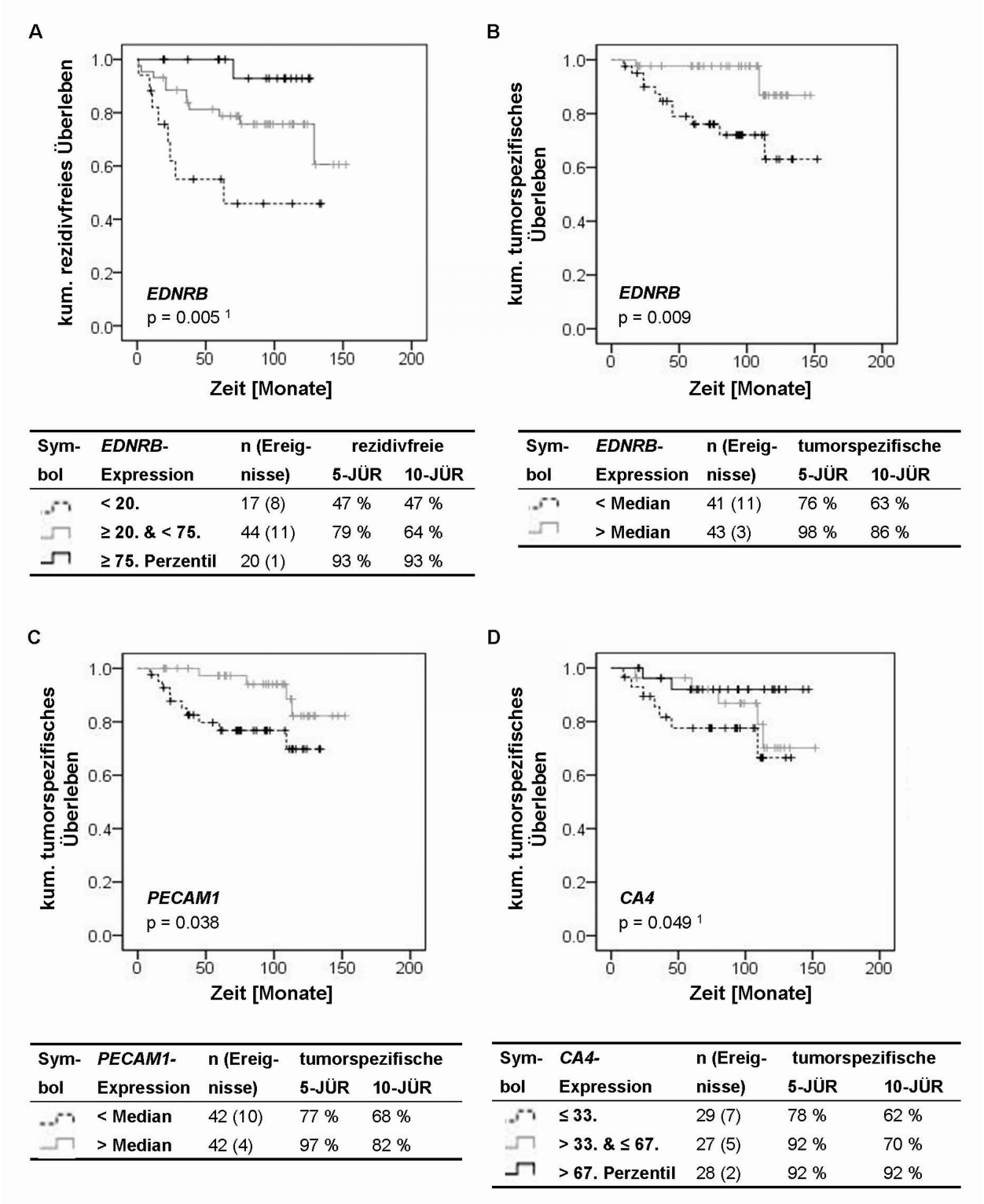
Eine signifikant unterschiedliche Expression in Abhängigkeit vom DFS oder klinischen Parametern wurde nur für *EDNRB* und *PECAM1* beobachtet (Tab. 4.13). Beide Gene waren nur bei Verwendung der strenger DFS-Kriterien in spät metastasierten primären kzNZK (DFS $\geq$ 36 Monate) tendenziell bzw. signifikant höher exprimiert als in früh metastasierten (DFS $\leq$ 12 Monate; Tab. 4.13). Bei einer DFS-Grenze von 24 Monaten zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Darüber hinaus zeigte *PECAM1* einen statistischen Trend hinsichtlich einer schwachen Korrelation mit dem DFS ($\rho = 0{,}39$; p = 0,090). Weiterhin besaßen nicht metastasierte kzNZK eine signifikant höhere *EDNRB*- und *PECAM1*-Expression als initial bzw. im Verlauf metastasierte primäre kzNZK (Tab. 4.13). Patienten mit geringerem klinischen Stadium, geringerem Tumorgrad bzw. ohne Veneninfiltration wiesen eine signifikant oder tendenziell höhere *EDNRB*-Expression in ihrem Primärtumor auf als Patienten mit höherem Stadium, höherem Grad bzw. mit Veneninfiltration (Tab. 4.13).

Ein signifikanter Unterschied im Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der Expressionshöhe war für *CA4*, *EDNRB* und *PECAM1* zu beobachten. Hierfür wurde die Expression der Tumoren für jedes der fünf Gene in zwei (< *vs.*> Median) bzw. drei Gruppen (Teilung am 33. und 67. Perzentil bzw. etwa am oberen und unteren Quartil) unterteilt und geprüft, ob sich das DSF, TSS und OS der Patienten in diesen Gruppen unterschied (Abb. 4.7). Es war ein signifikant längeres DFS der Patienten mit zunehmender *EDNRB*-Expression zu verzeichnen (Abb. 4.7). Auch der Fisher-Test ergab hier einen tendenziellen bzw. signifikanten Unterschied der Ereigniszahl zwischen Patienten mit der höchsten *EDNRB*-Expression ($\geq$ 75. Perzentil) und solchen mit einer mittleren (p = 0,085) bzw. geringen (p = 0,005) Expression. Darüber hinaus hatten Patienten mit einer höheren als der medianen *EDNRB*- bzw. *PECAM1*-Expression ein signifikant längeres TSS (Abb. 4.7) sowie ein signifikant längeres OS (p = 0,012 bzw. p = 0,013). Außerdem stieg die Länge des TSS signifikant mit zunehmender *CA4*-Expression (Abb. 4.7). Die medianen Überlebenszeiten waren innerhalb des zur Verfügung stehenden Nachbeobachtungszeitraums für keinen Parameter erreicht. Für alle anderen Gene ergab sich kein signifikanter Unterschied der Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der Expressionshöhe.

Eine multivariate Cox-Regressionsanalyse zeigte, dass die *EDNRB*-Expression zudem einen von klinischen Parametern unabhängigen Einfluss auf das DFS hatte (Tab. 4.14). Patienten mit einer Expressionshöhe < 20. bzw. $\geq$ 20. & < 75. Perzentil hatten im Vergleich zu Patienten mit einer *EDNRB*-Expression $\geq$ 75. Perzentil ein 14,65-fach bzw. 4,01-fach erhöhtes Risiko, ein Rezidiv zu erleiden (Tab. 4.14). Des weiteren hatte sowohl die *EDNRB*- als auch die *PECAM1*-Expression einen zu klinischen Parametern zusätzlichen Einfluss auf das TSS der Patienten. Patienten mit einer geringeren als der medianen Expressionshöhe hatten ein um das 6,60 [95 %-Konfidenzintervall (CI) = 1,44 – 30,15]-fache (*EDNRB*; p = 0,015; nicht gezeigt) bzw. um das 9,56 (95 %-CI = 2,25 – 40,75)-fache (*PECAM1*; p = 0,002; nicht gezeigt) erhöhtes Risiko, an ihrem kzNZK zu versterben. Bei der Einbeziehung beider molekularen Parameter in ein multivariates Modell behielt *PECAM1* seinen unabhängigen prognostischen Einfluss mit der gleichen HR und Irrtumswahrscheinlichkeit (Tab. 4.14). *EDNRB* hatte in diesem Fall keinen unabhängigen Einfluss mehr auf das TSS.

Tab. 4.13: Expression der Gene *EDNRB* und *PECAM1* in primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen in Abhängigkeit von klinischen Parametern, der Metastasierung und dem rezidivfreien Überleben. Die Expressionswerte wurden mittels quantitativer PCR gemessen. Gezeigt ist jeweils die mittlere relative Expression der Gene in den verglichenen Gruppen sowie die zugehörigen mittels U-Test berechneten Irrtumswahrscheinlichkeiten. (DFS = rezidivfreies Überleben; klin. = klinisch; kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarzinom; Metastasierung = distante und/oder Lymphknotenmetastasierung initial oder im Verlauf; n = Probenzahl; rel. Expr. = relative Expression; [1] Nachbeobachtungszeit bei nicht metastasierten primären kzNZK 60 – 152 Monate; [2] vorheriger Kruskal-Wallis-Test gegen nicht metastasierte primäre kzNZK mit $p < 0{,}050$)

	Proben-	***EDNRB***		***PECAM1***	
	anzahl	**rel. Expr.**		**rel. Expr.**	
Parameter	**(% von n = 86)**	**(*10^{-2})**	**p-Wert**	**(*10^{-2})**	**p-Wert**
Geschlecht			n.s.		n.s.
männlich	54 (63)	5,4		17,6	
weiblich	32 (37)	6,2		19,1	
Tumorstadium			n.s.		n.s.
pT1/2	66 (77)	5,9		17,8	
pT3/4	20 (23)	5,0		19,0	
klin. Stadium			0,058		n.s.
TNM I/II	58 (67)	5,8		18,3	
TNM III/IV	26 (30)	5,4		17,5	
Tumorgrad			0,003		n.s.
G1/2	70 (81)	6,5		18,9	
G3	16 (19)	2,4		14,7	
Veneninvasion			0,009		n.s.
V0	62 (72)	6,1		17,4	
V1	17 (20)	4,1		20,6	
Primär-					
metastasierung			0,032		0,028
N0 M0	75 (87)	5,8		18,8	
N+ und/oder M1	9 (10)	4,7		12,4	
Metastasierung			0,008		n.s.
nein [1]	50 (58)	6,1		18,2	
ja	25 (30)	4,7		17,9	
DFS			0,075 [2]		0,029 [2]
$\geq$ 36 Monate	13 (15)	6,0		27,6	
$\leq$ 12 Monate	7 (8)	3,8		11,0	



Symbol	*EDNRB*-Expression	n (Ereignisse)	rezidivfreie 5-JÜR	rezidivfreie 10-JÜR
	< 20.	17 (8)	47 %	47 %
	≥ 20. & < 75.	44 (11)	79 %	64 %
	≥ 75. Perzentil	20 (1)	93 %	93 %

Symbol	*EDNRB*-Expression	n (Ereignisse)	tumorspezifische 5-JÜR	tumorspezifische 10-JÜR
	< Median	41 (11)	76 %	63 %
	> Median	43 (3)	98 %	86 %

Symbol	*PECAM1*-Expression	n (Ereignisse)	tumorspezifische 5-JÜR	tumorspezifische 10-JÜR
	< Median	42 (10)	77 %	68 %
	> Median	42 (4)	97 %	82 %

Symbol	*CA4*-Expression	n (Ereignisse)	tumorspezifische 5-JÜR	tumorspezifische 10-JÜR
	≤ 33.	29 (7)	78 %	62 %
	> 33. & ≤ 67.	27 (5)	92 %	70 %
	> 67. Perzentil	28 (2)	92 %	92 %

Abb. 4.7: Rezidivfreies und tumorspezifisches Überleben von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der (A, B) *EDNRB*-, (C) *PECAM1*- und (D) *CA4*-Expression ihrer Primärtumoren. Die Expressionswerte wurden mittels quantitativer PCR gemessen. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden mittels Log-Rank-Test berechnet. Die jeweils unter den Bildern stehenden Tabellen zeigen die in die Analysen einbezogenen Patientenzahlen, die Anzahl der eingetretenen Ereignisse in jeder Gruppe sowie die 5- und 10-JÜR. (JÜR = Jahresüberlebensrate; kum. = kumulatives; n = Patientenzahl; [1] Log-Rank-Trendtest)

Tab. 4.14: Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse für das (A) rezidivfreie und (B) tumorspezifische Überleben unter Einbeziehung klinischer Parameter sowie der *CA4*-, *EDNRB*- und *PECAM1*-Expression. Die Expressionswerte wurden mittels quantitativer PCR gemessen. Die angegebenen Patientenzahlen gelten für die multivariate Analyse. Die HR bezieht sich auf den jeweils angegebenen Vergleich. (CI = Konfidenzintervall; HR = „hazard ratio"; kont. = Parameter als kontinuierliche Größe einbezogen; m = männlich; n = Patientenzahl; NA = nicht in multivariate Analyse einbezogen; n.s. = nicht signifikant; P. = Perzentil; w = weiblich; [1] Lymphknotenstatus und distante Metastasierung nicht einzeln, sondern in Kombination in die multivariate Analyse einbezogen, da nur zwei Patienten einen M1-Tumor besaßen)

Parameter	**univariate Analyse**		**multivariate Analyse**	
(Bezugsgröße)	**HR (95 %-CI)**	**p-Wert**	**HR (95 %-CI)**	**p-Wert**
A rezidivfreies Überleben (n = 74, 18 Ereignisse)				
Geschlecht (m *vs.* w)	1,47 (0,56 – 3,83)	n.s.	NA	NA
Tumorstadium				
(pT3/4 *vs.* pT1/2)	1,58 (0,61 – 4,12)	n.s.	NA	NA
Tumorgröße (kont.) [cm]	1,20 (1,01 – 1,43)	0,036	1,34 (1,09 – 1,64)	0,005
N (N+ *vs.* N0)	5,95 (1,79 – 20,78)	0,005	12,13 (2,24 – 65,75)	0,004
V (V1 *vs.* V0)	2,91 (1,12 – 7,60)	0,029	1,92 (0,64 – 5,77)	n.s.
Tumorgrad (G3 *vs.* G1/2)	2,98 (1,18 – 7,52)	0,021	2,14 (0,71 – 6,42)	n.s.
Tumornekrose				
($>$ 10 % *vs.* $\leq$ 10 %)	1,66 (0,68 – 4,05)	n.s.	NA	NA
EDNRB		0,017		0,009
($<$ 20. *vs.* $\geq$ 75. P.)	13,33 (1,66 – 107,49)	0,015	14,65 (1,72 – 124,73)	0,014
($\geq$ 20. & $<$ 75. *vs.* $\geq$ 75. P.)	5,04 (0,65 – 39,09)	n.s.	4,01 (0,50 – 31,90)	n.s.
B tumorspezifisches Überleben (n = 79, 13 Ereignisse)				
Geschlecht (m *vs.* w)	2,05 (0,57 – 7,36)	n.s.	NA	NA
Tumorstadium				
(pT3/4 *vs.* pT1/2)	1,91 (0,64 – 5,69)	n.s.	NA	NA
Tumorgröße (kont.) [cm]	1,30 (1,08 – 1,58)	0,007	1,55 (1,23 – 1,97)	$<$ 0,001
N (N+ *vs.* N0)	8,12 (2,12 – 31,13)	0,021	NA [1]	NA [1]
M/N (M1/N+ *vs.* M0/N0)	10,55 (2,97 – 37,40)	$<$ 0,001	2,03 (0,36 – 11,54)	n.s.
V (V1 *vs.* V0)	1,57 (0,48 – 5,15)	n.s.	NA	NA
Tumorgrad (G3 *vs.* G1/2)	3,95 (1,37 – 11,39)	0,011	4,53 (1,38 – 14,90)	0,013
Tumornekrose				
($>$ 10 % *vs.* $\leq$ 10 %)	2,94 (0,92 – 9,41)	0,069	1,19 (0,28 – 5,08)	n.s.
CA4		n.s.	NA	NA
($\leq$ 33. *vs.*$>$ 67. P.)	4,32 (0,89 – 21,05)	0,070	NA	NA
($>$ 33. & $\leq$ 67. *vs.*$>$ 67. P.)	2,52 (0,49 – 12,97)	n.s.	NA	NA
EDNRB				
($<$ *vs.* $>$ Median)	4,71 (1,31 – 16,95)	0,018	2,33 (0,39 – 13,95)	n.s.
PECAM1				
($<$ *vs.* $>$ Median)	3,20 (1,00 – 10,25)	0,050	9,56 (2,25 – 40,75)	0,002

Im Vergleich zum nichtmalignen Gewebe war die *CA4*-, *DKK3*-, *EDNRB*- und *TIMP3*-Expression in primären kzNZK statistisch signifikant herunterreguliert. *PECAM1* war in kzNZK statistisch signifikant höher exprimiert als in nichtmalignen Nierengeweben (Abb. 4.8).

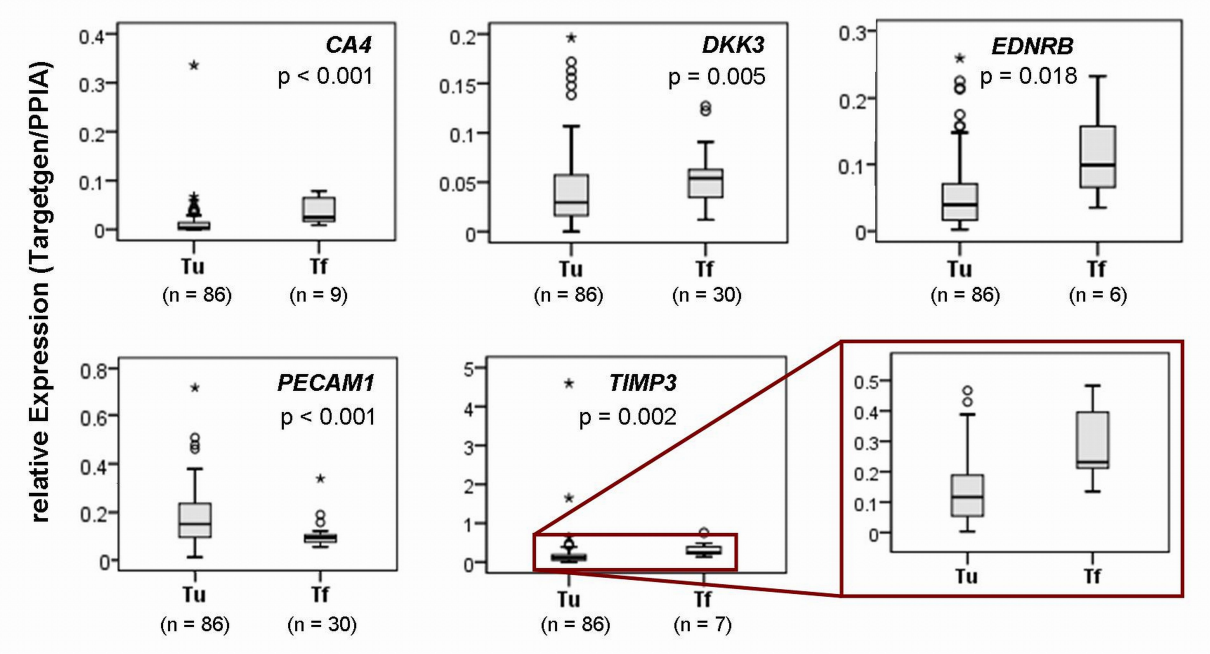


Abb. 4.8: Relative Expression von *CA4*, *DKK3*, *EDNRB*, *PECAM1* und *TIMP3* in klarzelligen Nierenzellkarzinomen und autologen nichtmalignen Nierengeweben. Die Expressionswerte wurden mittels quantitativer PCR gemessen. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden mittels U-Test berechnet. (n = Probenzahl; Tf = nichtmalignes Gewebe; Tu = Tumor)

4.2.3 Immunhistochemische PECAM1-Färbung

PECAM1, besser bekannt als CD31, wird für die immunhistochemische Beurteilung der MVD herangezogen. Hier sollte geprüft werden, ob sich die auf der mRNA-Ebene beobachteten Unterschiede in der *PECAM1*-Expression auf Proteinebene bestätigen lassen.

Für die Auswertung der PECAM1-Färbung standen 109 kzNZK, neun papilläre NZK und zehn Onkozytome sowie 124 autologe nichtmaligne Nierengewebeproben von insgesamt 128 Patienten zur Verfügung. Darüber hinaus konnten 163 Metastasen von 83 kzNZK-Patienten in die Auswertung einbezogen werden. Im Median standen dabei pro Patient zwei Metastasen (0 – 8) zur Verfügung. In 108/109 kzNZK, allen papillären NZK und allen Onkozytomen sowie in 123/124 nichtmalignen Nierengeweben wurden PECAM1-positive Gefäßstrukturen nachgewiesen (Abb. 4.9 A; Abb. 4.10). Im Gegensatz zu den Tumorproben zeigten die Gefäße der nichtmalignen Proben meist nur eine schwache und punktuelle Färbung der Gefäße. Die nichtmalignen Gewebe zeigten darüber hinaus eine Färbung der Kapillaren der Glomeruli. Die mediane MVD war in kzNZK, Onkozytomen und nichtmalignen Nierengeweben vergleichbar und betrug 212 (0 – 624), 238 (63 – 332) bzw. 211 (0 – 554) Gefäße/mm^2. Papilläre NZK besaßen eine geringere mediane MVD von 79 (16 – 329) Gefäßen/mm^2. Dementsprechend bestand sowohl bei der Betrachtung aller als auch der gepaarten Proben kein signifikanter Unterschied in der MVD der kzNZK und der der nichtmalignen Nierengewebe (U- bzw. Wilcoxon-Test: $p > 0{,}050$).

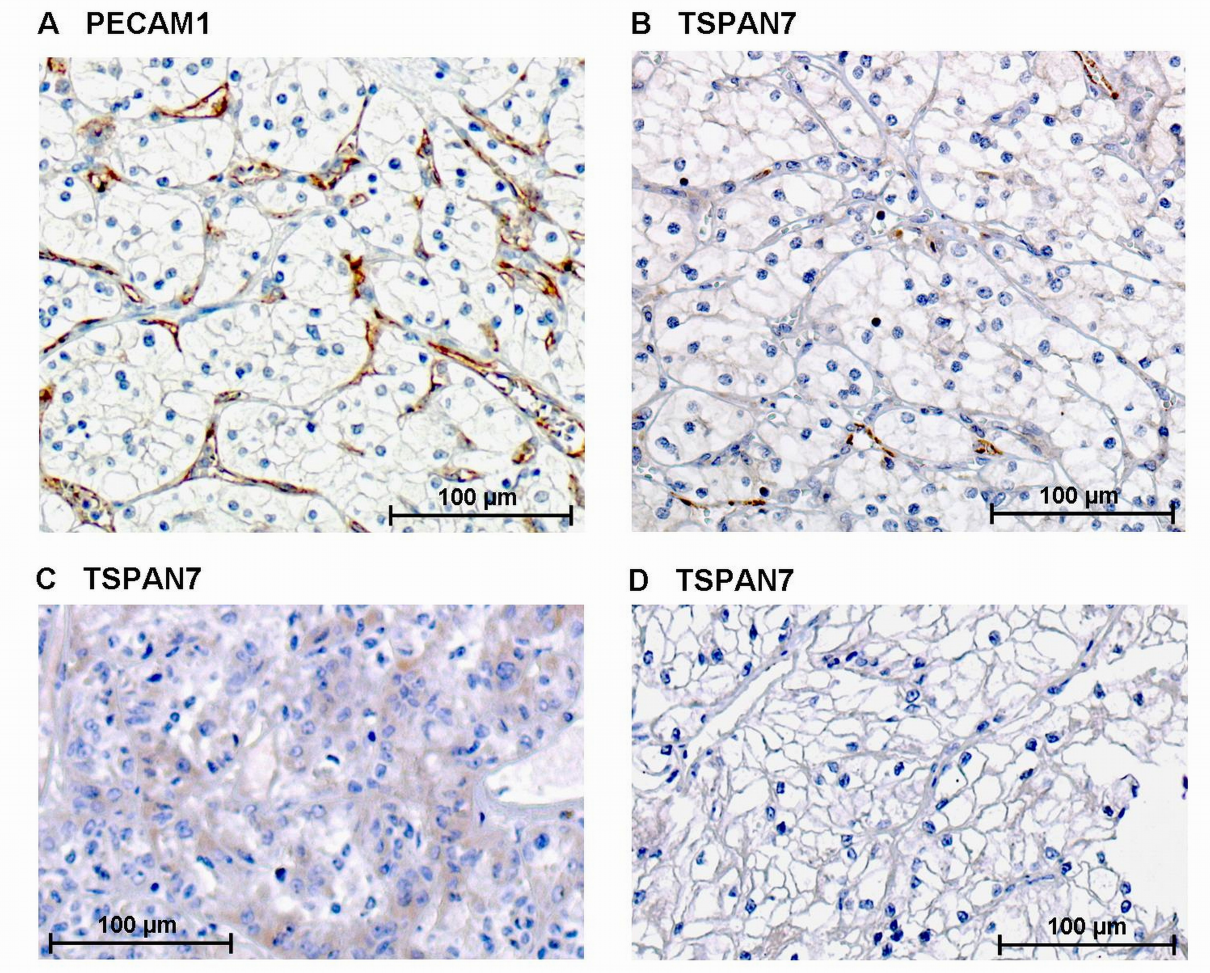


Abb. 4.9: Immunhistochemische Färbung von (A) PECAM1 und (B – D) TSPAN7 in primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Die in **A** und **B** gezeigten Ausschnitte repräsentieren ein und dasselbe Tumorareal eines Patienten mit initialen pulmonalen Metastasen, dessen Primärtumor sowohl PECAM1- als auch TSPAN7-positive Gefäßstrukturen aufwies. **C** zeigt einen Tumor mit TSPAN7-positiven Tumorzellen und **D** einen TSPAN7-negativen Tumor. Die PECAM1- bzw. TSPAN7-Färbung ist braun dargestellt, die Zellkerne sind blau gefärbt.

Für die kzNZK-Patienten wurde untersucht, ob die MVD in den Metastasen und primären kzNZK mit klinischen Parametern bzw. mit der Prognose der Patienten assoziiert ist. Für 106 von 109 Patienten mit primären kzNZK waren klinische Daten verfügbar, wobei von 94 dieser 106 Patienten außerdem Nachbeobachtungsdaten vorlagen. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 59 (1 – 183) Monate.

Spät entstandene Metastasen wiesen eine signifikant höhere MVD auf als früh entstandene (DFS $>$ 24 *vs.* $\leq$ 24 Monate; Abb. 4.11 A). Die mediane MVD in primären kzNZK nahm zwar von nicht metastasierten über spät metastasierte (DFS $>$ 24 Monate) zu früh metastasierten Tumoren (DFS $\leq$ 24 Monate) kontinuierlich ab, zeigte aber keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen diesen Gruppen (Abb. 4.11 B; Tab. 4.15). Auch bei Verwendung strengerer DFS-Kriterien (DFS $\geq$ 36 *vs.* $\leq$ 12 Monate; Tab. 4.15) erreichte der MVD-Unterschied zwischen den drei Primärtumorsubgruppen keine statistische Signifikanz. Die MVD der Metastasen zeigte zudem eine sehr schwache ($\rho = 0{,}20$), aber statistisch signifikante ($p = 0{,}010$) positive Korrelation zum DFS. Die MVD der primären kzNZK korrelierte nicht mit dem DFS der Patienten.

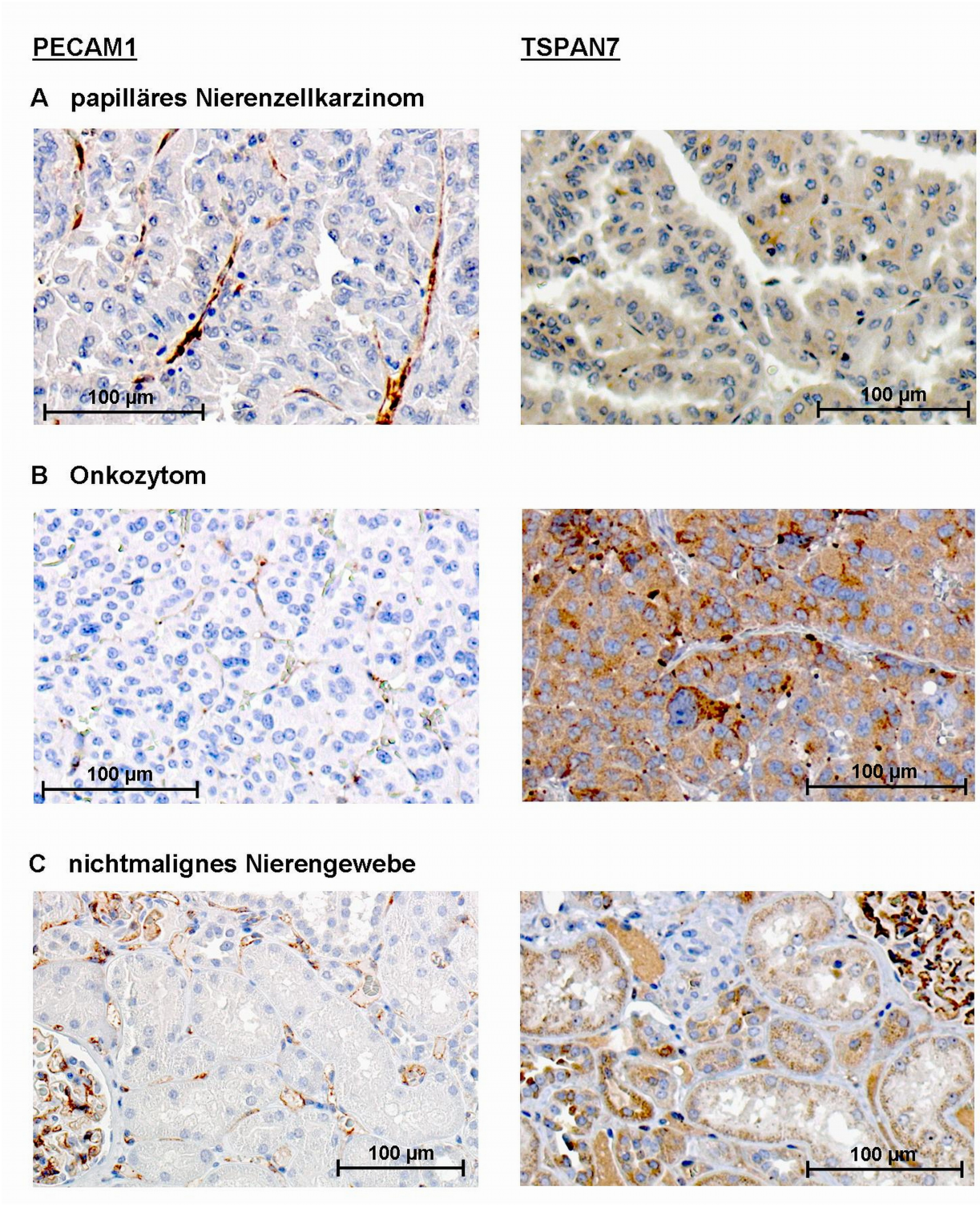
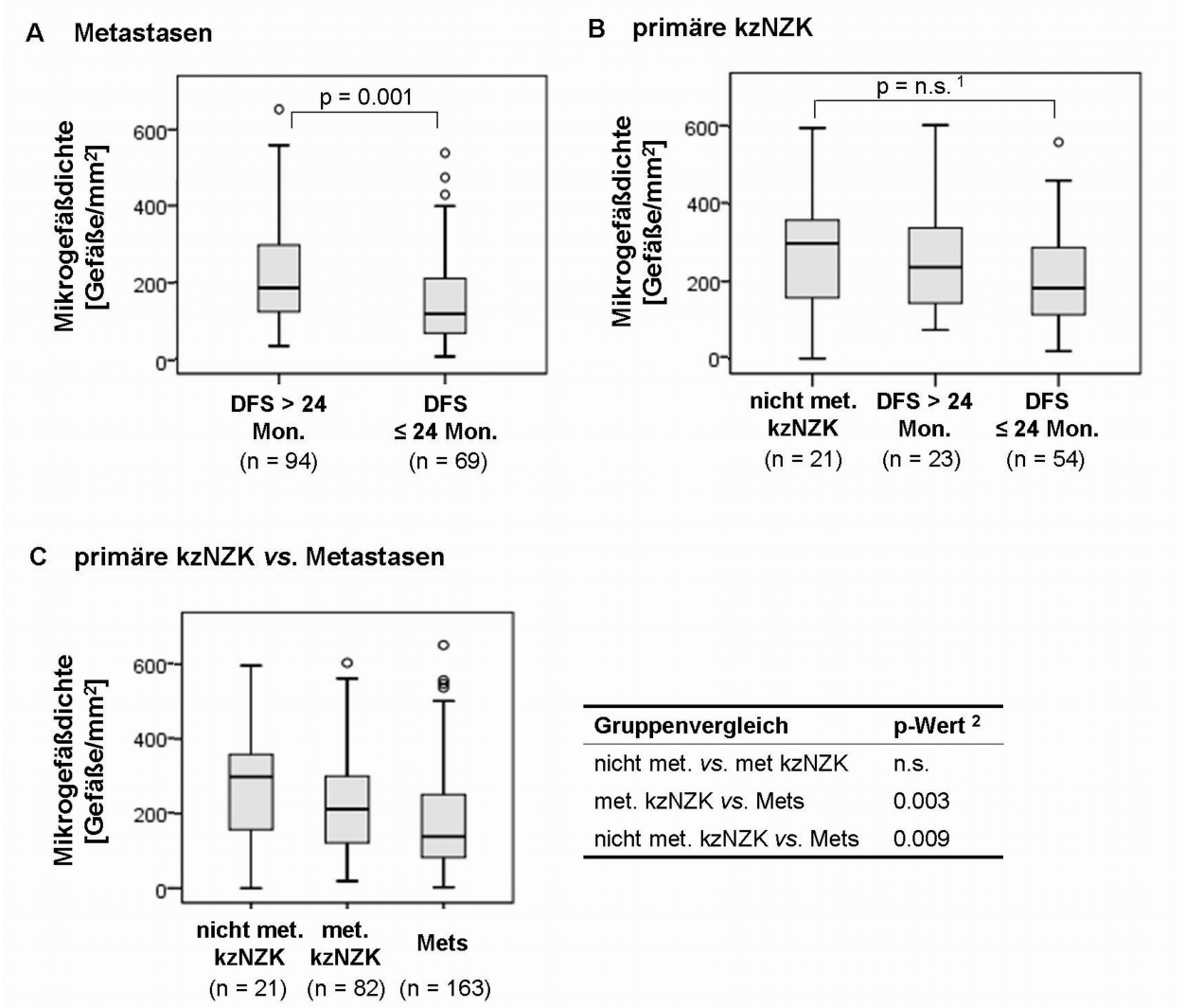


Abb. 4.10: Immunhistochemische Färbung von PECAM1 und TSPAN7 in (A) einem papillären Nierenzellkarzinom, (B) einem Onkozytom und (C) einem nichtmalignen Nierengewebe. Die repräsentativ für die PECAM1- und TSPAN7-Färbung gezeigten Gewebeareale stammen jeweils aus demselben Präparat. Das gezeigte nichtmaligne Gewebe ist autolog zu dem klarzelligen Nierenzellkarzinom aus Abb. 4.9 C. Die PECAM1- bzw. TSPAN7-Färbung ist braun dargestellt, die Zellkerne sind blau gefärbt.

Primäre kzNZK von Patienten, die im Krankheitsverlauf keine manifesten Metastasen entwickelten (nicht metastasiert), besaßen eine höhere mediane MVD als solche, die initial oder im weiteren Krankheitsverlauf Metastasen bildeten (metastasierte kzNZK) und diese wiederum eine höhere MVD als Metastasen. Während zwischen den erstgenannten Gruppen kein signifikanter Unterschied bestand (Tab. 4.15), unterschied sich die MVD nicht metastasierter bzw. metastasierter primärer kzNZK statistisch signifikant von der in Metastasen (Abb. 4.11 C). Auch bei getrennter Betrachtung der häufigsten Metastasenlokalisationen (35x Lymphknoten, 39x Lunge, 25x Nebenniere, 13x Knochen) bestätigte sich deren signifikant geringere MVD im Vergleich zu metastasierten primären kzNZK (U-Test: $p < 0{,}050$).



Gruppenvergleich	p-Wert [2]
nicht met. *vs.* met kzNZK	n.s.
met. kzNZK *vs.* Mets	0.003
nicht met. kzNZK *vs.* Mets	0.009

Abb. 4.11: Mikrogefäßdichte von Metastasen und Primärtumoren des klarzelligen Nierenzellkarzinoms in Abhängigkeit (A, B) vom rezidivfreien Überleben der Patienten und (C) vom Metastasierungszustand. Die Mikrogefäßdichte wurde immunhistochemisch bestimmt. Der Nachbeobachtungszeitraum für Patienten mit nicht metastasierten kzNZK betrug 70 – 163 Monate. Für die in **B** im Vergleich zu **C** fehlenden metastasierten kzNZK war das genaue DFS unbekannt. (DFS = rezidivfreies Überleben; kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarzinom; met. = metastasiert; Mets = Metastasen; Mon. = Monate; n = Probenzahl; n.s. = nicht signifikant; [1] Irrtumswahrscheinlichkeit mittels Kruskal-Wallis-Test bzw. [2] U-Test nach vorherigem Kruskal-Wallis-Test mit $p < 0{,}050$ berechnet)

Des weiteren war die MVD des Primärtumorpräparats statistisch signifikant oder tendenziell höher in Patienten mit einem niedrigeren klinischen Stadium, einem geringen Tumorstadium (geringer lokaler Tumorausdehnung) bzw. ohne initiale Lymphknotenmetasierung (Tab. 4.15).

Tab. 4.15: Abhängigkeit der Mikrogefäßdichte in primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen von klinischen Parametern und dem rezidivfreien Überleben der Patienten. Die Mikrogefäßdichte wurde immunhistochemisch bestimmt. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden mittels U- bzw. [1] Kruskal-Wallis-Test (gegen nicht metastasierte Tumoren) berechnet. (DFS = rezidivfreies Überleben; klin. = klinisch; kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarzinom; Metastasierung = distante und/oder Lymphknotenmetastasierung initial oder im Verlauf; n = Probenzahl; [2] Nachbeobachtungszeit 70 – 163 Monate)

Parameter	**Probenanzahl (% von n = 106)**	**mediane Mikrogefäßdichte [Gefäße/mm^2]**	**p-Wert**
Geschlecht			n.s.
männlich	74 (68)	189	
weiblich	34 (32)	237	
Tumorstadium			0,053
pT1/2	56 (53)	258	
pT3/4	49 (46)	181	
klin. Stadium			0,023
TNM I/II	35 (33)	279	
TNM III/IV	58 (55)	182	
Tumorgrad			n.s.
G1/2	70 (66)	245	
G3	36 (34)	182	
Veneninvasion			n.s.
V0	36 (34)	238	
V1	32 (30)	171	
Lymphknotenstatus			0,048
N0	74 (70)	212	
N+	16 (15)	116	
initiale distante Metastasen			n.s.
M0	67 (63)	212	
M1	29 (27)	189	
Primärmetastasierung			n.s.
N0 M0	55 (52)	232	
N+ und/oder M1	38 (36)	182	
Metastasierung			n.s.
nicht metastasiert [2]	21 (20)	299	
metastasiert	82 (77)	217	
DFS			n.s. [1]
$\geq$ 36 Monate	18 (17)	235	
$\leq$ 12 Monate	46 (43)	186	
DFS			n.s. [1]
$>$ 24 Monate	23 (22)	236	
$\leq$ 24 Monate	54 (51)	182	

Für die Überlebensanalysen wurden die primären kzNZK in Abhängigkeit von ihrer MVD in zwei Gruppen (< bzw. > Median) geteilt. Patienten mit einer höheren als der medianen MVD hatten ein längeres DFS, TSS und OS als Patienten mit einer geringeren als der medianen MVD, wobei diese Unterschiede keine statistische Signifikanz erreichten (nicht gezeigt). Die rezidivfreie 10-Jahresüberlebensrate lag für Patienten mit einer höheren als der medianen MVD bei 39 %, für Patienten mit einer geringeren als der medianen MVD bei 24 %. Die tumorspezifischen 10-Jahresüberlebensraten betrugen entsprechend 84 % bzw. 70 %, die 10-Jahres-Gesamtüberlebensraten 80 % bzw. 65 %.

4.2.4 Immunhistochemische TSPAN7-Färbung

In den untersuchten Präparaten wurden sowohl TSPAN7-positive Tumor- (kzNZK, papilläre NZK, Onkozytome) bzw. Tubulizellen (nichtmaligne Nierengewebe) als auch TSPAN7-positive Gefäße beobachtet. Außerdem waren die Kapillaren der Glomeruli der nichtmalignen Gewebe TSPAN7-positiv und in einigen Tumorpräparaten wurden TSPAN7-positive Immunzellen wie Makrophagen verzeichnet.

TSPAN7-Färbung von Tubuli- bzw. Tumorzellen

Für die Auswertung standen 114 kzNZK, acht papilläre NZK und elf Onkozytome sowie 119 autologe nichtmaligne Nierengewebe von insgesamt 133 Patienten zur Verfügung. Des weiteren waren 181 Metastasen von 95 kzNZK-Patienten verfügbar. Zum Vergleich mit den Tumorzellen wurden die Tubulizellen der nichtmalignen Nierengewebe herangezogen, da sie Ursprungsort des NZK sind.

Die hauptsächliche TSPAN7-Lokalisation in den Tumor- und Tubulizellen war das Zytoplasma, wobei das Färbemuster in den Tubulizellen nichtmaligner Gewebe und in Onkozytomzellen häufig inhomogen und granulär war (Abb. 4.9 C, S. 68; Abb. 4.10, S. 69). Eine zytoplasmatische TSPAN7-Färbung der Tumor-/Tubulizellen war in 10/114 (9 %), 4/8 (50 %), 10/11 (91 %) bzw. 118/119 (99 %) kzNZK, papillären NZK, Onkozytomen bzw. nichtmalignen Geweben zu beobachten. Die mediane Färbeintensität betrug 1,0 (1,0 – 2,0), 1,5 (1,0 – 2,0), 1,5 (1,0 – 2,0) bzw. 2,0 (1,0 – 3,0). Eine überwiegend schwache bis mittlere membranäre Färbung wurde lediglich in kleinen Bereichen einzelner Zellen (im Median 5 – 10 %) beobachtet und war daher schwierig zu beurteilen. Eine solche Färbung zeigten 10/114 (9 %), 2/8 (25 %), 9/11 (82 %) bzw. 114/119 (96 %) kzNZK, papilläre NZK, Onkozytome bzw. nichtmaligne Nierengewebe. Weiterhin trat in mehreren Tumorproben und einigen nichtmalignen Geweben eine nukleäre Färbung auf. Nach Rücksprache mit einer erfahrenen Pathologin erwies sich diese jedoch als unspezifisch und wurde nicht in die weitere Auswertung einbezogen.

Da in den NZK insgesamt nur ein geringer Teil der einzelnen Zellkompartimente TSPAN7-positiv war, wurden für die weitere Auswertung alle positiven Zellkompartimente kombiniert und nur zwischen TSPAN7-positiven und -negativen Tumoren unterschieden. Demnach zeigten alle nichtmalignen Nierengewebe (119/119) und Onkozytome (11/11) eine TSPAN7-Färbung der Tubuli- bzw. Tumorzellen. Im Gegensatz dazu wiesen nur 4/8 (50 %) der untersuchten papillären und nur 18/114 (16 %) der kzNZK TSPAN7-positive Tumorzellen auf. Der kzNZK-Anteil mit TSPAN7-positiven Tumorzellen war statistisch signifikant gerin-

ger als der Anteil nichtmaligner Gewebe mit TSPAN7-positiven Tubulizellen (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p < 0{,}001$). Weiterhin zeigten 41/181 (23 %) kzNZK-Metastasen eine positive TSPAN7-Färbung der Tumorzellen. Der Anteil der Metastasen mit TSPAN7-positiven Tumorzellen war dabei nicht signifikant höher als der der primären kzNZK (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p > 0{,}050$).

Außerdem wurden keine signifikanten Unterschiede in der TSPAN7-Positivität der kzNZK-Zellen in Abhängigkeit von klinischen Parametern (T, N, M, TNM, G) oder der Prognose der Patienten (DFS, TSS, OS) festgestellt ($p > 0{,}050$).

TSPAN7-Färbung von Gefäßstrukturen

TSPAN7-positive Gefäßstrukturen wurden in den kzNZK, den papillären NZK, den Onkozytomen und den nichtmalignen Nierengeweben nachgewiesen. Lediglich in den kzNZK konnten die TSPAN7-positiven Gefäße valide gezählt werden, da hier die Färbung der Tumorzellen negativ oder schwach war und somit die Positivität der Gefäße nicht überdeckte. Achtundachtzig der 106 (83 %) auswertbaren primären kzNZK und 100 der 160 (63 %) auswertbaren kzNZK-Metastasen wiesen TSPAN7-positive Gefäße auf. Die Metastasen stammten von 91 kzNZK-Patienten, wobei im Median pro Patient eine Metastase (1 – 8) vorhanden war. Im Median besaßen sowohl die TSPAN7-gefäßpositiven primären kzNZK als auch die kzNZK-Metastasen vier (1 – 40 bzw. 1 – 90) TSPAN7-positive Gefäße in einer Gewebestanze. Für 95/106 kzNZK-Patienten waren Nachbeobachtungsdaten vorhanden. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 60 (1 – 184) Monate.

Spät entstandene Metastasen besaßen eine signifikant höhere Anzahl TSPAN7-positiver Gefäße als früh entstandene (DFS > 24 *vs.* ≤ 24 Monate; Abb. 4.12 A). In primären kzNZK war kein signifikanter Unterschied in der Zahl TSPAN7-positiver Gefäße zwischen später und früher Metastasierung feststellbar. Dies galt sowohl für eine DFS-Grenze von 24 Monaten als auch für strengere DFS-Kriterien (DFS ≥ 36 *vs.* ≤ 12 Monate; Abb. 4.12 B; Tab. 4.16). Die Zahl TSPAN7-positiver Gefäße in den Metastasen zeigte eine schwache ($\rho = 0{,}29$), aber statistisch höchst signifikante ($p < 0{,}001$) positive Korrelation zum DFS. In den primären kzNZK korrelierte die Zahl TSPAN7-positiver Gefäße nicht mit dem DFS der Patienten.

Sowohl früh als auch spät metastasierte primäre kzNZK wiesen eine statistisch signifikant geringere Anzahl TSPAN7-positiver Gefäße auf als nicht metastasierte kzNZK (Abb. 4.12 B). Des weiteren nahm die Anzahl TSPAN7-positiver Gefäße kontinuierlich und statistisch signifikant ab von nicht metastasierten primären kzNZK über metastasierte primäre kzNZK zu Metastasen (Abb. 4.12 C). In diesen Vergleich wurden alle verfügbaren Metastasen unabhängig von ihrer Lokalisation einbezogen. Bei Betrachtung einzelner Metastasenlokalisationen zeigte sich ebenfalls eine signifikant bzw. tendenziell geringere Zahl TSPAN7-positiver Gefäße in Lymphknoten- ($n = 38$; $p = 0{,}004$), pulmonalen ($n = 29$; $p = 0{,}059$) und ossären Metastasen ($n = 8$; $p = 0{,}055$) im Vergleich zu metastasierten primären kzNZK.

Patienten mit einem niedrigen Tumorstadium, einem niedrigen klinischen Stadium, ohne initiale Lymphknotenmetastasierung bzw. ohne Metastasierung im weiteren Krankheitsverlauf wiesen eine statistisch signifikant höhere Anzahl an TSPAN7-positiven Gefäßen in ihrem Primärtumor auf als die jeweilige Vergleichsgruppe (Tab. 4.16).

Für die Überlebensanalysen wurden die primären kzNZK nach der Anzahl ihrer Gewebestanzen mit TSPAN7-positiven Gefäßen in zwei Gruppen geteilt. Patienten, die in beiden

untersuchten Stanzzylindern TSPAN7-positive Gefäße aufwiesen, besaßen ein statistisch signifikant längeres DFS, TSS (Abb. 4.13) und OS (p = 0.012) als Patienten mit nur einem oder keinem TSPAN7-gefäßpositiven Stanzzylinder. Das mediane DFS betrug für Patienten mit zwei TSPAN7-gefäßpositiven Stanzen 128 Monate (95 %-CI = 58 – 198 Monate) und für Patienten mit nur einer oder keiner TSPAN7-gefäßpositiven Stanze 49 Monate (95 %-CI = 34 – 63 Monate). Medianes TSS und OS waren in der zur Verfügung stehenden Nachbeobachtungszeit noch nicht erreicht.

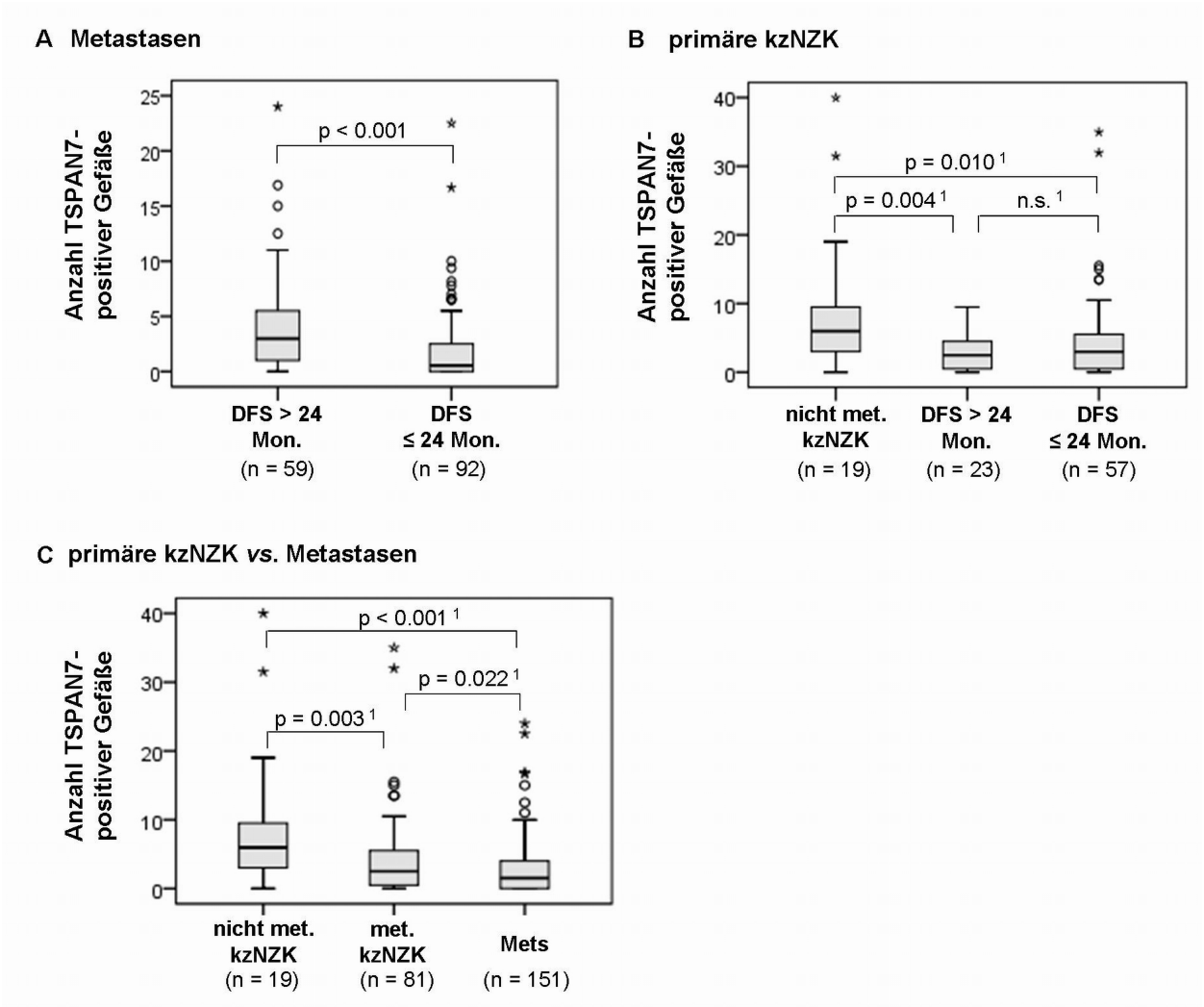
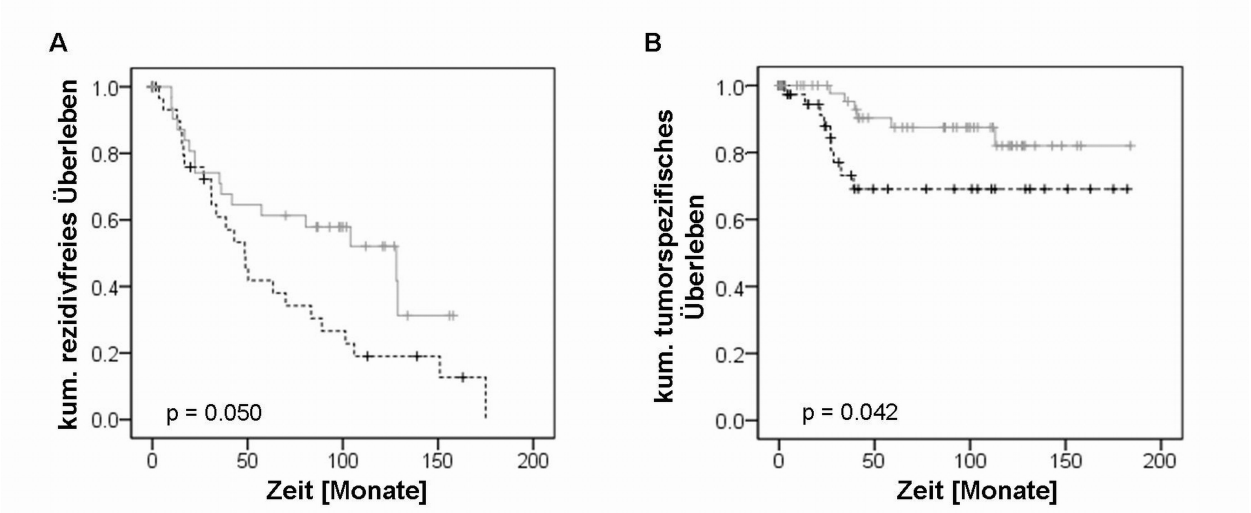


Abb. 4.12: Anzahl TSPAN7-positiver Gefäße in Metastasen und Primärtumoren des klarzelligen Nierenzellkarzinoms in Abhängigkeit (A, B) vom rezidivfreien Überleben und (C) vom Metastasierungszustand der Patienten. Die Zahl TSPAN7-positiver Gefäße wurde immunhistochemisch bestimmt. Der Nachbeobachtungszeitraum für Patienten mit nicht metastasierten kzNZK betrug 70 – 163 Monate. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden mittels U-Test berechnet. Für einen Patienten mit metastasiertem kzNZK war das DFS nicht genau spezifiziert, so dass dieser Patient zwar in **(C)**, aber nicht in **(B)** einbezogen wurde. (DFS = rezidivfreies Überleben; kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarzinom; met. = metastasiert; Mon. = Monate; n = Probenzahl; [1] vorheriger Kruskal-Wallis-Test gegen nicht metastasierte primäre kzNZK mit $p < 0{,}050$)

Tab. 4.16: Abhängigkeit der Anzahl TSPAN7-positiver Gefäße in primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen von klinischen Parametern und dem rezidivfreien Überleben der Patienten. Die Zahl TSPAN7-positiver Gefäße wurde immunhistochemisch bestimmt. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden mittels U-Test berechnet. (DFS = rezidivfreies Überleben; klin. = klinisch; Metastasierung = distante und/oder Lymphknotenmetastasierung initial oder im Verlauf; pos. = positive; [1] Nachbeobachtungszeit 70 – 163 Monate; [2] vorheriger Kruskal-Wallis-Test gegen nicht metastasierte primäre Nierenzellkarzinome mit $p < 0{,}050$)

Parameter	**Probenanzahl (% von n = 106)**	**Anzahl TSPAN7-pos. Gefäße (Median)**	**p-Wert**
Geschlecht			n.s.
männlich	74 (70)	3,0	
weiblich	32 (30)	3,5	
Tumorstadium			0,013
pT1/2	53 (50)	4,0	
pT3/4	52 (49)	1,8	
klin. Stadium			0,002
TNM I/II	32 (30)	5,5	
TNM III/IV	61 (58)	2,0	
Tumorgrad			n.s.
G1/2	69 (65)	3,0	
G3	37 (35)	3,5	
Veneninvasion			n.s.
V0	36 (34)	3,5	
V1	35 (33)	2,5	
Lymphknotenstatus			0,044
N0	71 (67)	3,5	
N+	18 (17)	0,5	
initiale distante Metastasen			n.s.
M0	64 (60)	3,0	
M1	31 (29)	3,5	
Primärmetastasierung			n.s.
N0 M0	51 (48)	3,5	
N+ und/oder M1	42 (40)	2,8	
Metastasierung			0,003
nicht metastasiert [1]	19 (17)	6,0	
metastasiert	81 (76)	2,5	
DFS			n.s. [2]
$\geq$ 36 Monate	19 (18)	2,5	
$\leq$ 12 Monate	48 (45)	3,0	
DFS			n.s. [2]
$>$ 24 Monate	23 (22)	2,5	
$\leq$ 24 Monate	57 (54)	3,0	



Sym-bol	Anz. TSPAN7-gefäßpos. Stanzen	n (Ereig-nisse)	rezidivfreie 5-JÜR	10-JÜR
	≤ 1	33 (24)	34 %	19 %
	2	35 (16)	62 %	37 %

Sym-bol	Anz. TSPAN7-gefäßpos. Stanzen	n (Ereig-nisse)	tumorspezifische 5-JÜR	10-JÜR
	≤ 1	46 (9)	70 %	70 %
	2	55 (6)	87 %	82 %

Abb. 4.13: Rezidivfreies und tumorspezifisches Überleben von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der Anzahl TSPAN7-gefäßpositiver Stanzzylinder ihrer Primärtumoren. Die TSPAN7-Positivität wurde immunhistochemisch bestimmt. Die Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt, je nachdem, ob beide bzw. nur eine oder keine der zwei untersuchten Gewebestanzen TSPAN7-positive Gefäße aufwies. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden mittels Log-Rank-Test berechnet. Die jeweils unter den Bildern stehenden Tabellen zeigen die in die Analysen einbezogenen Patientenzahlen, die Anzahl der eingetretenen Ereignisse in jeder Gruppe sowie die 5- und 10-JÜR. (Anz. = Anzahl; gefäßpos. = gefäßpositiv; JÜR = Jahresüberlebensrate; kum. = kumulative; n = Patientenzahl)

Kombination von PECAM1- und TSPAN7-Färbung

Für 100 primäre kzNZK und 156 kzNZK-Metastasen lagen sowohl Daten der PECAM1- als auch der TSPAN7-Färbung vor. Die Zahl PECAM1-positiver Gefäße repräsentiert dabei die Gesamtzahl der Gefäße. In 99/100 Primärtumoren und 155/156 Metastasen war die Zahl der TSPAN7-positiven Gefäße deutlich geringer als die der PECAM1-positiven Gefäße. Das mediane Verhältnis von TSPAN7- zu PECAM1-positiven Gefäßen betrug 0,06 (0 – 0,33) bzw. 0,03 (0 – 0,51). Die Zahl PECAM1-positiver Gefäße, und somit auch die MVD, zeigte eine mittlere, höchst signifikante Korrelation zur Zahl TSPAN7-positiver Gefäße ($\rho = 0{,}50$; $p < 0{,}001$).

Eine hohe MVD bzw. eine höhere Zahl TSPAN7-gefäßpositiver Stanzzylinder war mit einem langen DFS, TSS und OS der Patienten assoziiert. Statistische Signifikanz erreichten diese Unterschiede jedoch nur für TSPAN7. Hier wurde nun untersucht, ob das Verhältnis der Zahl TSPAN7-positiver zu PECAM1-positiven Gefäßen einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der kzNZK-Patienten hat. Nach Einteilung der Patienten in zwei Gruppen basierend auf dem medianen TSPAN7/PECAM1-Verhältnis zeigte sich kein Unterschied im DFS oder TSS der Patienten in den beiden Gruppen ($p > 0{,}050$).

Prognostische Relevanz von TSPAN7

Da sich das DFS und das TSS von kzNZK-Patienten in Abhängigkeit von der MVD oder dem Verhältnis TSPAN7/PECAM1-positiver Gefäße nicht signifikant unterschieden, wurde im Folgenden nur TSPAN7 in die multivariaten Analysen einbezogen. Univariate Cox-Analysen zeigten, dass das Vorhandensein TSPAN7-positiver Gefäße in beiden untersuchten Gewebestanzen im Vergleich zu keiner oder nur einer TSPAN7-gefäßpositiven Stanze mit einem längeren DFS und TSS der Patienten assoziiert war (Tab. 4.17). In anschließenden multivariaten Analysen zeigte lediglich das Tumorstadium einen von den anderen Variablen unabhängigen Einfluss auf das DFS. TSPAN7 war somit kein unabhängiger prognostischer Marker für das DFS. Die Veneninvasion V wurde zur Modellerstellung nicht in die multivariate Analyse einbezogen, da hier nur Daten für 41 Patienten verfügbar waren. Die Betrachtung dieser geringen Patientenzahl ergab allerdings auch das pathologische Tumorstadium als einzigen unabhängigen prognostischen Marker für das DFS (nicht gezeigt). Auf das TSS hatte TSPAN7, nach der Adjustierung auf prognostisch relevante klinische Parameter, allerdings einen unabhängigen Einfluss (Tab. 4.17).

Tab. 4.17: Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse für (A) das rezidivfreie und (B) das tumorspezifische Überleben unter Einbeziehung klinischer Parameter und der Zahl TSPAN7-gefäßpositiver Gewebestanzen. Die TSPAN7-Positivität wurde immunhistochemisch bestimmt. Die angegebenen Patientenzahlen gelten für die multivariate Analyse. Die HR bezieht sich auf den jeweils angegebenen Vergleich. Die TSPAN7-Gefäßpositivität wurde in Abhängkeit davon, ob null oder eine bzw. zwei von zwei Stanzen TSPAN7-positive Gefäße aufwiesen, in zwei Gruppen unterteilt. (CI = Konfidenzintervall; HR = „hazard ratio"; kont. = Parameter als kontinuierliche Größe einbezogen; m = männlich; n = Patientenzahl; NA = nicht in multivariate Analyse einbezogen; n.s. = nicht signifikant; w = weiblich; [1] nicht in multivariate Analyse einbezogen, da nur Daten für 41 Patienten verfügbar; [2] nicht in multivariate Analyse einbezogen, da sonst Koeffizienten nicht konvergierten)

Parameter (Bezugsgröße)	**univariate Analyse HR (95 %-CI)**	**p-Wert**	**multivariate Analyse HR (95 %-CI)**	**p-Wert**
A rezidivfreies Überleben (n = 62, 34 Ereignisse)				
Geschlecht (m *vs.* w)	1,07 (0,57 – 2,01)	n.s.	NA	NA
Tumorstadium (pT3/4 *vs.*pT1/2)	2,97 (1,58 – 5,56)	0,001	3,04 (1,51 – 6,10)	0,002
Tumorgröße (kont.) [cm]	1,14 (1,02 – 1,26)	0,017	1,10 (0,93 – 1,22)	n.s.
N (N+ *vs.* N0)	2,81 (1,04 – 7,60)	0,041	1,20 (0,38 – 3,83)	n.s.
V (V1 *vs.* V0)	3,30 (1,52 – 7,15)	0,002	NA [1]	NA [1]
Tumorgrad (G3 *vs.* G1/2)	2,08 (0,98 – 4,42)	0,058	2,16 (0,68 – 6,90)	n.s.
TSPAN7 ($\leq$ 1 *vs.* 2 gefäß-positive Stanzen)	1,88 (0,99 – 3,57)	0,054	1,30 (0,61 – 2,76)	n.s.
B tumorspezifisches Überleben (n = 77, 10 Ereignisse)				
Geschlecht (m *vs.* w)	2,41 (0,68 – 8,56)	n.s.	NA	NA
Tumorstadium (pT3/4 *vs.* pT1/2)	5,38 (1,51 – 19,12)	0,009	6,47 (0,76 – 54,87)	0,087
Tumorgröße (kont.) [cm]	1,31 (1,13 – 1,51)	$< 0{,}001$	NA [2]	NA [2]
N (N+ *vs.* N0)	9,00 (2,70 – 29,74)	$< 0{,}001$	9,30 (1,70 – 50,91)	0,010
M (M1 *vs.* M0)	4,50 (1,55 – 13,09)	0,006	1,82 (0,44 – 7,57)	n.s.
V (V1 *vs.* V0)	1,87 (0,55 – 6,40)	n.s.	NA	NA
Tumorgrad (G3 *vs.* G1/2)	5,75 (2,00 – 16,64)	0,001	6,10 (1,41 – 26,41)	0,016
TSPAN7 ($\leq$ 1 *vs.* 2 gefäß-positive Stanzen)	2,81 (0,99 – 7,92)	0,051	7,85 (1,43 – 43,05)	0,018

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden genomweite Expressionsanalysen an pulmonalen kzNZK-Metastasen und primären kzNZK mit unterschiedlich langen DFS durchgeführt. Dabei sollten Gene identifiziert werden, die mit der Latenzphase der Tumorzellen im Sekundärorgan und somit mit dem DFS der Patienten assoziiert sind. Diese in den Metastasen und Primärtumoren deregulierten Gene sind potenziell funktionell an der Ausprägung der Tumorzelllatenz beteiligt und prognostisch nutzbar. Um weiterhin Patienten identifizieren zu können, die im Krankheitsverlauf keine manifesten Metastasen entwickeln, wurden diese metastasierten primären kzNZK mit nicht-metastasierten Tumoren verglichen. Durch den Abgleich mit Literaturdaten und die Erstellung von Vorhersagemodellen sowie basierend auf funktionellen Aspekten wurden Gene ausgewählt, deren differenzielle Expression und prognostische Eignung mit unabhängigen Methoden an großen Patientenkollektiven untersucht wurden.

Bevor die Ergebnisse der „Microarray“- und Validierungstudien diskutiert werden, folgen zunächst einige allgemeine Überlegungen zur Auswertung von „Microarray“-Analysen.

5.1 „Microarray“-Analysen

5.1.1 Biostatistische Auswertung der „Microarray“-Daten

Trotz langjähriger Erfahrungen in der „Microarray“-Technologie und großer Anstrengungen hinsichtlich einer Standardisierung existieren bisher keine Richtlinien zur Datenauswertung. Problematisch ist insbesondere die Expressionsanalyse einer Vielzahl von Genen an einer in Relation dazu sehr geringen Probenzahl. Es wurden verschiedene Präprozessierungs- und Auswertealgorithmen vorgeschlagen, die häufig unterschiedliche Ergebnisse liefern [Millenaar *et al.*, 2006; Cui & Churchill, 2003; Quackenbush, 2001]. Generell tendiert man zur Wahl des Algorithmus mit einem „biologisch sinnvollen“ Ergebnis. Konsensus ist mittlerweile lediglich eine Korrektur der verwendeten statistischen Tests für multiples Testen.

Hintergrundkorrektur, Normalisierung und Signalberechnung

Bereits verschiedene Algorithmen für Hintergrundkorrektur, Normalisierung und Signalberechnung können in den Folgeanalysen zu deutlichen Unterschieden in den differenziell exprimierten Genen führen [Millenaar *et al.*, 2006; Seo & Hoffman, 2006]. Der wichtigste Unterschied der verschiedenen Methoden zur Auswertung von „Microarrays“ der Fa. Affymetrix liegt dabei in der grundsätzlichen Entscheidung, ob die „mismatch“-Sonden in die Signalberechnung einbezogen werden. Zur Korrektur unspezifischer Bindungen, für die sie ursprünglich vorgesehen waren [Affymetrix, 2004], erscheinen die „mismatch“-Sonden eher ungeeignet, da sie häufig ein höheres Signal als die zugehörigen „perfect match“-Sonden liefern [Millenaar *et al.*, 2006]. Dementsprechend liefern die Verfahren, die eine Signalberechnung nur auf Grundlage der „perfect match“-Sonden durchführen (z. B. RMAExpress; dChip PM) [Irizarry *et al.*, 2003; Li & Wong, 2003], reproduzierbarere Ergebnisse. Die mittels RMAEx-

press berechneten Expressionswerte korrelieren dabei am stärksten mit den entsprechenden qPCR-Daten [Millenaar *et al.*, 2006; Seo & Hoffman, 2006].

Weiterhin liefert die im RMAExpress-Algorithmus implementierte Quantilnormalisierung, im Gegensatz zur Signalskalierung auf eine einheitliche mittlere Intensität [Li & Wong, 2003] und zur Intensitätsanpassung anhand von nicht-regulierten Genen [Affymetrix, 2004], eine gute Korrektur der technischen Varianz unabhängig von der Signalintensität [Bolstad *et al.*, 2003]. Aus den genannten Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit der RMAExpress-Algorithmus zur Hintergrundkorrektur, Normalisierung und Signalberechnung verwendet.

Statistische Tests zur Identifikation differenziell exprimierter Gene

Meist werden zur Auswertung von „Microarray"-Daten parametrische Tests wie t-Test und ANOVA verwendet, da diese für normalverteilte Daten mit homogener Varianz weniger falsch negative Ergebnisse liefern als nicht-parametrische Tests. In „Microarray"-Analysen werden diese strengen Voraussetzungen selbst nach log_2-Transformation der Daten allerdings niemals von allen betrachteten Genen erfüllt. Auch die Forderung nach Unabhängigkeit der durchgeführten Tests trifft im Fall von Expressionsanalysen nicht vollständig zu. Deshalb werden diese parametrischen Tests z. B. durch eine empirische Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeiten mittels Permutationsanalyse, die keine spezifische Verteilungsfunktion und keine Unabhängigkeit der Daten fordert, modifiziert [Peng & Stromberg, 2003; Dudoit *et al.*, 2002].

Da in „Microarray"-Analysen ein statistischer Test auf tausende Gene gleichzeitig angewendet wird, steigt die Wahrscheinlichkeit p, ein falsch positives Ergebnis zu erhalten. Von 1.000 durchgeführten Tests, deren p-Werte jeweils auf dem Signifikanzniveau 0,05 kontrolliert werden, liefern 5 %, also 50 Tests, ein falsch positives Ergebnis. Um diese Rate möglichst gering zu halten, muss die Irrtumswahrscheinlichkeit p für multiples Testen korrigiert werden. Neben der in dieser Arbeit verwendeten FDR, die die Rate an falsch positiven unter allen positiven Ergebnissen repräsentiert [Benjamini & Hochberg, 1995], existiert hierfür die sog. FWER („family-wise error rate"). Sie kontrolliert die Wahrscheinlichkeit, mindestens ein falsch positives Ergebnis innerhalb aller durchgeführten Tests m zu erhalten ($q = p/m$). Sie ist konservativer als die FDR und liefert somit weniger statistisch signifikante Ergebnisse [Dudoit *et al.*, 2002]. Bei Kontrolle der FWER sind somit viele der als signifikant ermittelten Gene auch tatsächlich signifikant unterschiedlich exprimiert, während bei der FDR-Kontrolle möglichst viele der tatsächlich statistisch signifikant unterschiedlich exprimierten Gene auch als solche erkannt werden. Die auch in der vorliegenden Arbeit verwendete FDR-Kontrolle ist insbesondere für „Microarray"-Analysen an heterogenen humanen Proben besser geeignet als die der FWER, da man so eine größere Zahl potenzieller Kandidatengene identifizieren und damit auch globale Effekte bewerten kann [Reiner *et al.*, 2003]. Da die FDR von der Verteilung der nominalen (nicht-korrigierten) p-Werte abhängt, ist sie je nach dem Anteil der positiven an allen durchgeführten Tests unterschiedlich konservativ. Für einen geringen Anteil positiver Tests (signifikant unterschiedlich exprimierter Gene) nähert sie sich der FWER an, für einen hohen Anteil der Irrtumswahrscheinlichkeit ohne Korrektur p [Reiner *et al.*, 2003].

Anzahl der Replikate

Entgegen dem gängigen Verfahren, Ergebnisse durch Verwendung einer möglichst großen Probenzahl abzusichern, werden bei kostenintensiven „Microarray“-Analysen oft eher kleine Probenzahlen untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Probenzahlen sind für die Untersuchung humaner Gewebeproben durchaus gängig [z. B. Yao *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007]. Beispielsweise identifizierten Yao *et al.* [2008] eine prognoserelevante Gensignatur in kzNZK durch den Vergleich von 16 metastasierten und 11 nicht metastasierten Tumoren.

Ob die verwendete Probenzahl für die durchgeführten Analysen ausreicht, lässt sich anhand der grafischen Darstellung des relativen Variationskoeffizienten der Expression ausgewählter Gene in Abhängigkeit von einer steigenden Zahl an Replikaten abschätzen [Affymetrix, 2004]. Abb. 5.1 zeigt dies exemplarisch für die Gruppen der frühen Metastasen und früh metastasierten Primärtumoren anhand der Expression von sechs Genen unterschiedlicher Expressionshöhe. Die Diagramme für die spät entwickelten Metastasen sowie die nicht metastasierten und spät metastasierten Primärtumoren waren zu den dargestellten vergleichbar (nicht gezeigt). Der Variationskoeffizient erreicht mit einer steigenden Probenzahl für fast alle Gene einen nahezu konstanten Wert. Somit sollte eine größere Probenzahl die Ergebnisse von ANOVA und t-Test, deren Testgröße die der mittleren Abweichung verwandte Standardabweichung ist und die zur Identifikation differenziell exprimierter Gene herangezogen wurden, nicht deutlich beeinflussen [Affymetrix, 2004].

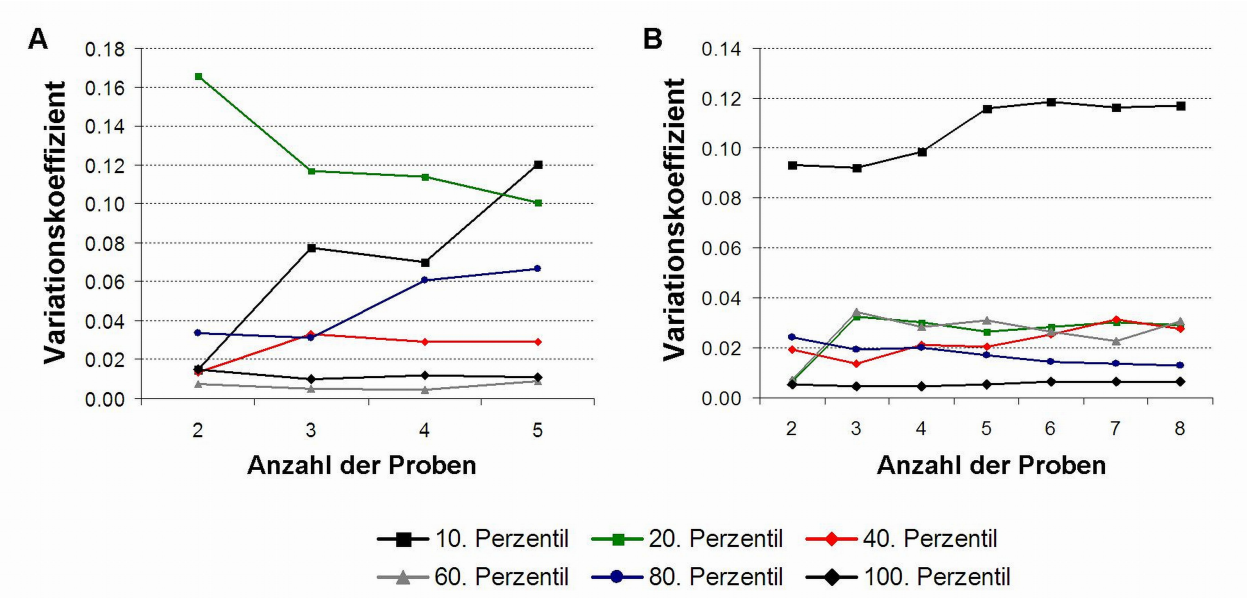


Abb. 5.1: Relativer Variationskoeffizient (mittlere Abweichung/Mittelwert) der mittels „Microarrays“ gemessenen Expressionswerte ausgewählter Gene in (A) früh entwickelten Metastasen und (B) früh metastasierten primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen in Abhängigkeit von der Anzahl der biologischen Replikate. Die Zahl der biologischen Replikate entspricht der Zahl der in der jeweiligen Gruppe untersuchten Proben. Die dargestellten Daten beziehen sich auf Gene, deren mittlere Expressionshöhe über alle „Arrays“ etwa dem 10., 20., 40., 60., 80. bzw. 100. Perzentil entsprachen.

Auswertung der „Microarray"-Daten von Metastasen und Primärtumoren

Differenziell exprimierte Gene können anhand (1) eines minimalen n-fachen bzw. (2) eines statistisch signifikanten Expressionsunterschieds zwischen den verglichenen Gruppen identifiziert werden. Die n-fache Änderung sagt allerdings nichts über die Streuung der Werte aus, die statistische Testgröße nichts über das Ausmaß der Änderung [Blalock, 2003]. Außerdem sind statistische Tests allein bei einer geringen Probenzahl nicht verlässlich [Blalock, 2003]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Kombination beider Möglichkeiten verwendet.

Generell ist es sinnvoll, zunächst die Gene mit einer hohen Variationsbreite ihrer Expression in den untersuchten Proben zu identifizieren und erst nach diesem Filtern statistische Tests anzuwenden [Quackenbush, 2001]. In der vorliegenden Arbeit wurden für diese Selektion zwei verschiedene Vorgehensweisen angewendet. Beim Vergleich später und früher Metastasen wurden zunächst gezielt die Gene mit einer großen n-fachen Expressionsänderung herausgesucht. Die n-fache Änderung liefert bei der geringen untersuchten Probenzahl (6 *vs.* 5 Proben) wahrscheinlich robustere Ergebnisse als statistische Tests, die deshalb erst im nächsten Schritt angewendet wurden. Von den 2557 Sondensets, die eine mindestens 1,8-fache Expressionsänderung zeigten, waren 414 (16 %) statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert ($q < 0{,}050$). Bei diesem Anteil an positiven unter allen durchgeführten Tests ist die FDR-Korrektur noch streng genug [Dudoit *et al.*, 2002].

In den Primärtumoranalysen waren die Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sehr gering (nicht gezeigt) und können somit leicht durch technische Varianzen verfälscht werden. Durch eine geeignete „batch"-Korrektur [Kitchen *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2008] können die Daten von solchen Einflüssen bereinigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Reagenziencharge, die Probenquelle und der Zeitpunkt der Probenbearbeitung als wichtigste Einflussfaktoren in die „batch"-Korrektur einbezogen. Nach der „batch"-Korrektur waren signifikante Expressionsunterschiede zwischen den verglichenen Primärtumorgruppen in Abhängigkeit vom DFS sichtbar, die auch im biologischen Kontext sinnvoll erschienen.

Anhand der nach der „batch"-Korrektur identifizierten differenziell exprimierten Gene konnten die Proben auch anhand ihrer unkorrigierten Expressionswerte annähernd in die korrekten Gruppen klassifiziert werden (Abb. 5.2). Dies lässt darauf schließen, dass die mittels „batch"-Korrektur herausgearbeiteten Effekte tatsächlich bereits vorher vorhanden und nicht durch die „batch"-Korrektur bedingt waren.

Die n-fachen Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Primärtumorgruppen waren auch nach der „batch"-Korrektur gering. Zudem wurden hier mehr Proben in die einzelnen Gruppen einbezogen (7 *vs.* 9 *vs.* 8 Proben) als beim Vergleich der Metastasen. Deshalb wurden hier — nach vorherigem Filtern der Daten, um die FDR-Korrektur nicht zu konservativ zu gestalten — zunächst die statistisch signifikant unterschiedlich exprimierten Gene identifiziert. Aus diesen wurden anschließend die Gene herausgesucht, die eine minimale intensitätsabhängige Expressionsänderung zwischen den Gruppen aufwiesen. Geringe Expressionswerte besitzen natürlicherweise größere Streuungen, so dass gering exprimierte Gene per Zufall eine große n-fachen Änderung aufweisen können [Kadota *et al.*, 2008]. Aus diesem Grund wurden für gering exprimierte Gene höhere minimale n-fache Änderungen gefordert als für hoch exprimierte. Durch dieses Vorgehen wurden gering exprimierte Gene mit hoher Streuung gezielt aus der Analyse ausgeschlossen. Solche Gene wären aufgrund

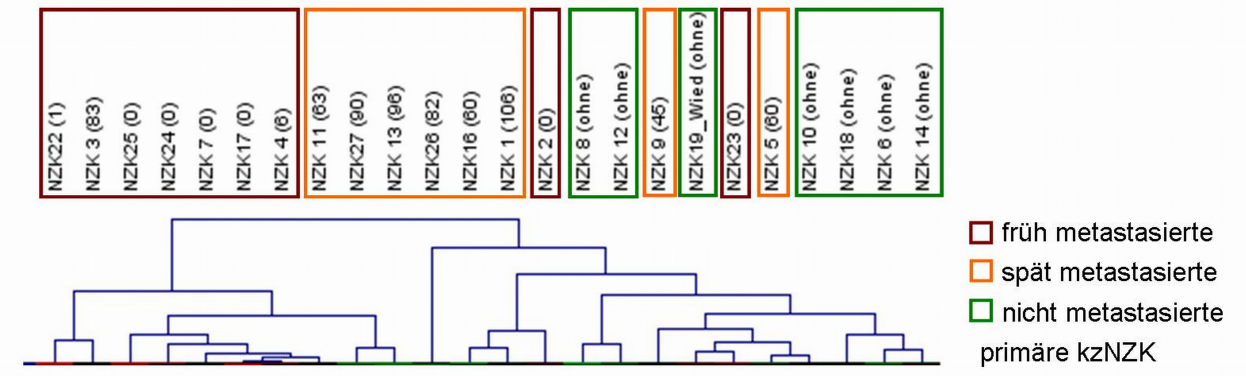


Abb. 5.2: Hierarchisches Clustern der nicht-"batch"-korrigierten Expressionsdaten der primären klarzelligen Nierenzellkarzinome. Das Clustern erfolgte anhand der 356 in nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierten Primärtumoren differenziell exprimierten Gene (457 Sondensets), die anhand der „batch"-korrigierten Expressionsdaten ermittelt wurden. Die Proben sind mit den „Microarray"-Bezeichnungen gekennzeichnet. In Klammern ist das rezidivfreie Überleben des jeweiligen Patienten bis zur Metastasendiagnose in Monaten angegeben. (kzNZK = klarzelliges Nierenzellkarzinom; ohne = nicht metastasiert mit einer Nachbeobachtungszeit $\geq$ 99 Monate)

der hohen Varianz ihrer Expressionswerte wahrscheinlich zu wenig verlässlich für spätere prognostische Tests.

5.1.2 Späte *vs.* frühe pulmonale Metastasen — potenziell funktionell an der Tumorzelllatenz beteiligte Gene

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Expressionsmuster identifiziert, die spät und früh entstandene Metastasen unterschieden. Diese Expressionsmuster charakterisieren den vorherzusagenden Phänotyp. Sie sollten somit auch funktionell an dessen Entstehung, also dem Metastasenwachstum, und möglicherweise auch an der Regulation der Latenzphase der Tumorzellen im Sekundärorgan beteiligt sein. Die vorherige Untersuchung von Metastasen zum späteren Vergleich mit Primärtumoren bietet somit den Vorteil, potenziell funktionell wichtige Kandidatengene zu identifizieren. Würde man lediglich Primärtumoren untersuchen, wären diese Muster vielleicht durch andere, funktionell nicht relevante Sekundäreffekte überdeckt. Die untersuchten Metastasen stellten ein sehr seltenes, homogenes Kollektiv dar und waren somit viel versprechend zur Identifikation neuer molekularer Marker.

In den Vergleich spät *vs.* früh entwickelte Metastasen wurden solche Tumorherde einbezogen, die sich frühestens 60 Monate nach Entfernung des Primärtumors entwickelt hatten bzw. solche, die innerhalb von neun Monaten nach Nephrektomie manifest waren. Klinisch gelten letztere als synchrone Metastasen, deren Wachstum wahrscheinlich bereits bei Anwesenheit des Primärtumors eingesetzt hat. Aufgrund ihrer zu geringen Größe vor der Nephrektomie werden solche synchronen Metastases oft erst nach der Nephrektomie diagnostiziert. Ob es sich hier auch biologisch um synchrone Metastasen handelt, ist unklar. In der Klinik wird ein Überlebensvorteil für Patienten mit einem DFS $>$ 2 Jahren gegenüber solchen mit einem DFS $\leq$ 2 Jahren beobachtet [van der Poel *et al.*, 1999]. Die in den „Microarray"-Analysen gewählten DFS-Grenzen liegen damit sicher in dem prognostisch günstigen bzw. ungünstigen

Bereich. Mit diesen Extremgruppen können existierende Expressionsunterschiede auch bei der geringen Zahl der verwendeten Proben valide identifiziert werden.

Potenziell mit der Latenzphase assoziierte Gene

Die 306 zwischen spät und früh entwickelten pulmonalen Metastasen differenziell exprimierten Gene sowie eine auf diesen basierende 6-Gensignatur differenzierten die Metastasensubgruppen vollständig voneinander. Außerdem wurden weitere unabhängige Metastasen der richtigen Subgruppe zugeordnet, was die Validität dieser Expressionsmuster zur Unterscheidung später und früher Metastasen unterstreicht.

Die Proteine dieser 306 Gene sind in Prozesse involviert, die in Tumorwachstum und Metastasierung eine wichtige Aufgabe erfüllen. Dazu gehören Angiogenese, Zellmotilität, Zelladhäsion und Signaltransduktion. Für viele dieser Gene ist weiterhin bekannt, dass ihre Proteine eine Rolle in der Metastasierung spielen. So waren beipielsweise die Gene des antiproliferativ wirkenden Rezeptors DARC, der Metalloproteinase-Inhibitoren TIMP2 und TIMP3 sowie ID3 in späten Metastasen heraufreguliert. DARC auf Endothelzellen wechselwirkt mit CD82 auf Tumorzellen und inhibiert somit die Proliferation und induziert die Seneszenz der Tumorzellen im Blutstrom, was eine weitere Metastasierung verhindert [Bandyopadhyay *et al.*, 2006]. ID3 kann den Zellzyklus nach einer Latenzphase reinitiieren [Gupta *et al.*, 2007]. Eine hohe Expression von *DARC* oder *ID3* könnte somit in der Induktion bzw. dem anschließenden Austritt aus der Latenz eine Rolle spielen.

Bisher wurden keine „Microarray"-Studien zum kzNZK oder anderen Tumorentitäten publiziert, in denen Metastasen hinsichtlich des DFS differenziert wurden. Allerdings wurden in verschiedenen Tierexperimenten Tumorzellen, die latente Tumorzellen oder Mikrometastasen bedingten mit solchen verglichen, die ohne Latenzphase (spontan) das Wachstum von Makrometastasen induzierten. In diesen Experimenten wurde also der Ausgangszustand, die latenten Tumorzellen oder Mikrometastasen, in der vorliegenden Arbeit hingegen der Endzustand, die manifesten Metastasen, betrachtet. Kluger *et al.* [2005] und Minn *et al.* [2005a] verglichen die Expressionsprofile humaner Mammakarzinomzellen (GI101A, MDA-MB-231) mit denen durch *in vivo*-Selektion aus ihnen hervorgegangenen Tochterzelllinien mit deutlich erhöhtem pulmonalen Metastasierungspotenzial. Die Tochterzellen induzierten spontane Makrometastasen, während die parentalen Zellen latente Tumorzellen bzw. Mikrometastasen bedingten. In den Vergleichen von parentalen und Tochterzelllinien identifizierten Minn *et al.* [2005a] 94 und Kluger *et al.* [2005] 102 differenziell exprimierte Gene. In der vorliegenden Arbeit waren sechs (*ATP11A*, *GSN*, *LBH*, *OLFML2A*, *PDGFA*, *SPARC*) bzw. fünf dieser Gene (*APOE*, *CSRP1*, *GAS6*, *HNMT*, *TPM2*) auch zwischen späten und frühen kzNZK-Metastasen differenziell exprimierten.

Diese Gene waren also sowohl in latenten Tumorzellen *vs.* spontanen Makrometastasen als auch in späten *vs.* frühen Metastasen differenziell exprimiert. Sie verändern somit ihre Expression vermutlich nicht grundsätzlich beim Übergang vom latenten in den manifesten Zustand. Damit stellen diese Gene potenzielle tumorintrinsische Faktoren dar, die bereits den vom Primärtumor abgesiedelten Zellen eigen sind und die Latenzzeit „vorherbestimmen".

Funktionell interessant erscheint in diesem Zusammenhang GAS6. Es wird von Osteoblasten produziert und trägt zur Bildung einer Nische für hämatopoetische Stammzellen im

Knochenmark bei [Shiozawa *et al.*, 2010]. Durch Bindung an die Rezeptortyrosinkinase AXL inhibierte GAS6 außerdem die Proliferation humaner Prostatakarzinomzellen (PC3, DU145) durch Induktion eines Zellzyklusarrests, schützte diese Zellen allerdings vor Apoptose [Shiozawa *et al.*, 2010]. Somit könnte GAS6 an der Bildung einer prämetastatischen Nische im Knochenmark (und eventuell auch in anderen Organen) beteiligt sein und die Latenz von Tumorzellen induzieren. Dieser Theorie entsprechend war *GAS6* in späten Metastasen höher exprimiert als in frühen. Passend zu dieser Theorie war eine hohe *GAS6*-Expression in primären NZK mit einem längeren Überleben der Patienten assoziiert [Gustafsson *et al.*, 2009].

Vaskularisierung als die Latenzzeit bestimmender Faktor

Die Arbeitsgruppe um Nava Almog injizierte *in vivo*-selektierte Zellklone humaner Mammakarzinom- (MDA-MB-436), Osteosarkom- (KHOS-24OS), Glioblastom- (T98G) bzw. Liposarkomzellen (SW872) in die Flanke von SCID-Mäusen [Almog *et al.*, 2009 & 2006; Naumov *et al.*, 2006a]. Verschiedene Zellklone jeder Zelllinie bildeten entweder latente Mikrotumoren oder spontane makroskopische subkutane Tumorherde. Zwischen Zellen, die latente und solchen, die makroskopische Tumorherde induzierten, waren 811 Gene differenziell exprimiert [Almog *et al.*, 2009]. Die latenten Mikrotumoren besaßen keine funktionsfähigen Gefäße, sondern lediglich Endothelzellverbände ohne Lumen. Erst nach einer definierten Latenzphase induzierten diese Tumorherde spontan Angiogenese und damit ihr Wachstum [Almog *et al.*, 2009 & 2006].

Unter den 306 in späten *vs.* frühen kzNZK-Metastasen differenziell exprimierten Genen war ebenfalls die Angiogenese/Vaskularisierung überrepräsentiert. Eine Literatursuche zeigte, dass die meisten dieser Gene (z. B. *ANGPT1*, *KDR*, *NOTCH4*, *ROBO4*) vaskularisierungsfördernde Proteine kodieren (GoPubmed, Stand 09.04.2010) [Doms & Schroeder, 2005]. Die höhere Expression der meisten dieser Gene in späten Metastasen deutet auf eine stärkere Angiogenese/Vaskularisierung in diesen prognostisch günstigeren Tumorherden hin. Diese Beobachtung war unerwartet, da eine verstärkte Angiogenese/Vaskularisierung im allgemeinen Wachstum, Invasivität und Metastasierung von Tumoren begünstigt [Sharma *et al.*, 2005; Hanahan & Weinberg, 2000]. Allerdings waren auch *THBS1*, *CD36* und *COL4A2*, deren Proteine bzw. Proteinspaltprodukte (Canstatin) eine antiangiogene Wirkung vermitteln [Silverstein & Febbraio, 2009; Mundel & Kalluri, 2007], in späten Metastasen überexprimiert.

Auch Mammakarzinom-, Osteosarkom-, Glioblastom- und Liposarkomzellen, die in SCID-Mäusen erst nach einer definierten Latenzphase zur Makrometastase heranwuchsen, produzierten in stärkerem Maße den antiangiogenen Faktor THBS1 [Almog *et al.*, 2006; Naumov *et al.*, 2006a]. Diese antiangiogenen Faktoren können die Latenz der Tumorzellen bedingen [Huang & Bao, 2004]. Da sie allerdings auch noch in den makroskopischen späten Metastasen detektierbar waren, erscheint ihre Inhibition als Ursache für den Austritt aus der Latenz unwahrscheinlich. Möglicherweise bestimmt das Verhältnis von pro- zu antiangiogenen Faktoren die Dauer der Latenzphase. Mit zunehmender Latenzzeit könnte die Menge an proangiogenen Faktoren zunehmen und ab einem kritischen Verhältnis von pro- zu antiangiogenen Faktoren den Austritt aus der Latenz bewirken. Die von Almog *et al.* [2006] beobachteten Endothelzellverbände könnten ein Zeichen dafür sein, dass in Abhängigkeit von diesem Verhältnis die Bildung funktionsfähiger Gefäße nicht vollständig inhibiert,

sondern nur verzögert ist. Nach einer von diesem Verhältnis abhängigen definierten Zeitspanne werden möglichweise funktionsfähige Gefäße gebildet, die einen Austritt aus der Latenz bewirken.

Interessanterweise beobachteten auch Almog *et al.* [2006] eine höhere MVD in SW872-Liposarkomen, die erst nach einer Latenzphase entstanden im Vergleich zu spontanen makroskopischen Tumoren gleicher Größe. Auch latente Liposarkomzellen sekretierten mehr proangiogenes VEGF und FGF2 als Tumorzellen, die sofort Makrometastasen bildeten. Für latente Mammakarzinom-, Osteosarkom- und Glioblastomzellen wurde dieser Effekt allerdings nicht beobachtet [Naumov *et al.*, 2006a]. Die erhöhte Produktion proangiogener Faktoren in latenten Zellen scheint somit ein von der Zelllinie bsw. der Tumorentität abhängiger Effekt zu sein. Das höhere proangiogene Potenzial der späten kzNZK-Metastasen ist somit wahrscheinlich auch ein kzNZK-spezifischer Effekt. Im Gegensatz zu der gängigen Theorie, dass Tumorwachstum und -progression durch eine starke Vaskularisierung begünstigt werden, geht eine höhere MVD im kzNZK mit einer besseren Prognose einher [Sandlund *et al.*, 2007a]. Dieser in Primärtumoren beobachtete Effekt kann einfach von den Metastasen „geerbt“ worden sein. Unterstützt wird diese Überlegung durch eine Studie an Mammakarzinomen [van den Eynden *et al.*, 2007]. Laut dieser sind Metastasen hinsichtlich der Expression (lymph-)angiogeneseassoziierter Gene ihren autologen Primärtumoren ähnlicher als Metastasen aus demselben Organ.

Neben der Angiogenese war auch die Zellmotilität in späten im Vergleich zu frühen Metastasen aktiviert (GoPubmed, Stand 09.04.2010) [Doms & Schroeder, 2005]. Wahrscheinlich handelt es sich hier um eine erhöhte Motilität der Endothelzellen im Zuge der Angiogenese und nicht um eine erhöhte Motilität der Tumorzellen.

Vergleich unterschiedlicher Metastasenzahlen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden pulmonale Metastasen nicht nur bezüglich ihres DFS verglichen, sondern auch bezüglich der Gesamtzahl der Metastasen der entsprechenden Patienten [Wuttig *et al.*, 2009]. Die Ergebnisse sollen hier nur kurz erwähnt und mit denen der DFS-Analysen verglichen werden. Es ist bekannt, dass Patienten mit solitären Metastasen eine bessere Prognose haben als Patienten mit multiplen Metastasen [Junker *et al.*, 2003a]. Klinisch gehen frühe Metastasen oft mit einer multiplen Metastasierung, also einer großen Metastasenzahl, einher. Späte Metastasen sind hingegen oft solitär. Somit wird eine frühe multiple Metastasierung oft als ein gemeinsamer Effekt eines aggressiven Tumors betrachtet. Während in den in späten *vs.* frühen Metastasen differenziell exprimierten Genen die Angiogenese überrepräsentiert war, war zwischen Metastasen, die aus Patienten mit sehr wenigen bzw. multiplen Metastasen stammten (≤ 8 *vs.* ≥ 16), insbesondere der Prozess der Zellteilung (z. B. *PBK*, *PTTG1*, *CKS2*) dereguliert. Da die Zellteilung in Patienten mit multiplen Metastasen aktiviert war, wird eine große Metastasenzahl möglicherweise durch eine höhere Proliferationsrate bedingt. Dies verdeutlicht die Komplexität des Metastasierungsprozesses und zeigt, dass verschiedene Phänomene dieses Prozesses möglicherweise auch in funktionellen Studien getrennt voneinander untersucht werden sollten. Dies wird durch die Beobachtung von Naumov *et al.* [2006a] an humanen Mammakarzinom- (MDA-MB-436), Osteosarkom- (KHOS-24OS) und Glioblastomzellen (T98G) gestützt. Parentale Zelllinien,

die in SCID-Mäusen latente Mikrometastasen bildeten und *in vivo*-selektierte Tochterzelllinien, die spontane makroskopische Tumoren induzierten, unterschieden sich nicht in ihrer *in vitro*-Proliferationsrate und -Koloniebildungsfähigkeit.

5.1.3 Nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierte primäre Nierenzellkarzinome — potenziell prognostisch nutzbare Gene

Durch die Einbeziehung primärer kzNZK mit unterschiedlich langen DFS sollten aus den in den Metastasenanalysen identifizierten und somit potenziell funktionell relevanten Genen die herausgesucht werden, die bereits im Primärtumor dereguliert sind. Eine bereits im Primärtumor nachweisbare Expressionsveränderung kann zur Vorhersage des DFS herangezogen werden. Da Primärtumoren in der Regel zeitnah nach der Diagnose operativ entfernt werden, stehen sie quasi bei jedem Patienten für molekularbiologische Untersuchungen zur Verfügung.

Solche sowohl in Metastasen als auch in Primärtumoren deregulierten Gene repräsentieren tumorintrinsische DFS-assoziierte Faktoren. Sie sind bereits den vom Primärtumor disseminierten Zellen eigen und verändern ihre Expression beim Übergang vom latenten in den manifesten Zustand der Metastase nicht. Sie könnten die Länge der Latenzphase und somit das DFS vorherbestimmen. Mit der gewählten Vorgehensweise konnten natürlich keine Gene identifiziert werden, deren Expression sich während der Anpassung an das umliegende Gewebe in der latenten Tumorzelle verändert und so deren Wachstum bewirkt. Da es aber Ziel der Arbeit war, prognostisch relevante Gene zu identifizieren, war der Vergleich mit Primärtumoren unumgänglich.

Die Existenz tumorintrinsischer Gensignaturen wird durch verschiedene „Microarray“-Studien belegt. In ihnen wurden sowohl in primären kzNZK [Lane *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2008] als auch in Primärtumoren anderer Entitäten [Driouch *et al.*, 2007; van't Veer *et al.*, 2002] DFS-assoziierte Gensignaturen identifiziert.

Auch verschiedene experimentelle und klinische Studien stützen diese Beobachtung. Humane Tumorzelllinien weisen Latenzphasen definierter Länge auf, bis sie in SCID („severe combined immune deficiency“)-Mäusen zu manifesten Tumoren heranwachsen [Naumov *et al.*, 2006]. Dies lässt auf eine von vornherein programmierte molekulare Ursache schließen.

Bei Mammatumoren beobachteten sowohl Demicheli *et al.* [2008] an 1.526 Patientinnen als auch Karrison *et al.* [1999] an 1.100 Patientinnen zwei Peaks im DFS: den ersten etwa 18 – 24 Monate, den zweiten etwa 60 Monate nach Primärtumorentfernung. Diese Zeitspannen waren dabei unabhängig von der Lokalisation der Metastasen. Auch das deutet darauf hin, dass die Latenzphase und damit das DFS nicht durch die Anpassung an die Mikroumgebung eines bestimmten Sekundärorgans begründet ist, sondern tatsächlich durch in den Tumorzellen vorhandene genetische Programme hervorgerufen wird [Demicheli *et al.*, 2008].

Primärtumoren unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Lokalisation ihrer Metastasen in der Genexpression [Landemaine *et al.*, 2008]. Um zu verhindern, dass eine globale Metastasierungssignatur durch organspezifische Signaturen überdeckt wird, wurden Primärtumoren mit verschiedenen Metastasenlokalisationen in die Analysen einbezogen. Außerdem wurden kzNZK mit initialen Lymphknotenmetastasen in den „Microarray“-Analysen als me-

tastasierte Tumoren betrachtet, da sich die lymphogene Metastasierung mechanistisch nur wenig von der hämatogenen unterscheidet [Stacker *et al.*, 2002]. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass das Vorhandensein regionaler Lymphknotenmetastasen im kzNZK mit einem deutlich erhöhten Risiko einhergeht, distante Metastasen zu entwickeln [Siebels & Stief, 2007].

Neben spät und früh metastasierten kzNZK wurden auch Tumoren in die Analysen einbezogen, die im Krankheitsverlauf nachweislich keine manifesten Metastasen entwickelten. In der Klinik ist es natürlich wichtig, auch solche Patienten zu identifizieren, die keiner Therapie oder engmaschigen Überwachung bedürfen. Somit sollte die Expressionshöhe der identifizierten DFS-assoziierten Gene im Idealfall auch diese nicht metastasierten Tumoren von kzNZK abgrenzen, die manifeste Metastasen bedingen.

Kontinuierliche Deregulation der Expression

Die 356 zwischen nicht, spät und früh metastasierten primären kzNZK differenziell exprimierten Gene ordneten die kzNZK im hierarchischen Clustern nahezu vollständig entsprechend dieser drei Gruppen an. Lediglich die Proben NZK23 und NZK5 wurden jeweils der Gruppe mit der besseren Prognose zugeordnet. Vermutlich sind diese beiden Patienten biologische Ausreißer, die trotz ihrer Metastasierung lange überlebten. Zumindest bei der Patientin mit NZK23, die trotz initialer Hautmetastasen 123 Monate nach Nephrektomie noch am Leben war, ist dies der Fall. Diese initialen Hautmetastasen wurden zwar reseziert. Die Patientin erlitt allerdings mehrere weitere Rezidive (zuletzte 69 Monate nach Nephrektomie), die nicht mehr vollständig reseziert wurden. Somit überlebte diese Patientin unerwartet lange im Vergleich zu der medianen Überlebenszeit von 12 Monaten für Patienten mit metastasiertem und nicht therapierten kzNZK [Motzer *et al.*, 2007]. Für die Patientin mit NZK5 waren leider keine Nachbeobachtungsdaten vorhanden.

Die Baumstruktur des hierarchischen Clusters ergab zwei Cluster, die nicht und früh metastasierte kzNZK differenzierten. Die spät metastasierten Tumoren zeigten ein intermediäres Expressionsmuster. Dies deutet auf eine kontinuierliche Deregulation der Expression der identifizierten Gene in diesen drei Gruppen hin. Tatsächlich war die Expression für 90 % der 356 differenziell exprimierten Gene kontinuierlich dereguliert von nicht *via* spät zu früh metastasierten kzNZK oder ähnlich hoch in nicht und spät metastasierten Tumoren. Erstaunlicherweise wies auch die Expression des überwiegenden Teils der in nicht metastasierten *vs.* metastasierten kzNZK differenziell exprimierten Gene eine solche kontinuierliche Deregulation auf.

Insgesamt deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass biologisch nicht metastasierte kzNZK möglicherweise nicht existieren. Auch in Patienten ohne klinisch detektierbare Metastasen könnten demnach Tumorzellen vom Primärtumor gestreut worden sein, die sich im Sekundärorgan angesiedelt haben. Die Expressionshöhe der kontinuierlich deregulierten Gene könnte die Dauer der Tumorzelllatenz dieser Zellen bestimmen. Bei Patienten, die im Krankheitsverlauf keine manifesten Metastasen entwickeln, wird das Ende dieser Latenzphase und somit das DFS während der Lebensdauer des Patienten möglicherweise einfach nicht erreicht. Interessant ist in diesem Zusammenhang natürlich die Frage, ob mit einer steigenden Lebenserwartung häufiger das DFS erreicht würde und somit Makrometastasen gebildet würden. Dies unterstützt die Notwendigkeit molekularer Faktoren zur DFS-Abschätzung.

Allerdings ist zu bedenken, dass die Auswahl der nicht metastasierten kzNZK anhand klinischer Befunde erfolgte. Der hierfür gewählte minimale Nachbeobachtungszeitraum von 99 Monaten ist im Vergleich zu dem in anderen Arbeiten verwendeten (z. B. 28 – 40 Monate in Jones *et al.* [2005]) sehr lang und charakterisiert die nicht metastasierten Tumoren somit sehr gut. Möglicherweise sind die für die „Microarray"-Analysen ausgewählten klinisch nicht metastasierten kzNZK trotzdem rein zufällig solche, die biologisch metastasiert sind, also latente Tumorzellen im Sekundärorgan gebildet haben. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, denn auch in den Validierungsstudien an größeren Patientenkollektiven wurde für viele Gene eine kontinuierliche Deregulation der Expression oder eine ähnliche Expressionshöhe in nicht und spät metastasierten kzNZK beobachtet. Auch in früh metastasierten Tumoren könnten sich die Tumorzellen lange vor ihrem Wachstum zu Makrometastasen im Sekundärorgan angesiedelt und somit eine Latenzphase durchlaufen haben. Auch dies ist allerdings mit den zur Verfügung stehenden klinischen Methoden nicht nachweisbar. Letztendlich ist aber in beiden Fällen die klinische Situation die relevante und vorherzusagende. Latente Tumorzellen oder Mikrometastasen haben keinen Einfluss auf das Überleben des Patienten, solange sie nicht ihr Wachstum zur Makrometastase induzieren.

Verschiedene experimentelle und klinische Studien liefern Beweise für die Theorie, dass biologisch nicht metastasierte Tumoren nicht existieren. So bedingen beispielsweise verschiedene Tumorzelllinien, von denen angenommen wurde, sie würden keine Tumoren in Mäusen induzieren, latente Tumorzellen bzw. Mikrotumoren in immunkompromittierten Mäusen [Naumov *et al.*, 2006]. Die Osteosarkomzelllinien SAOS-2 und MG-63 bilden beispielsweise erst ein Jahr nach Tumorzellinjektion makroskopische Tumoren. Diese lange Latenzphase überschreitet häufig die Lebenszeit des Tieres.

Dass Tumorzellen ein Leben lang in einem latenten Zustand verbleiben können, zeigten auch Autopsiestudien, deren Ergebnisse von Black & Welch [1993] zusammengefasst wurden. Besonders interessant, oder erschreckend, ist der Befund, dass 98 % der Menschen im Alter von 50 bis 70 Jahren Tumorzellen in ihrer Schilddrüse aufwiesen. Allerdings werden nur bei etwa 0,1 % dieser Altersgruppe makroskopische Schilddrüsentumoren diagnostiziert. Anzumerken ist jedoch, dass die Detektion dieser latenten Tumoren zum Teil nur indirekt erfolgte. Die Arbeitsgruppe fertigte im Abstand von 2 – 3 mm Dünnschnitte der Schilddrüsen von 101 Patienten an. Die Zahl der in 36 Patienten detektierten Mikrometastasen (Durchmesser 0,15 – 14,0 mm) wurde dann auf die Gesamtzahl im nicht untersuchten Gewebe extrapoliert, da insbesondere kleine Tumorherde im Bereich zwischen den begutachteten Dünnschnitten liegen könnten.

Überrepräsentierte biologische Prozesse

Unter den in nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierten Primärtumoren differenziell exprimierten Genen war wie auch im Vergleich der Metastasensubgruppen die Angiogenese/Vaskularisierung des Tumors statistisch signifikant überrepräsentiert.

Auch hier waren die betroffenen Gene überwiegend positive Regulatoren dieses Prozesses (GoPubmed, Stand 09.04.2010) [Doms & Schroeder, 2005] und nahezu ausschließlich kontinuierlich herunterreguliert von nicht *via* spät zu früh metastasierten kzNZK. Das bedeutet, dass die Angiogenese/Vaskularisierung in dieser Gruppenabfolge zunehmend deaktiviert war. Auch diese Beobachtung passt zu dem bereits bekannten Fakt, dass kzNZK mit einer

besseren Prognose stärker vaskularisiert sind [Sandlund *et al.*, 2007a]. Der Prozess der Angiogenese/Vaskularisierung in primären kzNZK scheint sich allerdings von dem in Metastasen zu unterscheiden, da die beteiligten, differenziell exprimierten Gene sich in beiden Gruppen weitestgehend unterschieden. Somit erscheinen diese Faktoren für prognostische Zwecke ungeeignet. Auch die Gene der antiangiogen wirkenden Proteine CD36, COL4A1 und THBS1, die in den Metastasenanalysen identifiziert wurden, waren zwischen den einzelnen Primärtumorgruppen nicht differenziell exprimiert. Sie stellen somit keine bereits im Primärtumor programmierten Signaturen dar.

Auch die betroffenen Gene der überrepräsentierten Zellmigration und -proliferation kodierten überwiegend positive Regulatoren dieser Prozesse (GoPubmed, Stand 09.04.2010) [Doms & Schroeder, 2005] und waren kontinuierlich herunterreguliert in nicht *via* spät zu früh metastasierten primären kzNZK. Die Aktivierung dieser Prozesse in nicht metastasierten im Vergleich zu spät und früh metastasierten Tumoren ist wahrscheinlich auch hier wieder ein Bestandteil der Angiogenese und spiegelt die Migrations- und Proliferationsfähigkeit der Endothelzellen wider.

5.1.4 Vergleich der Ergebnisse der „Microarray"-Studien an Primärtumoren und Metastasen

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob die potenziell funktionell an der Tumorzelllatenz beteiligten Gene, die in den Metastasen identifiziert wurden, auch prognostisch nutzbar sind. Hierfür wurden die an Metastasen und Primärtumoren erhaltenen Daten verglichen.

Einen ersten Hinweis auf sehr ähnliche DFS-assoziierte Expressionsmuster in Metastasen und Primärtumoren geben hierarchische Clusteranalysen. Die in den Metastasen bzw. in den Primärtumoren identifizierten Gene klassifizieren den jeweils anderen Gewebetypus weitestgehend in die unterschiedlichen DFS-Gruppen (Abb. 5.3). Die Metastasen waren eindeutig in späte und frühe unterscheidbar. Die Primärtumoren wurden zumindest annähernd in Cluster von nicht, spät und früh metastasierten Tumoren unterteilt. Der Vergleich der in den Metastasen- und Primärtumorsubgruppen differenziell exprimierten Gene lieferte 36 Gene, die in beiden Vergleichen identifiziert wurden. Eine nähere Betrachtung ausgewählter Gene zeigte einen größeren Expressionsunterschied in den Metastasen- im Vergleich zu den Primärtumorsubgruppen. Diese Beobachtungen sprechen zum einen dafür, dass in kzNZK tumorintrinsische DFS-assoziierte Gensignaturen existieren. Zum anderen zeigen sie, dass die entsprechenden Expressionsunterschiede zwar bereits im Primärtumor vorherbestimmt, in den Metastasen aber deutlich stärker ausgeprägt sind. Somit könnten diese Gene Metastasierungsvirulenzgene darstellen [Nguyen *et al.*, 2009]. Während des Metastasierungsprozesses werden Zellpopulationen, die DFS-relevante Expressionssignaturen aufweisen, selektiert, da diese eine funktionelle Rolle in der Tumorzelllatenz oder dem Metastasenwachstum spielen. Im Primärtumor weisen nur einige Zellen diese Expressionsmuster auf, da sie dort keine oder nur eine untergeordnete funktionelle Relevanz besitzen.

Auch in diesem Zusammenhang erscheint der in der vorliegenden Arbeit gewählte Ansatz interessant, geeignete DFS-assoziierte Kandidatengene in Metastasen zu identifizieren und dann im Primärtumor zu validieren. Allein auf der Basis von Primärtumoranalysen würde

man wichtige Kandidatengene möglicherweise „übersehen“, da ihr Expressionsunterschied zwischen den verglichenen Gruppen zu gering ist.

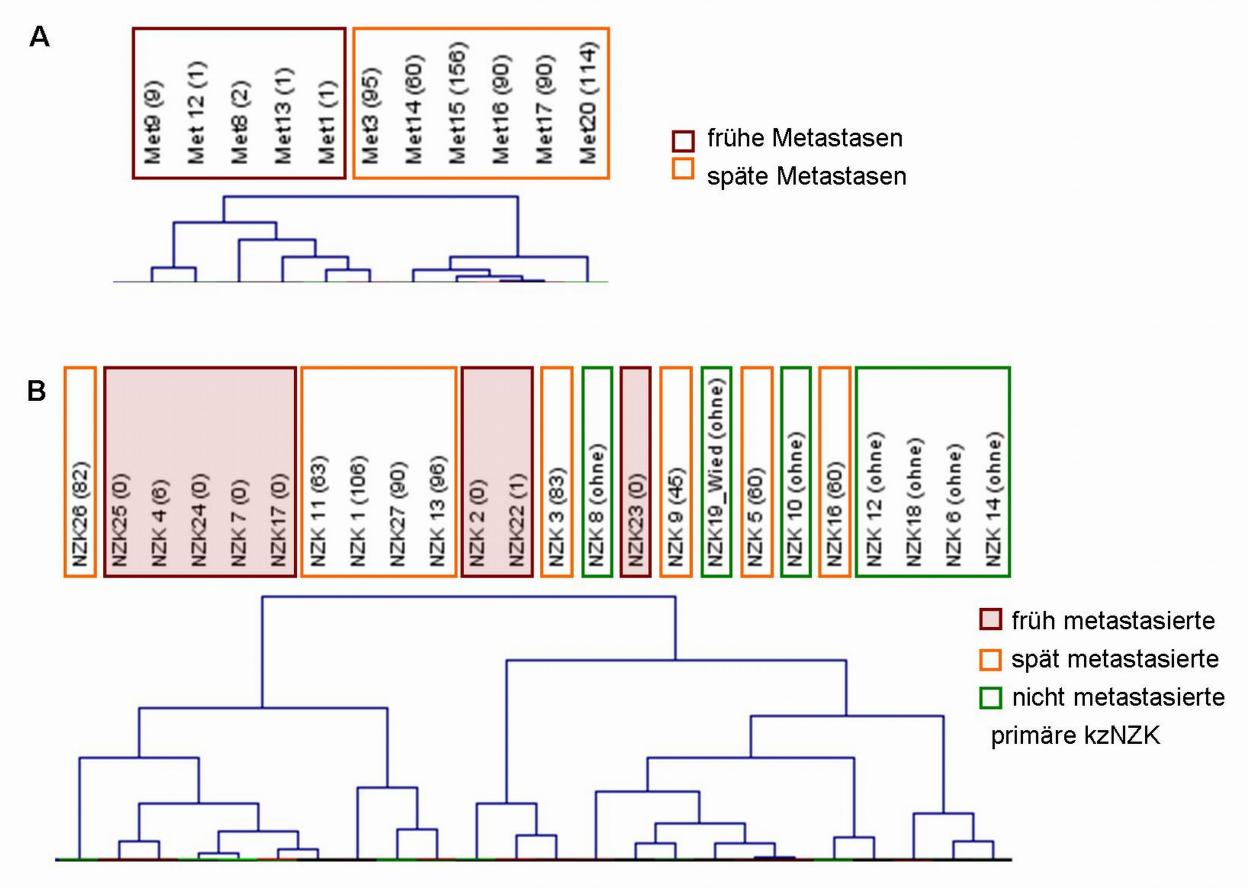


Abb. 5.3: Clustern der (A) pulmonalen Metastasen anhand der in spät *vs.* früh metastasierten primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen differenziell exprimierten Gene und (B) *vice versa*. Die Metastasen wurden anhand der 166 in spät *vs.* früh metastasierten Primärtumoren differenziell exprimierten Gene (214 Sondensets) geclustert, die Primärtumoren anhand der 306 in spät *vs.* früh entwickelten Metastasen differenziell exprimierten Gene (414 Sondensets). (kzNZK = klarzellige Nierenzellkarzinome)

Weiterhin sollten aus den in Metastasen und Primärtumoren differenziell exprimierten, DFS-assoziierten Genen geeignete Kandidaten für die Validierungsanalysen ausgewählt werden. Hierzu wurden die Gene herausgesucht, die auch in anderen „Microarray“-Studien an primären kzNZK als prognoserelevant identifiziert wurden. Solche Gene sind trotz unabhängiger Patientenkollektive, abweichender Probenbearbeitungsprozeduren, anderer „Array“-Plattformen und einer differierenden statistischen Auswertung in den verglichenen Gruppen differenziell exprimiert und weisen somit eine sehr robuste Expressionsänderungen auf.

Drei publizierte „Microarray“-Studien an primären kzNZK kamen für einen solchen Vergleich in Frage. Lane *et al.* [2009] identifizierten 44 zwischen indolenten (M0 pT1) und aggressiven kzNZK (M1) differenziell exprimierte Gene. Diese klassifizierten 16 von 29 weiteren kzNZK in die Gruppe der indolenten kzNZK, wobei diese Patienten ein signifikant längeres DFS aufwiesen als die den aggressiven kzNZK zugeordneten. Kosari *et al.* [2005] verglichen aggressive primäre kzNZK (n = 9) und kzNZK-Metastasen (n = 9) mit nicht aggressiven primären kzNZK (n = 10) und identifizierten 34 differenziell exprimierte Gene.

Aggressive kzNZK bedingten innerhalb von vier Jahren nach Nephrektomie Metastasen oder den Tod des Patienten und unterschieden sich in ihrem Expressionsmuster nicht wesentlich von den ebenfalls einbezogenen Metastasen. Takahashi *et al.* [2001] verglichen Patienten mit kzNZK, die innerhalb von fünf Jahren nach Nephrektomie an ihrem Tumor verstarben und solchen, die dies nicht taten (n = 12 *vs.* 17 Proben) und identifizierten dabei 29 differenziell exprimierte Gene. In dieser Studie wurde als Endpunkt nicht das DFS, sondern der kzNZK-bedingte Tod (TSS) betrachtet. Da der Patient nur dann am Tumor versterben kann, wenn er vorher ein Rezidiv erlitt, spiegelt das TSS indirekt das DFS wider. Insgesamt ergaben sich aus diesen drei Studien 105 verschiedene annotierte Gene, die für einen Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zur Verfügung standen. Von den 36 in späten *vs.* frühen Metastasen sowie in spät *vs.* früh metastasierten Primärtumoren differenziell exprimierten Genen wurden elf auch in diesen anderen Studien identifiziert. Unter diesen elf Genen waren beispielsweise *PECAM1* und *TSPAN7*, die auch im 6-Genmodell zur Klassifizierung später und früher Metastasen enthalten waren und somit besonders interessant für weitere Analysen sind.

Insgesamt wurden 13 Gene für die folgenden Validierungsanalysen mittels qPCR ausgewählt. Jedes dieser Gene erfüllte mindestens zwei der folgenden Kriterien: *(1)* differenzielle Expression in späten *vs.* frühen Metastasen, *(2)* differenzielle Expression in spät *vs.* früh metastasierten primären kzNZK und *(3)* in unabhängigen „Microarray"-Studien als prognoserelevant identifiziert. Außerdem besaßen diese Gene eine Rolle in der Tumorprogression oder eine molekulare Funktion, die eine solche Rolle nahelegte (Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Ausgewählte Gene zur Validierung des Vergleichs spät *vs.* früh metastasierte primäre klarzellige Nierenzellkarzinome. Gezeigt sind jeweils das Symbol und die chromosomale Lokalisation des Gens sowie die Gruppenvergleiche, in denen das Gen differenziell exprimiert war. Die letzte Spalte beschreibt, soweit bekannt, die molekulare Funktion des jeweiligen Proteins, seine mögliche Rolle in der Progression des kzNZK bzw. anderer Tumoren, wenn keine Daten zum kzNZK verfügbar sind, sowie seine prognostische Relevanz. Die Literaturrecherche erfolgte anhand einer „Abstract"-Suche mit der Internet-Plattform GoPubmed (Stand 09.04.2010) [Doms & Schroeder, 2005]. (Ca = Karzinom; chr. = chromosomale; DFS = rezidivfreies Überleben, kzNZK = klarzellige NZK; met. = metastasiert; Mets = Metastasen; NZK = Nierenzellkarzinome; OS = Gesamtüberleben, Tf = nichtmalignes Gewebe des gleichen Organs; TSS = tumorspezifisches Überleben; ↓ = herunterreguliert; ↑ = heraufreguliert; [1] mittels „TaqMan Low Density Arrays" gemessene Expressionswerte waren nicht auswertbar)

Gensymbol (chr. Lokalisation)	**„Microarray"** signifikant überexprimiert in	**molekulare Funktion/ Rolle in Tumorprogression**
BIRC5 (17q25) [1]	früh *vs.* spät met. kzNZK (eigene/andere Studien)	Apoptoseinhibitor & beteiligt an Zellzykluskontrolle; fördert Proliferation und inhibiert Apoptose humaner 786-O-kzNZK-Zellen; Expression/Proteinmenge ↑ in den meisten Tumoren (z. B. Mamma- & Kolon-Ca) im Vergleich zu Tf ; hohe Proteinmenge assoziiert mit kürzerem DFS/TSS (kzNZK)
DARC (1q21–q22)	späte *vs.* frühe Mets; spät *vs.* früh met. kzNZK	auf Endothelzellen lokalisierter Chemokinrezeptor; bindet CD82 auf Mamma- & ProstataCa-Zellen → Metastasierungsinhibition

... Fortsetzung der Tabelle auf folgender Seite

Gensymbol (chr. Lokalisation)	**„Microarray“** signifikant überexprimiert in	**molekulare Funktion/ Rolle in Tumorprogression**
DKK3 (11p15)	späte *vs.* frühe Mets; spät *vs.* früh met. kzNZK	Gegenspieler des Wnt-Protoonkogen/β-Catenin-Signalwegs; Reexpression in murinen RENCA-NZK-Zellen induziert Apoptose; beteiligt an Vaskularisierung; Promotorhypermethylierung im NZK; Expression/Proteinmenge ↓ in kzNZK im Vergleich zu Tf; Methylierung assoziiert mit kürzerem DFS/OS in MammaCa
EDNRB (13q22)	späte *vs.* frühe Mets; spät *vs.* früh met. kzNZK (eigene/andere Studien)	G-Protein-gekoppelter Rezeptor; Regulation von Zellproliferation, -apoptose & evtl. Angiogenese; Promotorhypermethylierung im NZK; Expression/Proteinmenge ↓ in ÖsophagusCa im Vergleich zu Tf; hohe Expression assoziiert mit längerem OS (kzNZK)
EMCN (4q24)	späte *vs.* frühe Mets; spät *vs.* früh met. kzNZK (eigene/andere Studien)	antiadhäsive Wirkung; spielt evtl. Rolle bei Loslösung hämatopoetischer Stammzellen vom Endothel während früher Hämatopoese; evtl. involviert in strahlungsinduzierter Genese von Osteosarkomen
IL13RA2 (Xq13.1–q28) [1]	früh *vs.* spät met. kzNZK (eigene/andere Studien)	Zytokinrezeptor; beteiligt an Immunantwort; vermindert antiproliferativen Effekt der IL13-IL13RA1-Wechselwirkung in NZK-Zellen; Proteinmenge ↑ in OvarialCa im Vergleich zu Tf
LDB2 (4p16)	späte *vs.* frühe Mets; spät *vs.* früh met. kzNZK (eigene/andere Studien)	spielt evtl. Rolle in Zellmigration; hohe Proteinmenge assoziiert mit geringem Differenzierungsgrad (MammaCa)
PARM1 (4q13.3–q21.3)	späte *vs.* frühe Mets; spät *vs.* früh met. kzNZK (eigene/andere Studien)	stark glykosyliertes Membranprotein; begünstigt Koloniebildung humaner PC3-ProstataCa-Zellen
PECAM1 (*CD31*; 17q23)	späte *vs.* frühe Mets; spät *vs.* früh met. kzNZK (eigene/andere Studien)	Mikrogefäßdichtemarker; vermittelt Endothelzellkontakte; hohe Mikrogefäßdichte assoziiert mit längerem OS (kzNZK)
RGS5 (1q23.1)	späte *vs.* frühe Mets; spät *vs.* früh met. kzNZK (eigene/andere Studien)	G-Protein-gekoppelter Rezeptor; spielt Rolle in Bildung abnormer Gefäßmorphologien während Karzinogenese; detektierbar in tumorassoziierten Gefäßen im NZK; hohe Expression assoziiert mit längerem OS (kzNZK)

... Fortsetzung der Tabelle auf folgender Seite

Gensymbol (chr. Lokalisation)	**„Microarray“** signifikant überexprimiert in	**molekulare Funktion/ Rolle in Tumorprogression**
SYNPO2 (14q26)	späte *vs.* frühe Mets; spät *vs.* früh met. kzNZK (eigene/andere Studien)	Tumorsuppressorgen; reduziert Invasivität und Motilität humaner PC3-ProstataCa-Zellen; Promotorhypermethylierung & verringerte Proteinmenge in Blasen- & ProstataCa im Vergleich zu Tf → assoziiert mit verkürztem DFS/OS
TIMP3 (22q12.3)	späte *vs.* frühe Mets; spät *vs.* früh met. kzNZK (eigene/andere Studien)	Matrixmetalloproteinase-Inhibitor; reduziert Metastasierungspotenzial humaner MammaCa-Zellen; Heterozygotieverlust, Promotorhypermethylierung & verringerte Expression/Proteinmenge in kzNZK im Vergleich zu Tf; hohe Expression assoziiert mit längerem DFS/OS (Magen- & MammaCa)
TSPAN7 (Xp11.4)	späte *vs.* frühe Mets; spät *vs.* früh met. kzNZK (eigene/andere Studien)	Tetraspanine sind an Signaltransduktion beteiligt und bilden Komplexe mit Integrinen; TSPAN7 involviert in Axon- und Dendritenentwicklung; anderer Vertreter (CD82) = Metastasierungssuppressor in Mamma- & ProstataCa

5.1.5 Nicht metastasierte *vs.* metastasierte Primärtumoren

In einem weiteren Schritt wurden Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren identifiziert, die im Verlauf keine manifesten Metastasen bedingten und solchen, die manifeste Metastasen induzierten. Die 128 differenziell exprimierten Gene können somit potenziell zur Identifikation solcher Patienten genutzt werden, die keiner engmaschigen Überwachung und Therapie bedürfen. Die meisten dieser Gene waren erwartungsgemäß bereits in dem Dreigruppenvergleich nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierte Tumoren als differenziell exprimiert identifiziert worden.

Wie bereits in den vorherigen Gruppenvergleichen waren die Vaskularisierung/Angiogenese und die Regulation der Zellmigration unter den differenziell exprimierten Genen überrepräsentiert und aktiviert in nicht metastasierten Tumoren (GoPubmed, Stand 09.04.2010) [Doms & Schroeder, 2005]. Auch hier spiegeln beide Prozesse wahrscheinlich das NZK-spezifische Phänomen einer hohen Vaskularisierung in Tumoren mit guter Prognose wider.

Auswahl geeigneter Kandidaten für die Validierungsstudien

Es existieren lediglich zwei „Microarray“-Studien an kzNZK sowie einige Studien an anderen Tumorentitäten, die einen ähnlichen Gruppenvergleich zwischen nicht metastasierten und metastasierten Tumoren vornahmen wie den in der vorliegenden Arbeit. Sültmann *et al.* [2005] identifizierten 85 Gene, die zwischen M0- und M1-NZK differenziell exprimiert waren (n = 17 *vs.* 19 Tumoren). Keines dieser Gene war im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwischen nicht metastasierten und metastasierten primären kzNZK differenziell exprimiert. Dies könnte darin begründet liegen, dass in der vorliegenden Arbeit nicht nur M1-Tumoren, sondern auch M0-Tumoren mit metachronen und insbesondere sehr späten

Metastasen (DFS $\leq$ 106 Monate) in die Gruppe der metastasierten Tumoren einbezogen wurden, die Sültmann *et al.* [2005] den nicht metastasierten Tumoren (M0) zuordneten. Zudem wurden in beiden Studien unterschiedliche „Array"-Plattformen verwendet; Sültmann *et al.* [2005] nutzten eine auf einer konkurrierenden Hybridisierung beruhende „Microarray"-Plattform (Zwei-Farben-„Array"). Yao *et al.* [2008] identifizierten 492 differenziell exprimierte Gene zwischen elf nicht metastasierten primären kzNZK (Nachbeobachtungszeit $\geq$ 81 Monate) und 16 metastatischen kzNZK, die sowohl syn- und metachron metastasierte primäre kzNZK als auch distante Metastasen umfassten. Dreiunddreißig dieser Gene waren bereits zuvor in anderen „Microarray"-Studien an kzNZK als prognoseassoziiert identifiziert worden. Von diesen 33 Genen wurden sieben auch in der vorliegenden Arbeit als differenziell exprimiert in nicht metastasierten *vs.* metastasierten Tumoren identifiziert (*GPR116*, *RGS5*, *SNRK*, *SPRY1*, *TGFBR2*, *TIMP3*, *TMEM47*). *RGS5* und *TIMP3* waren auch zwischen spät und früh metastasierten primären kzNZK differenziell exprimiert und wurden bereits dort als Kandidaten für die Validierungsanalysen ausgewählt. Weiterhin waren zwei (*NMU*, *IGFBP5*) der 70 in der MammaPrint-Signatur [van't Veer *et al.*, 2002] enthaltenen Gene auch in nicht metastasierten *vs.* metastasierten primären kzNZK der vorliegenden Arbeit differenziell exprimiert. Diese MammaPrint-Signatur kann Brustkrebspatientinnen mit hohem von solchen mit niedrigem Rezidivrisiko unterscheiden. Da die beiden überlappenden Gene auch in den Top-50-Genen zur Unterscheidung nicht metastasierter und metastasierter kzNZK enthalten waren, wurden sie ebenfalls in die weiteren Untersuchungen einbezogen.

Darüber hinaus wurden weitere für eine Validierung viel versprechende Gene anhand eines Vorhersagemodells, das nicht metastasierte von metastasierten kzNZK unterscheiden konnte, ausgewählt. In den fünf Genen dieses Modells war ebenfalls *IGFBP5* enthalten, was dessen Eignung für weiterführende Analysen unterstreicht. Alle fünf Gene spielen darüber hinaus eine gesicherte oder potenzielle Rolle in der Tumorprogression (Tab. 5.2). Das Vorhersagemodell konnte darüber hinaus nicht metastasierte von spät metastasierten primären kzNZK differenzieren. Patienten mit späten Metastasen entwickeln meist nur eine geringe Zahl an Metastasen, die relativ problemlos operativ entfernt werden können. Nach erfolgreicher Behandlung haben diese Patienten eine ähnlich gute Prognose wie Patienten mit nicht metastasierten Tumoren [De Jesus *et al.*, 2003; Froehner *et al.*, 1998]. Die identifizierten Gene können somit potenziell zu einer geeigneten Überwachung und einer zeitnahen Therapie von Patienten beitragen, die erst spät im Krankheitsverlauf Metastasen entwickeln. Daneben wurden zwei weitere funktionell interessante Gene in die Validierungsstudien einbezogen (*CA4*; *UCHL1*; Tab. 5.2).

Tab. 5.2: Ausgewählte Gene zur Validierung des Vergleichs nicht metastasierte *vs.* metastasierte primäre klarzellige Nierenzellkarzinome. Gezeigt sind jeweils das Symbol und die chromosomale Lokalisation des Gens sowie die Gruppenvergleiche, in denen das Gen differenziell exprimiert war. (Spät) metastasiert bedeutet dabei sowohl „metastasiert“ als auch „spät metastasiert“. Die Anmerkung „Vorhersagemodell“ bedeutet, dass dieses Gen in dem 5-Genmodell zur Unterscheidung nicht metastasierter und metastasierter Tumoren enthalten war. Die letzte Spalte beschreibt, soweit bekannt, die molekulare Funktion des jeweiligen Proteins, seine mögliche Rolle in der Progression des NZK bzw. anderer Tumoren, wenn keine Daten zum NZK verfügbar sind, sowie seine prognostische Relevanz. Die Literaturrecherche erfolgte anhand einer „Abstract“-Suche mit der Internet-Plattform GoPubmed (Stand 09.04.2010) [Doms & Schroeder, 2005]. (Ca = Karzinom, chr. = chromosomale; DFS = rezidivfreies Überleben; kzNZK = klarzellige NZK; met. = metastasiert; NZK = Nierenzellkarzinom; Tf = nichtmalignes Gewebe des gleichen Organs; TSS = tumorspezifisches Überleben; ↓ = herunterreguliert; ↑ = heraufreguliert; [1] mittels „TaqMan Low Density Arrays“ gemessene Expressionswerte waren nicht auswertbar)

Gensymbol (chr. Lokalisation)	**„Microarray“** signifikant überexprimiert in	**molekulare Funktion/ Rolle in Tumorprogression**
CA4 (17q23)	nicht met. *vs.* (spät) met. kzNZK	katalysiert reversible CO_2-Hydratation und reguliert z. B. Säure-Base-Haushalt; Expression ↓ in NZK im Vergleich zu Tf; erhöhte Expression assoziiert mit längerem OS (NZK)
CAPN6 (Xq23)	met. *vs.* nicht met. kzNZK (Vorhersagemodell)	calciumabhängige Protease; evtl. Rolle in Mikrotubulistabilisierung und Zytoskelett-Reorganisation; Proteinmenge ↑ in Uterus- & ZervixCa im Vergleich zu Tf
CENPV (17p11.2)	nicht met. *vs.* (spät) met. kzNZK (Vorhersagemodell)	spielt Rolle in Mitose (Zentromerorganisation, Chromosomenanordnung, Zytokinese); anderes Familienmitglied (CENP-H): Expression/Proteinmenge ↑ in Lungen- & ÖsophagusCa im Vergleich zu Tf; verringerte CENP-H-Expression assoziiert mit längerem OS (Lungen-, ÖsophagusCa)
FABP7 (6q22–q23)	nicht met. *vs.* met. kzNZK (Vorhersagemodell)	beteiligt an Fettsäureaufnahme, -transport, -metabolismus; Proteinmenge ↑ in NZK im Vergleich zu Tf; Heterozygotieverlust assoziiert mit Metastasierung (Melanome)
IGFBP5 (2q33–q36)	nicht met. *vs.* (spät) met. kzNZK (Vorhersagemodell)	duale Rolle (Aktivierung/Inhibierung) in Zellproliferation und -migration; inhibiert Angiogenese; Expression ↓ in NZK im Vergleich zu Tf; verringerte Expression assoziiert mit längerem TSS (MammaCa)
NMU (4q12) [1]	met. *vs.* nicht met. kzNZK	Neuropeptid; beteiligt an Regulation des zellulären Energiehaushalts; aktiviert Wachstum und erhöht Metastasierungspotenzial humaner T24-BlasenCa-Zellen in Mäusen; Expression ↑ in PankreasCa im Vergleich zu Tf

... Fortsetzung der Tabelle auf der folgenen Seite

Gensymbol (chr. Lokalisation)	**„Microarray“** signifikant überexprimiert in	**molekulare Funktion/ Rolle in Tumorprogression**
SAA1/2 (11p15.1–p14)	met. *vs.* nicht met. kzNZK (Vorhersagemodell)	Akutphaseprotein (unspezifische Immunreaktion); Expression ↑ in Endometriumtumoren im Vergleich zu Tf; Serumlevel erhöht in NZK-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit metastasiertem im Vergleich zu Patienten mit lokalem NZK; geringes Serumlevel assoziiert mit längerem TSS (NZK)
UCHL1 (4p14)	nicht met. *vs.* met. kzNZK	potenzielles Tumorsuppressorgen; stabilisiert TP53; reguliert zelluläres Ubiquitinlevel; induziert Apoptose und inhibiert Proliferation und Koloniebildung humaner ACHN- & SN12C-NZK-Zellen; Promotorhypermethylierung & Expression/Proteinmenge ↓ in NZK im Vergleich zu Tf; Methylierung assoziiert mit verkürztem OS und erhöhtem Metastasierungsrisiko (NZK)

5.1.6 Ähnlichkeit pulmonaler Metastasen und primärer metastasierter Nierenzellkarzinome

In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst auf einen direkten Vergleich von Primärtumoren und Metastasen verzichtet, da diese Analyse wahrscheinlich durch zu viele nicht-biologische Variationen beeinflusst worden wäre. Zum einen wurden die Gewebeproben in unterschiedlichen Zentren mit unterschiedlichen Operationstechniken gewonnen, zum anderen wurden die Metastasen etwa ein Jahr früher bearbeitet und analysiert als die Primärtumoren, was die Ergebnisse erheblich beeinflussen kann [Sebastiani & Ramoni, 2002]. In einem indirekten Vergleich wurden die Metastasen sowohl anhand des 5-Genmodells zur Unterscheidung nicht metastasierter und metastasierter primärer kzNZK als auch basierend auf einem Modell, das anhand aller 128 zwischen diesen beiden Gruppen differenziell exprimierten Gene erstellt wurde, klassifiziert. Dass hierbei jeweils 22 der 24 Metastasen den metastasierten Tumoren zugeordnet wurden, legt nahe, dass die Metastasen in ihren Expressionsmustern den metastasierten Primärtumoren ähnelten.

Bisher publizierte Studien an NZK und anderen Tumoren bewiesen ebenfalls eine Ähnlichkeit von Metastasen und metastasierten Primärtumoren. In diesen Studien wurden zunächst Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Metastasen identifiziert und diese anschließend genutzt, um weitere Primärtumoren in solche mit günstiger und ungünstiger Prognose zu klassifizieren. Für NZK beschrieben Jones *et al.* [2005] eine 155-Gensignatur, die distante Metastasen von T1M0-Primärtumoren, die mindestens 28 Monate nach Nephrektomie keine Metastasen entwickelt hatten, unterschied. Diese Signatur konnte unabhängige primäre NZK in M1- und M0-Tumoren klassifizieren. Ramaswamy *et al.* [2003] identifizierten beim Vergleich von 64 primären Adenokarzinomen verschiedener Lokalisationen

(Brust, Kolon, Lunge, Ovarien, Prostata, Uterus) und 12 nicht-autologen distanten Adenokarzinommetastasen 128 differenziell exprimierte Gene. Diese Gensignatur bzw. eine aus dieser hervorgegangene 17-Gensignatur differenzierte 221 solide Primärtumoren (Lungen-, Mamma-, Prostatakarzinome, Medulloblastome), die im Krankheitsverlauf metastasierten oder ein kürzeres Gesamtüberleben besaßen, von solchen mit guter Prognose. Diese Ähnlichkeit von Metastasen und aggressiven bzw. prognostisch ungünstigen Primärtumoren untermauert die Theorie, dass Metastasen bedingende Faktoren bereits im Primärtumor deregulliert sind. Sie unterstützt somit das in der vorliegenden Arbeit gewählte Vorgehen der Analyse von Metastasen und Primärtumoren.

Allerdings wurden im Knochenmark von Brusttumorpatientinnen mit geringem Tumorstadium latente Tumorzellen identifiziert, die sich genetisch von denen des Primärtumors unterschieden [Übersicht in Pantel & Woelfle, 2005]. Solche frühzeitig disseminierten Tumorzellen besitzen auch beim NZK prognostische Relevanz [Bluemke *et al.*, 2009; Buchner *et al.*, 2006]. Stoecklein & Klein [2010] fassten in einem Übersichtsartikel die chromosomalen Aberrationen in Primärtumoren verschiedener Entitäten und ihren Metastasen zusammen. Sie schlossen daraus, dass auch früh abgesiedelte Zellen Makrometastasen induzieren können, da sich diese Metastasen genetisch von ihrem Primärtumor unterscheiden. Diese Beobachtungen scheinen den Ergebnissen der Expressionsanalysen zunächst zu widersprechen. Allerdings zeigten die Expressionsanalysen lediglich, dass die Expressionsmuster von Metastasen ähnlicher zu denen von metastasierten als zu denen von nicht metastasierten Primärtumoren sind. Es wurden aber durchaus auch signifikante Expressionsunterschiede zwischen Metastasen und Primärtumoren des kzNZK beschrieben [Buchner *et al.*, 2009]. Wahrscheinlich wird zumindest ein Teil der genetischen Programme, die für eine Metastasierung wichtig sind, bereits frühzeitig in der Tumorentstehung erworben, so dass Primärtumoren prognostisches Potenzial besitzen.

Die bisher bestehenden Modelle einer linearen Progression, in dem zunächst der Primärtumor lokal genetische Aberrationen anhäuft und dann Tumorzellen absiedelt bzw. einer parallelen Progression, bei der Tumorzellen früh disseminieren und sich dann unabhängig vom Primärtumor weiterentwickeln [Stoecklein & Klein, 2010] sind somit möglicherweise nicht so klar zu trennen. Eventuell existieren beide Varianten parallel oder es tritt eine Mischform beider Modelle auf.

5.2 Validierung der „Microarray“-Ergebnisse

Um eine in „Microarray“-Analysen identifizierte Signatur oder einzelne Kandidatengene prognostisch nutzen zu können, muss ihre differenzielle Expression zunächst mit einer unabhängigen Methode (hier: qPCR) bestätigt werden. Anschließend muss ihre prognostische Relevanz an einem unabhängigen und großen Patientenkollektiv belegt werden. Grund hierfür ist, dass in den „Microarray“-Analysen mehrere hundert oder tausend Gene simultan untersucht werden, für die die erhaltenen Ergebnisse im Einzelfall auch falsch positiv sein können.

5.2.1 „Screening“ mittels „TaqMan Low Density Arrays“

Zunächst sollte die differenzielle Expression möglichst vieler Gene mittels qPCR bestätigt werden. Eine effiziente Möglichkeit hierfür boten TLDA-Analysen.

Auswahl eines geeigneten Referenzgens für die quantitative PCR

Jung *et al.* [2007] beschrieben *TBP* und *PPIA* als geeignete Referenzgene für qPCR-Untersuchungen von kzNZK, da sie keinen Expressionsunterschied zwischen tumorösem und nichtmalignem Gewebe aufwiesen. In den „Microarray“-Analysen zeigten die Expressionswerte beider Gene geringe Variationskoeffizienten, so dass beide Gene als Referenzgene geeignet erscheinen. Da *TBP* in den TLDA-Analysen zum Teil Expressionswerte nahe der Nachweisgrenze, *PPIA* dagegen deutlich höhere Expressionswerte aufwies, sollte die *PPIA*-Expressionsmessung mit einer geringeren Variabilität behaftet sein. Somit wurde in allen qPCR-Analysen *PPIA* als Referenzgen verwendet.

Korrelation der „Microarray“- und quantitative PCR-Daten

Insgesamt wurde mittels TLDAs die Expression von 21 Targetgenen, normiert auf die des Referenzgens *PPIA*, gemessen. Drei dieser Gene (*BIRC5*, *IL13RA2*, *NMU*) wurden aufgrund ihrer zu geringen Expression von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Die Expressionswerte der restlichen 18 Gene zeigten sowohl für die Metastasen als auch die Primärtumoren eine mittlere bis sehr starke, signifikante Korrelation zu den mittels „Microarrays“ gemessenen Expressionswerten ($\rho = 0{,}57 - 0{,}98$; $p < 0{,}010$). Diese Korrelationskoeffizienten stimmten mit den in der Literatur beschriebenen, die zwischen 0,63 und 0,75 lagen [Morey *et al.*, 2006], überein und übertrafen diese in vielen Fällen sogar. Somit wurden die „Microarray“-Daten für alle gemessenen Gene und Proben mittels der TLDA-Messungen bestätigt. Die für die Metastasen ermittelten Korrelationskoeffizienten waren für 16 der 18 Targetgene höher als die für die Primärtumoren bestimmten. Dies ist möglicherweise auf die „batch“-Korrektur der „Microarray“-Daten im Falle der Primärtumoren zurückzuführen, die die einzelnen Expressionswerte minimal verändert hat.

Validierung der differenziellen Expression der Targetgene

Elf der 18 auswertbaren Gene waren in den „Microarray“-Analysen in spät *vs.* früh entwickelten Metastasen sowie in spät *vs.* früh metastasierten primären kzNZK differenziell exprimiert. Für eine genaue Vorhersage des DFS ist es wünschenswert, dass die Expression der identifizierten Gene nicht nur eine Unterscheidung der extremen DFS-Gruppen der „Microarray“-Analysen erlaubt, sondern möglichst eine generelle Assoziation zum DFS zeigt. Deshalb wurden in den TLDA-Analysen weniger strenge DFS-Grenzen angewendet: DFS > 24 *vs.* ≤ 24 Monate. Diese DFS-Grenze wurde basierend auf einer Studie von van der Poel *et al.* [1999] festgelegt, die ein längeres Überleben nach Metastasektomie für Patienten mit einem DFS > 24 Monate zeigte.

Diese differenzielle Expression wurde in den Metastasen für alle elf, in den Primärtumoren lediglich für sechs Gene mit mindestens einem statistischen Trend bestätigt. Die geringere Validierungsrate im Falle der primären kzNZK kann auch hier zum einen wieder

in der „batch“-Korrektur der entsprechenden „Microarray“-Daten, zum anderen in der Verwendung eines erweiterten Patientenkollektivs und insbesondere der Verwendung weniger strenger DFS-Grenzen in den TLDA-Analysen begründet liegen. Eine weitere Ursache könnte die meist größere n-fache Expressionsänderung zwischen den Metastasen- im Vergleich zu den Primärtumorsubgruppen darstellen, die sich mit unabhängigen Methoden einfacher bestätigen lässt und wiederum einen Hinweis auf die Selektion dieser Expressionsunterschiede während der Metastasierung darstellt. Die sich daraus ableitende funktionelle Relevanz dieser Gene in Metastasierung und Tumorzelllatenz wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass in den Metastasen neun der elf untersuchten Gene eine Korrelation zum DFS zeigten, in den Primärtumoren lediglich zwei Gene.

Zwischen nicht metastasierten und metastasierten kzNZK wurde die in den „Microarray“-Analysen beobachtete differenzielle Expression für fünf von neun Genen zumindest mit einem statistischen Trend bestätigt, zwischen nicht und spät metastasierten kzNZK für drei von vier Genen. Unter diesen Genen waren *TIMP3* und *RGS5*, die auch von Yao *et al.* [2008] als differenziell exprimiert zwischen nicht metastasierten und metastasierten kzNZK/Metastasen identifiziert worden waren. Dass die differenzielle Expression nicht für alle Gene validiert werden konnte, kann zum einen wieder auf die „batch“-Korrektur der „Microarray“-Daten, zum anderen auf das erweiterte Patientenkollektiv zurückgeführt werden. Insbesondere konnte eine differenzielle Expression nur für eines (*CENPV*) der fünf Gene, die in dem Vorhersagemodell zur Unterscheidung nicht metastasierter und (spät) metastasierter kzNZK enthaltenen waren, bestätigt werden. Dies lässt darauf schließen, dass bei Verwendung einer relativ geringen Probenzahl in den „Microarray“-Analysen solche Vorhersagemodelle nicht verlässlich genug sind, um potenzielle prognostisch relevante Gene zu identifizieren. Eine Auswahl durch Abgleich mit den Ergebnissen anderer Studien scheint hierfür insgesamt besser geeignet zu sein. Zwischen nicht metastasierten und metastasierten kzNZK waren laut der TLDA-Analysen sechs weitere Gene mit mindestens einem statistischen Trend unterschiedlich exprimiert, die in den „Microarray“-Analysen keine differenzielle Expression aufwiesen. Diese wurden ursprünglich zur Validierung des Vergleichs späte *vs.* frühe Metastasierung ausgewählt. Diese Beobachtung legt nahe, dass viele der Gene, die eine Unterscheidung zwischen früher und später Metastasierung zulassen, auch nicht metastasierte von metastasierten kzNZK unterscheiden können, was für eine prognostische Anwendung besonders interessant ist.

Auswahl der Gene für weiterführende Analysen

In weiterführenden Analysen sollte die potenzielle prognostische Aussagekraft ausgewählter Gene an größeren Patientenkollektiven bestätigt werden. Hierbei wurden Gene ausgewählt, die potenziell zum einen eine Unterscheidung zwischen kzNZK mit unterschiedlich langen DFS zuließen und zum anderen diese metastasierten Tumoren von solchen differenzierten, die keine manifesten Metastasen verursachten. Auch eine Differenzierung spät und nicht metastasierter Tumoren war wünschenswert für eine optimale Überwachung und Versorgung der Patienten. Insbesondere Gene, die eine kontinuierliche Deregulation zwischen nicht, spät und früh metastasierten Tumoren aufwiesen, schienen für die Differenzierung dieser drei Gruppen geeignet. Für die folgenden Analysen wurden deshalb bevorzugt Gene ausgewählt, die

diese Forderung erfüllten. Auch wenn diese Gene in einzelnen Gruppenvergleichen nur einen statistischen Trend aufwiesen, könnten sie in Überlebensanalysen an einem größeren Patientenkollektiv bzw. durch eine Kombination mehrerer Gene dennoch prognostische Relevanz erlangen. Weiterhin sollten die für weiterführende Analysen ausgewählten Gene potenziell funktionell an der Tumorprogression beteiligt sein. Dies wurde zum einen durch Literaturdaten, zum anderen anhand der Korrelation der Genexpression in Metastasen mit dem DFS der Patienten beurteilt.

Basierend auf diesen Kriterien wurden *CA4*, *DKK3*, *EDNRB*, *PECAM1*, *TIMP3* und *TSPAN7* für eine weiterführende Validierung ausgewählt. Außer für die beiden erstgenannten nahm die mittlere Expression dieser Gene von nicht über spät zu früh metastasierten kzNZK kontinuierlich ab. *DKK3*, *PECAM1*, *TIMP3* und *TSPAN7* waren signifikant oder tendenziell höher exprimiert in spät im Vergleich zu früh metastasierten kzNZK. Außer *CA4* waren diese Gene zudem signifikant höher exprimiert in späten im Vergleich zu frühen Metastasen und ihre Expression in den Metastasen (außer *DKK3*) korrelierte zudem positiv und signifikant mit dem DFS. Außer *DKK3* waren alle diese Gene zudem signifikant oder tendenziell höher exprimiert in nicht metastasierten im Vergleich zu metastasierten kzNZK. Darüber hinaus war die *CA4*-Expression tendenziell höher in nicht im Vergleich zu spät metastasierten kzNZK. Alle sechs Gene wiesen zudem eine Expression deutlich oberhalb der Nachweisgrenze der qPCR auf, so dass sie mit dieser Technik valide detektierbar sind. CA4, DKK3, EDNRB, PECAM1 und TIMP3 sind bekanntermaßen potenziell an der Progression von Tumoren, insbesondere des (kz)NZK, beteiligt (vgl. Tab. 5.1, S. 92; Tab. 5.2, S. 96). Eine Rolle von TSPAN7 im Tumorgeschehen wurde bisher noch nicht beschrieben. Interessant ist dieses Gen allerdings, da sein Verwandter CD82 einen Metastasierungssuppressor darstellt [Bandyopadhyay *et al.*, 2006]. *TSPAN7* wurde zudem von einer Kollegin aus der urologischen Klinik des Universitätsklinikums Jena (J. Sanjmyatav) bei Verwendung eines unabhängigen Patientenkollektivs und einer anderen „Microarray"-Plattform als kontinuierlich herunterreguliert in nicht über spät zu früh metastasierten kzNZK identifiziert, wobei auch hier der Unterschied zwischen spät und früh metastasierten Tumoren statistische Signifikanz erreichte (nicht publiziert).

Das funktionell interessante DARC, das die metastasierungsinhibierende Funktion von CD82 vermittelt [Bandyopadhyay *et al.*, 2006], wurde nicht in die weiteren Analysen einbezogen. *DARC* war zwar signifikant höher exprimiert in spät im Vergleich zu früh metastasierten kzNZK und wies in beiden Gruppen nur eine geringe Streuung auf, allerdings lagen die Expressionswerte der nicht metastasierten Tumoren zwischen diesen beiden Gruppen (vgl. Abb. 4.6, S. 62). Für eine prognostische Anwendung ist dies ungünstig, da somit Patienten, die keine Metastasen entwickeln, unter Umständen dieselbe *DARC*-Expression aufweisen wie Patienten, die frühzeitig Metastasen entwickeln. Diese nur geringen Unterschiede zwischen den drei Primärtumorsubgruppen werden durch die Beobachtung gestützt, dass sich die DARC-Proteinmenge in Gefäßen von normalem und tumorösem Prostata-, Brust- und Lungengewebe nicht unterscheidet [Bandyopadhyay *et al.*, 2006]. Vielmehr erfolgt die metastasierungssuppressive Wirkung von DARC durch eine Regulation von CD82, dessen Proteinmenge in normalen Epithelzellen deutlich höher ist als in Tumorzellen [Bandyopadhyay *et al.*, 2006]. Auch unter diesen Gesichtspunkten erscheint die weitere Untersuchung des CD82-Verwandten TSPAN7 interessant.

5.2.2 Validierung ausgewählter Kandidatengene mittels quantitativer PCR und Immunhistochemie

Während die TLDA-Analysen der Bestätigung der differenziellen Expression ausgewählter Gene dienten, sollte in der weiterführenden Validierung die prognostische Relevanz der Gene *CA4*, *DKK3*, *EDNRB*, *PECAM1* und *TIMP3* auf mRNA-Ebene sowie von TSPAN7 auf Proteinebene an einem größeren Patientenkollektiv geprüft werden. Wichtig zu klären war hier zum einen, ob diese Gene bzw. Proteine mit der Aggressivität des Tumors, also ungünstigen klinischen Parametern oder einem kurzen Überleben (DFS, TSS, OS) der Patienten, assoziiert sind. Zum anderen sollte anhand multivariater Cox-Regressionsanalysen geprüft werden, ob diese Gene tatsächlich als prognostische Marker geeignet sind. Prognostisch nutzbar sind sie dann, wenn sie den Krankheitsverlauf der Patienten unabhängig von klinischen Parametern beeinflussen. Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist insbesondere der Einfluss auf das DFS relevant. In die DFS-Analysen werden nur Patienten ohne initiale distante Metastasen einbezogen, so dass diese Analysen das zur Metastasierungsvorhersage relevante Patientenkollektiv abbilden. Faktoren, die das DFS beeinflussen, können zum einen zur Abschätzung der Länge des DFS herangezogen werden. Zum anderen kann mit ihnen das Metastasierungsrisiko generell abgeschätzt werden, da in die DFS-Analysen auch Patienten ohne Rezidiv in Form von zensierten Daten einbezogen werden. Somit erfüllen Gene, die das DFS beeinflussen, genau die in dieser Arbeit geforderten Kriterien. Auch das TSS spiegelt das Metastasierungsrisiko der Patienten wider, da ein Patient nur dann am kzNZK versterben kann, wenn er vorher ein Rezidiv erlitt. In die TSS-Analysen werden aber auch Patienten mit initialen Metastasen einbezogen. Daher sind Faktoren, die das TSS abschätzen, nicht notwendigerweise geeignet, um das Risiko für eine spätere Metastasierung vorherzusagen. Klinisch ist aber auch die Abschätzung des TSS relevant und wird routinemäßig eingesetzt. Beispielsweise können so Hochrisikopatienten identifiziert werden, für deren metastasierte Erkrankung andere therapeutische Optionen verfügbar sind als für die von Niedrigrisikopatienten.

Expressionsmessung mittels quantitativer PCR — Überblick

Die Expression von *CA4*, *DKK3*, *EDNRB*, *PECAM1* und *TIMP3* wurde mittels genspezifischer „TaqMan Gene Expression Assays“ am LightCycler 480 in 86 primären kzNZK gemessen. Hier wurden nur Patienten einbezogen, von welchen Nachbeobachtungsdaten verfügbar waren bzw. die bereits initial Metastasen aufwiesen und von denen kryokonserviertes Gewebematerial vorhanden war, das einen Tumorzellgehalt ≥ 70 % (kzNZK) bzw. ≤ 10 % (nichtmaligne Proben) aufwies und eine ausreichende RNA-Menge lieferte (≥ 100 ng). Somit repräsentierte dieses Kollektiv keine konsekutiven Patienten. Das mediane Alter dieser Patienten bei Nephrektomie, das Geschlechterverhältnis, der Anteil initial metastasierter Patienten und auch der Anteil an Patienten, die metachrone Metastasen entwickelten sowie die Häufigkeit der Metastasenlokalisationen entsprechen jedoch den in der Literatur für konsekutive Patienten beschriebenen Daten [Ljungberg *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2009; Batzler *et al.*, 2004; Slaton & Swanson, 2000; Motzer *et al.*, 1996]. Somit kann das vorliegende Patientenkollektiv als repräsentativ angesehen werden.

Die signifikant geringere Expression von *CA4*, *DKK3*, *EDNRB* und *TIMP3* in den kzNZK im Vergleich zu den nichtmalignen Nierengeweben deutet auf eine tumorsuppressive Rolle der entsprechenden Proteine in dieser Tumorentität hin. Diese Befunde passen zu den verfügbaren Literaturdaten. Sowohl für *DKK3* (n = 17) [Kurose *et al.*, 2004] als auch für *TIMP3* (n = 24) [Hagemann *et al.*, 2001] wurde eine signifikant verminderte Expression im kzNZK im Vergleich zum autologen nichtmalignen Gewebe beschrieben. Für *EDNRB* wurde eine Promotorhypermethylierung in NZK (n = 48) im Vergleich zu nichtmalignem Nierengewebe beobachtet [Pflug *et al.*, 2007], die einen epigenetischen Mechanismus zur mRNA-Reduktion darstellt [Knight *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009]. Passend zu den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Resultaten zeigten Analysen der Oncomine-Datenbank [2010], die „Microarray"-Daten verschiedener Studien enthält und nach einem einheitlichen Algorithmus auswertet, dass auch die *CA4*-Expression in kzNZK im Vergleich zu nichtmalignen Nierengeweben herunterreguliert ist.

PECAM1 (*CD31*) war in kzNZK signifikant höher exprimiert als im nichtmalignen Nierengewebe. Für eine *PECAM1*-Genexpressionsmessung im kzNZK im Vergleich zum nichtmalignen Nierengewebe existieren keine Literaturdaten. Eine höhere Expression im Tumor widerspricht auf den ersten Blick der in den immunhistochemischen Färbungen identifizierten gleichen MVD in kzNZK und nichtmalignem Gewebe. Allerdings war die immunhistochemische Färbung der Gefäße im nichtmalignen Gewebe deutlich schwächer als im kzNZK, so dass die mittels qPCR bestimmte Molekülzahl in nichtmalignen Geweben durchaus geringer sein kann als die in Tumoren gemessene.

Lediglich für *EDNRB* und *PECAM1* wurden signifikante Expressionsunterschiede in Abhängigkeit von klinischen Parametern, der Metastasierung bzw. dem DFS der Patienten beobachtet. Zusätzlich zu diesen Genen wurde auch für *CA4* eine Abhängigkeit des Überlebens von der Expressionshöhe festgestellt. Die Daten zu diesen drei Genen werden im Anschluss im Zusammenhang mit den jeweiligen Literaturdaten erörtert.

Bestimmung der Proteinmenge mittels Immunhistochemie — Überblick

Auch das für die immunhistochemischen Färbungen genutzte Patientenkollektiv umfasste keine konsekutiven Patienten. Die Patienten waren danach ausgewählt worden, autologe primäre NZK und Metastasen zu repräsentieren. Zusätzlich wurden nicht metastasierte NZK und Onkozytome zum Vergleich mitgeführt. Die Verteilung der histologischen Subtypen entsprach in etwa der in der Literatur beschriebenen [Ljungberg *et al.*, 2009; Lopez-Beltran *et al.*, 2006]. Sowohl der Anteil initial metastasierter Tumoren (36 % *vs.* 10 – 20 %) als auch der Gesamtanteil an metastasierten NZK (77 % *vs.* 30 – 50 %) war aufgrund der Probenauswahl höher als der in der Literatur beschriebene [Patel *et al.*, 2009; Motzer *et al.*, 1996]. Auch die Verteilung der Metastasenlokalisationen weicht aus diesem Grund von der natürlichen Verteilung ab [Slaton & Swanson, 2000]. Die erhaltenen Daten sollten also später ggf. an einem konsekutiven Kollektiv überprüft werden.

Die Proteinmenge beider immunhistochemisch untersuchter Faktoren, PECAM1 und TSPAN7, war mit klinischen Parametern, der Metastasierung und/oder dem Überleben der Patienten assoziiert. Diese Daten werden ebenfalls im Anschluss im Zusammenhang mit den jeweiligen Literaturdaten erörtert.

Kohlenanhydrase IV (*CA4*)-Expression

Laut der „Microarray"- bzw. TLDA-Analysen war *CA4* statistisch signifikant höher exprimiert in nicht metastasierten im Vergleich zu metastasierten sowie in nicht im Vergleich zu spät metastasierten kzNZK. Ein solcher signifikanter oder tendenzieller Unterschied konnte in dem erweiteren Patientenkollektiv nicht mehr festgestellt werden, so dass sich *CA4* nicht, wie ursprünglich angedacht, als geeigneter Marker zur Unterscheidung nicht und spät metastasierter Tumoren erwies.

Allerdings war eine höhere *CA4*-Expression signifikant mit einem längeren TSS assoziiert. Passend dazu beschrieben auch Takenawa *et al.* [1998] ein signifikant längeres Gesamtüberleben von NZK-Patienten (alle histologischen Subtypen) mit hoher im Vergleich zu solchen mit geringer *CA4*-Expression. Weitere Publikationen, die CA4 in Zusammenhang mit dem NZK oder anderen Tumoren beschreiben, existieren nicht. In multivariaten Analysen hatte die *CA4*-Expression allerdings keinen von klinischen Parametern unabhängigen Einfluss auf das TSS. Als prognostischer Einzelmarker ist *CA4* daher nicht geeignet. Es könnte aber einen zusätzlichen Nutzen in Genkombinationen haben.

CA4 ist ein Transmembranprotein, das, wie auch andere Kohlenanhydrasen, die reversible Hydratation von CO_2 katalysiert und Hydrogenkarbonationen durch die Zellmembran transportiert. Somit ist CA4 an der Regulation des intra- und extrazellulären pH-Werts beteiligt. In Tumorzellen wird meist ein neutraler Intrazellulär- und ein azider Extrazellulärraum geschaffen, der das Wachstum von Tumorzellen favorisiert und zudem die Invasivität und Metastasierung von Tumoren zu begünstigen scheint [Übersicht in Swietach *et al.*, 2007]. Dies stellt eine funktionelle Verbindung von CA4 zur Metastasierung her. Warum *CA4*, wie auch sein für das kzNZK prognostisch bedeutsamer Verwandter *CA9* [Sandlund *et al.*, 2007b, Bui *et al.*, 2004], in Tumoren mit guter Prognose höher exprimiert ist, ist bisher ungeklärt.

Endothelinrezeptor B *(EDNRB)*-Expression

Laut der „Microarray"-Analysen war die *EDNRB*-Expression signifikant höher in spät im Vergleich zu früh metastasierten primären kzNZK. Dies wurde in den qPCR-Analysen am LightCycler 480 bei der Wahl ähnlich strenger DFS-Kriterien wie in den „Microarray"-Analysen durch eine tendenziell höhere *EDNRB*-Expression in spät (metachron) im Vergleich zu früh (synchron) metastasierten Tumoren bestätigt (DFS $\geq$ 36 *vs.* $\leq$ 12 Monate). Für die weniger strenge DFS-Grenze von 24 Monaten zeigte sich allerdings kein signifikanter oder tendenzieller Expressionsunterschied. Da *EDNRB* aber laut der qPCR-Analysen in nicht metastasierten im Vergleich zu metastasierten kzNZK signifikant höher exprimiert war, ist es dennoch viel versprechend für prognostische Zwecke.

Tatsächlich zeigte sich ein signifikant längeres DFS, TSS und OS für Patienten mit einer höheren *EDNRB*-Expression. Die statistische Signifikanz in den DFS-Analysen im Vergleich zu den Gruppenvergleichen (DFS $>$ 24 *vs.* $\leq$ 24 Monate) rührt daher, dass hier auch die Nachbeobachtungszeit der nichtmetastasierten kzNZK in Form von zensierten Daten einbezogen wurde. Da die Patienten zur Ermittlung eines DFS-Unterschieds in Abhängigkeit von ihrer *EDNRB*-Expression in drei Gruppen mit unterschiedlichen Patientenzahlen geteilt wurden, wurde hier zusätzlich ein Fisher-Test durchgeführt. Da auch dieser einen signifikanten Unterschied in der Zahl der Ereignisse zwischen den einzelnen Gruppen zeigte, ist davon

auszugehen, dass die Kaplan-Meier-Analysen und der Log-Rank-Test verlässliche Daten liefern.

Für das DFS und das TSS stellte die *EDNRB*-Expression weiterhin einen unabhängigen günstigen prognostischen Faktor dar. Somit repräsentiert *EDNRB*, zumindest in dem verwendeten Patientenkollektiv, einen geeigneten Kandidaten für eine Prognosevorhersage für kzNZK-Patienten. Insbesondere der unabhängige Einfluss auf das DFS macht die *EDNRB*-Expression zu einem viel versprechenden Marker hinsichtlich einer Abschätzung von DFS und Metastasierungsrisiko. Der kombinierte Einfluss verschiedener Parameter auf das OS wurde hier, wie auch bei allen folgenden molekularen Faktoren, nicht untersucht, da 14 der 28 (50 %) verstorbenen Patienten keinen kzNZK-bedingten Tod erlitten und diese Analyse somit nicht das Tumorgeschehen widerspiegeln würden.

Die verminderte Expression von *EDNRB* in kzNZK im Vergleich zum nichtmalignen Nierengewebe sowie die Assoziation einer hohen *EDNRB*-Expression mit günstigeren klinischen Parametern, einem geringeren Metastasierungsrisiko sowie einem längeren DFS und TSS der Patienten sprechen für eine Tumorsuppressorwirkung von EDNRB im kzNZK.

Diese Befunde werden durch verschiedene Literaturdaten gestützt. Beispielsweise wurde eine Promotorhypermethylierung im Vergleich zum jeweiligen nichtmalignen Ursprungsgewebe in 64/96 (67 %) Blasenkarzinomen [Yates *et al.*, 2007], 31/64 (38 %) Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen [Knight *et al.*, 2009] sowie 36/73 (49 %) Prostatakarzinomen [Yegnasubramanian *et al.*, 2004] beobachtet. Eine *EDNRB*-Promotormethylierung wurde außerdem in 35/48 NZK (73 %) im Vergleich zu 27/55 (49 %) nichtmalignen Nierengeweben beobachtet [Pflug *et al.*, 2007]. Wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, beschrieben Yao *et al.* [2008] eine hohe *EDNRB*-Expression als einen unabhängigen prognostischen Faktor für ein längeres TSS von kzNZK-Patienten (n = 236). Der unabhängige prognostische Einfluss auf das DFS wurde bisher allerdings noch nicht beschrieben. Auch Uvealmelanom-Patienten mit einer hohen *EDNRB*-Expression hatten ein signifikant längeres TSS als solche mit einer geringen *EDNRB*-Expression [Smith *et al.*, 2002].

Im Gegensatz zu den mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sehr gut übereinstimmenden genetischen und Expressionsdaten passen die bisher beschriebenen Proteinanalysen nicht ins Bild. So beschrieben Herrmann *et al.* [2007] eine schwache bis mittlere immunhistochemische EDNRB-Färbung in 171/180 (93 %) NZK, die keine Assoziation zu Tumorgrad oder -stadium zeigte, was im Falle des Tumorgrades den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit widerspricht. Dies könnte auf die unterschiedlichen verwendeten Patientenkollektive zurückgeführt werden. Weiterhin wurde sowohl für Mammakarzinome (n = 176) [Wülfing *et al.*, 2003] als auch Vulvakarzinome (n = 68) [Eltze *et al.*, 2007] ein tendenziell bzw. signifikant kürzeres DFS für Patienten mit EDNRB-positiven im Vergleich zu solchen mit EDNRB-negativen Tumoren beschrieben. Diese konträren Ergebnisse von Methylierungs-/ Expressions- und Proteinanalysen könnten auf eine zusätzliche Regulation von EDNRB auf der Protein- im Vergleich zur mRNA-Ebene bedingt sein. Möglicherweise erkennen auch die verwendeten Antikörper nur eine der zwei existierenden Proteinisoformen, während zumindest der in der vorliegenden Arbeit verwendete qPCR-Assay alle drei Transkriptvarianten detektiert. Die Beobachtungen in Mamma- und Vulvakarzinomen auf Proteinebene und für andere Tumorentitäten auf DNA- bzw. mRNA-Ebene legen zudem eine unterschiedliche

Funktion von EDNRB in Abhängigkeit von der Tumorentität nahe. Dies wird durch die bisher publizierten und im Folgenden erläuterten funktionellen Untersuchungen gestützt.

EDNRB ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor [Lalich *et al.*, 2007], der im normalen Nierengewebe in den Endothelzellen der Blutgefäße und Glomerulikapillaren sowie in den Tubulizellen detektierbar ist [Kuc & Davenport, 2004]. Mutationen oder Deletionen von *EDNRB* rufen die sog. Hirschsprung-Krankheit hervor, eine massive Dickdarmerweiterung [Sanchez-Mejias *et al.*, 2010]. EDNRB gehört neben seinen Liganden EDN1, EDN2 und EDN3 sowie dem Rezeptor EDNRA zu der sog. Endothelinachse, deren wichtige funktionelle Bedeutung im Tumorgeschehen bereits seit mehreren Jahren bekannt ist. So wurden und werden beispielsweise EDNRA-Antagonisten (Atrasentan, Zibotentan) bereits in klinischen Phase I – III-Studien zur Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms getestet [James *et al.*, 2009; Übersicht in Lalich *et al.*, 2007]. EDNRA und EDNRB zeigen eine abweichende Verteilung in humanen Geweben, die eine unterschiedliche funktionelle Bedeutung beider Rezeptoren nahelegt [Guruli *et al.*, 2004]. Während für EDNRA konsistent eine zellwachstums- und -migrationsfördernde sowie proangiogene Wirkung beschrieben wurde [Wilson *et al.*, 2006; Bhargava *et al.*, 2005; Bagnato *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 1996], ist die funktionelle Rolle von EDNRB weniger eindeutig. So induzierte EDN1 *via* EDNRB Apoptose in humanen A375-Melanomzellen [Okazawa *et al.*, 1998] und murinen primären Zellen der glatten vaskulären Muskulatur [Nakahashi *et al.*, 1998] und inhibierte die Proliferation primärer humaner Ito-Zellen [Mallat *et al.*, 1995]. Im Gegensatz dazu bewirkten EDNRB-Antagonisten in primären humanen Melanomzellen aus Primärtumoren und Metastasen sowie in humanen Melanom- (A375, WM35) und Gliom-Zelllinien (LN–229, SW1088) eine Verringerung der Zellviabilität und induzierten Zellzyklusarrest (G2/M) und Apoptose [Montgomery & Patterson, 2008; Lahav *et al.*, 2004]. Die Aktivierung von EDNRB durch EDN1 kann *via* die Verminderung von Zell-Zellkontakten durch ein verringertes CDH1-Level zudem die Migrationsfähigkeit humaner 1007-Melanomzellen begünstigen [Rosano *et al.*, 2004]. Weiterhin verlangsamte eine EDNRB-Suppression das Wachstum subkutaner A375-Tumoren in Nacktmäusen [Lahav *et al.*, 1999]. Insbesondere die konträren Daten für Melanomzellen legen eine duale Rolle von EDNRB in Zellproliferation und Apoptose nahe.

Die für das NZK beschriebene *EDNRB*-Promotorhypermethylierung sowie die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, dass EDNRB in kzNZK-Zellen primär einen wachstumsinhibitorischen Effekt ausübt. EDNRB könnte dementsprechend einen inhibierenden Effekt auf die Initiation des Metastasenwachstums ausüben. Mit abnehmender *EDNRB*-Expression kann möglicherweise dieser inhibierende Effekt schneller überwunden und somit das Metastasenwachstum induziert und die Länge der Tumorzelllatenzphase bestimmt werden. Eine EDNRB-Inhibierung in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) bewirkte allerdings keine Veränderung ihrer Viabilität [Lahav *et al.*, 1999]. Da Tumorzellen in ihrem Verhalten embryonalen Zellen ähneln [Nguyen & Massague, 2007], spielt EDNRB möglicherweise auch keine Rolle in der Proliferation von Nierentumorzellen. Trotzdem könnte EDNRB *in vivo* zur Induktion und Aufrechterhaltung der Tumorzelllatenz beitragen. Denn auch ein verringertes PLAUR-Level beispielsweise, das ein verringertes MAPK1/MAPK14-Verhältnis nach sich zieht, bewirkt eine Latenz von HEp3-Epidermoidkarzinom-Zellen ohne deren *in vitro*-Proliferationsrate zu beeinflussen [Aguirre-Ghiso *et al.*, 2003 & 1999].

Theoretisch sollten Faktoren, die das Tumorzellwachstum zur Makrometastase inhibieren, auch die Zellen des Primärtumors am Wachstum zum makroskopischen Tumor hindern. Dass auch Primärtumoren in einem latenten Zustand vorliegen können, wurde beispielsweise in Autopsiestudien gezeigt [Black & Welch, 1993]. In der Klinik beobachtet man aber nicht, dass spät metastasierte Primärtumoren erst in älteren Patienten entstehen als früh metastasierte oder nicht metastasierte in älteren Patienten als metastasierte. So betrug beispielsweise in dem in der vorliegenden Arbeit mittels qPCR untersuchten kzNZK-Patientenkollektiv das mediane Alter der Patienten, deren Tumoren keine Metastasen bildeten, bei Nephrektomie 63 (39 – 89) Jahre. Patienten, deren Tumoren initial oder im Verlauf metastasierten, wiesen ein ähnliches medianes Alter bei Nephrektomie von 66 (42 –81) Jahren auf. Die Validierung der *EDNRB*-Expression mittels TLDAs zeigte, wie bereits vorher die „Microarray"-Analysen an vielen anderen Genen, dass der Unterschied der *EDNRB*-Expression in primären kzNZK deutlich weniger stark ausgeprägt war als in Metastasen. So ist es durchaus denkbar, dass EDNRB auch die Latenz von Primärtumorzellen beeinflusst, sich dieser EDNRB-bedingte Einfluss auf die Tumorzelllatenz in den einzelnen Pimärtumorsubgruppen aber nicht merklich unterscheidet. Das heißt, EDNRB — oder auch andere Proteine — könnten ähnlich lange Latenzzeiten der Primärtumorzellen in allen Patienten induzieren.

PECAM1-Expression und Mikrogefäßdichte

PECAM1 — besser bekannt als CD31 — ist ein transmembranäres Glykoprotein, das selektiv in Zellen des Gefäßsystems wie Endothelzellen, Thrombozyten oder Lymphozyten detektierbar ist und Endothelzellkontakte vermittelt [Coukos *et al.*, 1998]. Es wird in der Pathologie beispielsweise zur Diagnose von Gefäßtumoren eingesetzt [Kutzner, 2005].

In der vorliegenden Arbeit wurden die *PECAM1*-Expression sowie die PECAM1-Proteinmenge in Form der MVD an je einem, sich unterscheidenen Patientenkollektiv bestimmt. Der in dieser Arbeit gewählte PECAM1-Antikörper und die genutzte Auswerteprozedur entsprechen den in der Literatur beschriebenen [Sandlund *et al.*, 2007a]. Die in kzNZK beobachtete mediane MVD (212 Gefäße/mm^2) war etwas höher als die in der Literatur beschriebene (10 – 181 Gefäße/mm^2) [Baldewijns *et al.*, 2007; Sandlund *et al.*, 2007a; Imao *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2002]. Dies könnte zum einen auf das in dieser Studie verwendete selektierte Patientenkollektiv sowie zum anderen auf die bei immunhistochemischen Analysen immer bestehende subjektive Auswertung sowie die Verwendung verschiedener MVD-Marker (PECAM1, CD34) zurückzuführen sein. Weiterhin wurden in dieser Arbeit, je nach Verfügbarkeit, sowohl Stanzen aus dem zentralen als auch aus dem peripheren Bereich des Tumors einbezogen (meist eine periphere und zwei zentrale Stanzen pro Probe). Hemmerlein *et al.* [2001] zeigten allerdings, dass Stanzen im peripheren Bereich eine höhere MVD besitzen können als Stanzen aus dem zentralen Tumorareal, was die in dieser Arbeit beobachtete höhere MVD im Vergleich zu anderen Studien ebenfalls erklären könnte. Eine geringere MVD in papillären im Vergleich zu kzNZK, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurde, ist ebenfalls aus der Literatur bekannt [Sandlund *et al.*, 2007a].

In den „Microarray"- bzw. den TLDA-Analysen wurde eine signifikant oder tendenziell höhere *PECAM1*-Expression in spät im Vergleich zu früh metastasierten und auch in nicht metastasierten im Vergleich zu metastasierten primären kzNZK beobachtet. In einem unab-

hängigen Patientenkollektiv wurde die differenzielle Expression zwischen meta- (DFS $\geq$ 36 Monate) und synchron (DFS $\leq$ 12 Monate) metastasierten Tumoren mittels qPCR bestätigt. Auch auf Proteinebene zeigte sich eine Abnahme der medianen MVD von nicht metastasierten über spät/metachron metastasierte zu früh/synchron metastasierten kzNZK, erreichte aber keine statistische Signifikanz. Zwischen nicht metastasierten und metastasierten kzNZK zeigte sich an den unabhängigen Patientenkollektiven weder für die *PECAM1*-Genexpression noch für die MVD ein statistisch signifikanter oder tendenzieller Unterschied.

Eine hohe MVD in primären kzNZK war mit ungünstigen klinischen Parametern assoziiert. Für die *PECAM1*-Expression war dies nur für das Vorhandensein initialer Lymphknotenmetastasen zu beobachten. Zudem wurde ein längeres TSS und OS in Patienten mit einer höheren *PECAM1*-Expression bzw. höheren MVD beobachtet. Allerdings war dieser Unterschied nur im Fall der Genexpression signifikant. Die *PECAM1*-Expression stellte sogar einen unabhängigen prognostischen Marker für das TSS dar und ist somit potenziell zur Prognoseabschätzung von kzNZK-Patienten geeignet. Obwohl *PECAM1* einen signifikanten Expressionsunterschied zwischen spät und früh metastasierten primären kzNZK aufwies, waren keine Unterschiede im DFS in Abhängigkeit von der *PECAM1*-Expression zu verzeichnen. Dies liegt möglicherwiese darin begründet, dass in die Kaplan-Meier-Analysen im Gegensatz zu den Gruppenvergleichen nur Tumoren einbezogen wurden, die keine initialen distanten Metastasen aufwiesen. Somit könnte *PECAM1* eventuell biologisch an der Entstehung initialer (synchroner) bzw. metachroner Metastasen mitwirken. Für eine DFS-Vorhersage, die nur für initial nicht metastasierte Patienten relevant ist, ist es daher als Einzelmarker ungeeignet.

Die zum Teil abweichenden Ergebnisse von Expressionsmessung und MVD-Beurteilung sind zum einen sicher durch die weitestgehend differierenden Patientenkollektive beider Untersuchungsmethoden begründet. Einen weiteren Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse stellt die Auswertemethode dar. In der Immunhistochemie wurde lediglich die Zahl positiver Gefäße in einem Gewebeschnitt gezählt, unabhängig von deren Färbeintensität. Diese Methode ist gängig bei der Beurteilung der MVD [z. B. Sandlund *et al.*, 2007a]. Allerdings ergaben sich hier beim Betrachten mehrerer Stanzen eines Gewebes, die für die Auswertung gemittelt wurden, zum Teil deutliche Unterschiede in der MVD. Dies liegt möglicherweise in der Verwendung von TMAs und somit kleiner Gewebestanzen begründet, die für den Fall der MVD das Gesamtgewebe vielleicht nur ungenügend repräsentieren. Bei der qPCR hingegen wurde die RNA aus einem repräsentativen Gewebestück isoliert. Außerdem wurde in der qPCR eine exakte relative Molekülzahl bestimmt, das heißt, auch die „Intensität der Färbung“ berücksichtigt. Obwohl sowohl die Expressionsmessungen als auch die MVD-Beurteilung darauf hindeuten, dass *PECAM1* ein Tumor- und Metastasierungssuppressorgen im kzNZK darstellt, scheint die Quantifizierung der Genexpression geeigneter für prognostische Zwecke zu sein. Dies wird durch die schwache Korrelation der *PECAM1*-Expression in primären kzNZK mit dem DFS untermauert.

Auf Proteinebene wurden neben den Primärtumoren auch kzNZK-Metastasen in die Untersuchungen einbezogen. Obwohl kein signifikanter MVD-Unterschied zwischen nicht metastasierten und metastasierten primären kzNZK oder in Abhängigkeit vom DFS verzeichnet wurde, zeigten metastasierte kzNZK eine statistisch signifikant höhere MVD als Metastasen. Dies lässt darauf schließen, dass eine abnehmende MVD mit einem höheren Metastasierungsrisiko einhergeht. Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, die die MVD von Metastasen und Primärtumoren vergleichend beschreibt, so dass für die erhaltenen Ergebnisse keine

Vergleichsdaten vorliegen. Bestätigt werden diese Resultate aber durch die Ergebnisse der TLDA-Analysen. Auch dort war die *PECAM1*-Expression in den Metastasen geringer als in den Primärtumoren, wenn auch nicht statistisch signifikant (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu dem Vergleich spät *vs.* früh metastasierte Primärtumoren wiesen spät entstandene Metastasen außerdem eine signifikant höhere MVD auf als früh entstandene (DFS $\leq$ 12 *vs.* $\geq$ 36 Monate; DFS $\leq$ 24 *vs.* $>$ 24 Monate). Ein solcher signifikanter und in den Metastasen verglichen zu den Primärtumoren stärker ausgeprägter Unterschied zeigte sich auch für die mittels TLDAs gemessene *PECAM1*-Expression. Ergänzt durch die Korrelation der MVD in Metastasen mit dem DFS der Patienten lässt dies wiederum auf eine Selektion dieses Expressions- bzw. MVD-Unterschieds während des Metastasierungsprozesses schließen. Somit könnten sowohl die Gefäßzahl als auch die *PECAM1*-Molekülzahl eine funktionelle Rolle in der Metastasierung und der Tumorzelllatenz spielen.

Die prognostische Relevanz der *PECAM1*-Genexpression in NZK wurde bisher noch nicht beschrieben, so dass zum Vergleich hier nur Daten für die Proteinebene in Form der MVD zur Verfügung stehen. Eine höhere MVD in weniger aggressiven NZK, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. So beobachteten beispielsweise Baldewijns *et al.* [2007] (n = 150), Sandlund *et al.* [2007a] (n = 167), Yildiz *et al.* [2008] (n = 54) und Hemmerlein *et al.* [2001] (n = 58) eine höhere MVD in Tumoren mit geringem Tumorgrad, geringem Tumordurchmesser und geringem klinischen Stadium, wobei die ersten drei Studien kzNZK, die letzte NZK verschiedener Histologien umfassten. Yildiz *et al.* [2008] und Imao *et al.* [2004] beobachteten eine signifikant höhere MVD in nicht metastasierten im Vergleich zu initial bzw. im Verlauf metastasierten NZK (n = 42 *vs.* 12 bzw. 56 *vs.* 14), wobei die erste Studie nur kzNZK, die zweite NZK aller Histologietypen einbezog.

Allerdings beschrieben beispielsweise Zhang *et al.* [2002] in einer Studie an 70 NZK eine höhere MVD in Tumoren mit höherem Stadium und Yilmazer *et al.* [2007] stellten bei der Untersuchung von 50 NZK überhaupt keine Assoziation zwischen MVD und Tumorgrad oder -stadium fest. Außerdem beschrieben Fukata *et al.* [2005] eine höhere MVD in 24 metastasierten im Vergleich zu 30 nicht metastasierten primären NZK. Insgesamt sind also auch die bisher publizierten Ergebnisse hinsichtlich der Assoziation der MVD mit der Aggressivität von NZK kontrovers, tendieren aber zu einer Assoziation einer hohen MVD mit weniger aggressiven Tumoren. Diese konträren Beobachtungen können zum einen auf unterschiedlich zusammengesetzte Patientenkollektive, wie z. B. eine unterschiedliche Verteilung der histologischen Subtypen, zurückzuführen sein. Dies kann das Ergebnis durchaus beeinflussen, da in papillären NZK eine hohe MVD mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [Sandlund *et al.*, 2007a]. Zum anderen stellen die Verwendung unterschiedlicher Antikörper und die subjektive Beurteilung der MVD mögliche Ursachen dar. Zudem existieren je nachdem, welcher der gängigen Endothelzellmarker verwendet wird, Unterschiede in der Färbung reifer und unreifer Gefäße. Während PECAM1 beide Gefäßtypen anfärbt, färbt CD34 lediglich unreife Gefäße, die noch nicht von Perizyten ummantelt sind, kein oder nur ein sehr kleines Lumen und dicke Gefäßwände besitzen, insgesamt also nicht funktionsfähig sind [Yao *et al.*, 2007]. Auch diese Einflüsse könnten durch eine Quantifizierung der *PECAM1*-Expression umgangen und somit objektivere Ergebnisse erhalten werden.

Bezüglich der Überlebensanalysen berichteten auch Sandlund *et al.* [2007a], Yildiz *et al.* [2008] und Rioux-Leclercq *et al.* [2001] ein signifikant längeres TSS, Imao *et al.* [2004] ein signifikant längeres OS und Herbst *et al.* [1998] ein signifikant längeres DFS von Patienten mit hoher MVD im Vergleich zu Patienten mit geringer MVD des Primärtumors. Allerdings war in den ersten vier Studien die MVD kein unabhängiger prognostischer Marker, in der letzten wurde die MVD nicht in multivariaten Analysen untersucht. Die Erkenntnis, dass auch in anderen Studien die MVD nicht als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert wurde, untermauert ebenfalls die potenziell bessere Eignung der Quantifizierung der *PECAM1*-Expression für prognostische Zwecke. Da bisher allerdings keine Vergleichsdaten zur *PECAM1*-Expression hinsichtlich ihres prognostischen Nutzens in NZK existieren, müssen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse an weiteren, möglichst konsekutive Patienten umfassenden Kollektiven bestätigt werden.

Die Assoziation einer hohen MVD mit weniger aggressiven Tumoren und einer besseren Prognose widerspricht der gängigen Theorie, dass Tumorprogression und Metastasierung durch eine hohe Vaskularisierung begünstigt werden [Hanahan & Weinberg, 2000]. Für andere Tumoren wie Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome [Kadota *et al.*, 2008] ist beispielsweise beschrieben, dass eine hohe MVD mit einem aggressiven Verhalten des Tumors assoziiert ist. Die Ursache der paradoxen MVD-Beziehung im kzNZK ist bis heute nicht vollständig verstanden. Gesundes Nierengewebe ist bereits sehr stark vaskularisiert. Es wird vermutet, dass gut differenzierte kzNZK-Zellen die Struktur des normalen Nierengewebes imitieren und somit eine hohe MVD den Zustand im normalen Gewebe reflektiert [Herbst *et al.*, 1998]. Mit zunehmender Entdifferenzierung der kzNZK-Zellen geht diese Eigenschaft verloren und die MVD nimmt ab, wobei auch die Gefäßstruktur hin zu wenigen, aber großen und unregelmäßigen Gefäßen umorganisiert wird [Patel *et al.*, 2009; Rioux-Leclercq *et al.*, 2001; Sabo *et al.*, 2001]. Diese größeren Gefäße scheinen zudem eine höhere Permeabilität zu besitzen [Sabo *et al.*, 2001], so dass Tumorzellen leichter in diese Gefäße eintreten und disseminieren können, was die höhere Aggressivität von kzNZK mit geringerer MVD erklärt.

Eine geringe MVD kann außerdem Hypoxie insbesondere in weit von diesen Gefäßen entfernten Tumorzellen induzieren. Hypoxische Signale führen nicht nur zur Angiogeneseinduktion, sondern begünstigen auch eine höhere Hypoxietoleranz der Tumorzellen. Deren Überleben und Wachstum ist damit weniger abhängig von einer ausreichenden Blutzufuhr, so dass diese Tumorherde einen aggressiveren Phänotyp aufweisen [Übersicht in Rak & Yu, 2004]. Helczynska *et al.* [2003] und Jögi *et al.* [2002] beobachteten beispielsweise eine Dedifferenzierung hypoxischer humaner Neuroblastom- (SK-N-BE2) und Mammakarzinomzellen (MCF7, CAMA, T47D) hin zu einem stammzellähnlichen Phänotyp und zudem eine geringere Rate an toten Zellen in den unter hypoxischen im Vergleich zu den unter normoxischen Bedingungen gezüchteten Zellen. Ein ähnliches Verhalten kann in kzNZK angenommen werden, da die Präsenz von nekrotischen Tumorarealen als Indikator der Hypoxie in diesen Tumoren mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist [Lam *et al.*, 2005]. Im Falle des kzNZK würde die erhöhte Gefäßpermeabilität und Aggressivität der Tumoren zwar eine begünstigte Metastasierung an sich erklären, liefert aber keine Erklärung für unterschiedlich lange Latenzzeiten der Tumorzellen.

Einen interessanten Ansatz zur Erklärung unterschiedlich langer Latenzzeiten in Abhängigkeit von der *PECAM1*-Expression oder der MVD lieferten allerdings Sardari Nia *et al.*

[2007]. Sie beobachteten zwei verschiedene Wachstumsmuster in kzNZK-Lungenmetastasen (n = 24). Destruktive Metastasen zerstörten das Lungengewebe bei ihrem Wachstum und besaßen Gefäße, die morphologisch denen ähnelten, die typischerweise in Primärtumoren beobachtet werden. Diese Metastasen hatten eine höhere MVD als solche mit alveolärem Wachstum. Bei diesen alveolären Metastasen durchzogen die Tumorzellen das Lungenparenchym und nutzten anscheinend bereits bestehende Gefäße des Lungenparenchyms für ihr Wachstum. Da in der vorliegenden Arbeit nur kleine Gewebeareale auf den TMAs zur Verfügung standen, konnten solche Wachstumsmuster nur schwer beurteilt werden. Allerdings war auch hier bei einigen Stanzen ein den alveolären Metastasen ähnliches Wachstumsmuster zu beobachten (nicht gezeigt). Metastasen mit einer letztendlich geringeren MVD könnten solche mit alveolärem Wachstum darstellen und somit die bereits bestehenden Gefäße des Lungenparenchyms für ihr Wachstum nutzen. Sie könnten damit ohne einen „angiogenic switch“ einzuleiten und somit ohne oder nach einer nur sehr kurzen Latenzphase ihr Wachstum im Sekundärorgan initiieren. Sardari Nia *et al.* [2007] beschrieben auch ein intermediäres Wachstumsmuster in einigen Metastasen. Diese Metastasen könnten ein Gemisch aus bereits bestehenden und neu gebildeten Gefäßen nutzen und somit möglicherweise auch ein längeres DFS als solche besitzen, die ausschließlich auf vorhandene Gefäße zurückgreifen.

Eine weitere hinsichtlich des DFS mögliche Erklärung liefert die Wechselwirkung von PECAM1 auf Endothelzellen mit Leukozyten (Neutrophile, Monozyten). Diese Zellen binden an PECAM1, was ihre Migration durch die Gefäßwand und damit ihr Eindringen in das umliegende Gewebe erleichtert [Wakelin *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1993]. Da diese Zellen an der unspezifischen Immunantwort beteiligt sind, könnte dies die Abwehrreaktion des Körpers gegen das Wachstum der latenten Tumorzellen erhöhen. Je mehr Gefäße bzw. je mehr PECAM1-Moleküle in den Gefäßen vorhanden sind, desto stärker ist dieser Effekt und desto länger möglicherweise das DFS. Bei neu entstehenden Metastasen könnten die gebildeten Gefäße so möglicherweise zunächst einmal eine Immunantwort induzieren, bevor sie das Tumorwachstum begünstigen.

Tetraspanin 7 (TSPAN7)

TSPAN7 (TM4SF2, CD231) ist ein Vertreter der humanen Tetraspaninfamilie, die insgeamt 33 Mitglieder umfasst [Miranti, 2009]. Erstmals wurde TSPAN7 1995 als ein Oberflächenprotein mononukleärer Zellen des peripheren Bluts sowie humaner akuter myeloischer Leukämie- (T-Linie) und Neuroblastomzellen beschrieben [Takagi *et al.*, 1995]. Es ist ein Zelloberflächenglykoprotein mit vier Transmembrandomänen. *TSPAN7* wird in einer Vielzahl normaler humaner Gewebe wie Niere, Herz, Gehirn, Leber oder Pankreas exprimiert [Zemni *et al.*, 2000]. Es ist auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms lokalisiert (Xp11.4). Eine (X;2)-Translokation in diesem Bereich oder Mutationen des Gens sind wahrscheinlich ursächlich für eine Form der X-Chromosom-assoziierten mentalen Retardierung [Zemni *et al.*, 2000]. Es wurde vermutet, dass TSPAN7, wie andere Tetraspanine auch, mit β1-Integrin wechselwirkt. Fehlt diese Wechselwirkung, ist möglicherweise die Bildung von Dendriten und damit die Vernetzung von Nervenzellen beeinträchtigt [Zemni *et al.*, 2000]. Neben seiner Präsenz in Leukämie- und Neuroblastomzellen [Takagi *et al.*, 1995] wurde bisher keine Assoziation von TSPAN7 zur Genese oder Progression von Tumoren beschrieben. Allerdings sind mindestens sieben andere Mitglieder der Tetraspaninfamilie, wie CD82, an der

Tumorprogression beteiligt [Übersicht in Miranti, 2009; Bandyopadhyay *et al.*, 2006], was eine tumorrelevante Funktion weiterer Mitglieder nahelegt. In der Oncomine-Datenbank [2010] hinterlegte „Microarray"-Studien zeigten dementsprechend eine signifikant geringere *TSPAN7*-Expression in kzNZK, Blasen-, Brust-, Leber-, Lungen-, Magen-, Kolon- und Prostatakarzinomen sowie in Melanomen im Vergleich zu den jeweiligen nichtmalignen Geweben, was eine tumorsuppressive Funktion des entsprechenden Proteins nahelegt.

Tetraspanine bilden in der Zellmembran Komplexe miteinander und mit anderen Proteinen, das sog. Tetraspaninnetz. Diese Interaktionspartner, wie Integrine oder Wachstumsfaktorrezeptoren, sind häufig in die Zelladhäsion, -motilität, -invasion oder Angiogenese involviert und sind somit an der Metastasierung von Tumoren beteiligt. Inwiefern Tetraspanine die Funktion dieser Proteine beeinflussen, ist weitestgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TSPAN7-Proteinmenge immunhistochemisch untersucht. Diese Technik bietet auch die Möglichkeit, die zelluläre Lokalisation eines Proteins zu analysieren. Sowohl in den Tubulizellen der nichtmalignen Nierengewebe als auch in den Tumorzellen aller NZK-Subtypen und der Onkozytome war TSPAN7 nahezu ausschließlich im Zytoplama lokalisiert. Eine membranäre oder zumindest membranär betonte Färbung einiger Zellen wurde bevorzugt in Onkozytomen und nichtmalignen Nierengeweben beobachtet. Der Anteil der Proben mit mindestens einem TSPAN7-positiven Zellkompartiment in Tumor- bzw. Tubulizellen nahm dabei mit der Aggressivität des histologischen Subtyps ab. Nahezu alle Onkozytome als benigne Nierenläsionen zeigten wie auch die nichtmalignen Nierengewebe eine TSPAN7-Färbung, gefolgt von 50 % der papillären und 9 % der aggressiveren kzNZK [Beck *et al.*, 2004]. Dies lässt auf eine Suppressorfunktion von TSPAN7 in Tumorgenese und -progression schließen. Innerhalb der kzNZK war eine TSPAN7-Färbung allerdings nicht mit einer besseren Prognose oder günstigeren klinischen Parametern assoziiert. Außerdem wurde kein signifikanter Unterschied im Anteil TSPAN7-positiver Tumorzellen zwischen primären kzNZK und kzNZK-Metastasen beobachtet. Dies lässt insgesamt darauf schließen, dass das in Tumorzellen lokalisierte TSPAN7 keinen entscheidenden Beitrag zur Metastasierung von kzNZK leistet.

Die unerwartete bevorzugte zytoplasmatische Lokalisation des Membranproteins TSPAN7 könnte natürlich in einer unspezifischen Antikörperreaktion begründet liegen, zumal ein polyklonaler Antikörper verwendet wurde. Da der Antikörper im Western Blot kein Signal lieferte (nicht gezeigt), konnte seine TSPAN7-Spezifität nicht geklärt werden. Bisher existieren keine Publikationen zur TSPAN7-Färbung in Epithelzellen, die als Vergleichsdaten herangezogen werden könnten. Zum damaligen Zeitpunkt war der verwendete Anti-TSPAN7-Antikörper der einzige kommerziell verfügbare, so dass auch das Färbemuster nicht mit dem eines anderen Antikörpers verglichen werden konnte. Die erhaltene Färbung wurde aber mit der der im Internet zugänglichen Datenbank „Human Protein Atlas" verglichen [Ponten *et al.*, 2008]. Diese umfasst immunhistochemische Färbungen verschiedener Proteine an einer Vielzahl von Zelllinien, humanen Tumoren und Normalgeweben. Das TSPAN7-Färbemuster in nichtmalignen Nierengeweben war, mit einer etwas schwächeren Färbung, zu dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen vergleichbar. Die Tumorzellen aller in der Datenbank verfügbaren kzNZK (n = 10) waren TSPAN7-negativ. Das verfügbare chromophobe NZK zeigte eine schwache bis moderate zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen, ähnlich der der Onkozytome in der vorliegenden Arbeit. Die Färbung in dieser Datenbank wurde zwar

mit dem gleichen Antikörper erzeugt, so dass auch hieraus keine Rückschlüsse auf dessen Spezifität gezogen werden können. Aber zumindest können durch die ähnlichen Färbemuster Fehler in der Färbeprozedur ausgeschlossen werden. Auch andere potenziell tumorassoziierte Tetraspanine (z. B. CD82, CD151, TSPAN9) zeigen laut des „Human Protein Atlas“ [Ponten *et al.*, 2008] neben ihrer unterschiedlich stark ausgeprägten membranären Färbung eine zytoplasmatische. Diese Befunde lassen die beobachtete zytoplasmatische Färbung von TSPAN7 ebenfalls glaubhaft erscheinen. Dass diese nahezu ausschließliche zytoplasmatische Färbung von TSPAN7 von einer Aberration herrüht, ist unwahrscheinlich, da auch die Tubulizellen der nichtmalignen Nierengewebe eine zytoplasmatische TSPAN7-Färbung aufwiesen. Möglicherweise existieren verschiedene Isoformen dieses Proteins mit unterschiedlicher Lokalisation und Funktion. Für CD82 ist beispielsweise eine Isoform beschrieben worden, die durch eine alternative Spleißvariante (ΔExon7) kodiert wird und der im Vergleich zum Wildtypprotein eine extrazelluläre Domäne fehlt [Lee *et al.*, 2003].

Tetraspanine können auch in exozytotischen Vesikeln enthalten sein, die diese Proteine zur Zellmembran und zurück ins Zytoplasma transportieren, oder in Endosomen lokalisiert sein, die sie dem lysosomalen Abbau zuführen [Pols & Klumperman, 2009]. Auch diese Transportmechanismen könnten die zytosolische Lokalisation von TSPAN7 bedingen. Dies würde auch die granuläre Färbung in nichtmalignen Geweben und Onkozytomen erklären. Für das Tetraspanin CD63 wurde beispielsweise sogar eine vorwiegende zytoplasmatische Lokalisation beschrieben. Es ist Teil der Vesikelmembran und des Vesikelinnenraums [Übersicht in Pols & Klumperman, 2009]. Die in CD63 enthaltene und für seine Lokalisation in der Endosomen- und Lysosomenmembran verantwortliche Konsensussequenz (YXXØ; X = variabel, bevorzugt hydrophil; Ø = hydrophober sperriger Rest) [Bonifacino & Traub, 2003] ist auch in der TSPAN7-Sequenz zu finden (YEMV). Die Funktion des intrazellulären CD63 ist nicht geklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass es an dem Transport verschiedener Proteine zur Zellmembran beteiligt ist. So inhibiert es wahrscheinlich den Transport von CXCR4 zur Plasmamembran [Yoshida *et al.*, 2008] und bewirkt die lysosomale Degradation von MMP14 [Takino *et al.*, 2003]. CXCR4 ist ein Membranrezeptor, der durch Bindung seines Liganden die Invasivität und die gerichtete Metastasierung von z. B. kzNZK-Zellen begünstigt [Pan *et al.*, 2006]. MMP14 bewirkt als membrangebundene Matrixmetalloproteinase die Degradation der extrazellulären Matrix und ist somit an der Migration und Metastasierung von Tumorzellen beteiligt [Suojanen *et al.*, 2009]. Ähnliche Wechselwirkungen sind auch für TSPAN7 denkbar, welches somit eine Rolle in der Metastasierungssuppression von Tumoren spielen könnte. Ein geringer Anteil TSPAN7-positiver Zellen wäre damit mit einer schlechteren Prognose assoziiert, so wie es für die unterschiedlichen histologischen Subtypen beobachtet wurde.

Neben der seltenen TSPAN7-Präsenz in Tumorzellen wurde eine immunhistochemische TSPAN7-Färbung von Endothelzellen in 83 % der untersuchten primären kzNZK beobachtet. Eine solche TSPAN7-Färbung der Gefäße war auch für die kzNZK im „Human Protein Atlas“ zu beobachten [Ponten *et al.*, 2008]. Die häufigere und stärkere TSPAN7-Färbung der Endothel- im Vergleich zu den Tumorzellen legt nahe, dass die in den „Microarray“- und qPCR-Analysen erhaltenen Ergebnisse eher die *TSPAN7*-Expression der Endothelzellen widerspiegeln.

In den „Microarray“- bzw. TLDA-Analysen war die *TSPAN7*-Expression statistisch signifikant oder tendenziell höher in späten im Vergleich zu frühen Metastasen, in spät im Vergleich zu früh metastasierten primären kzNZK und in nicht metastasierten im Vergleich zu metastasierten Primärtumoren. Auch die Immunhistochemie ergab eine signifikant höhere Zahl TSPAN7-positiver Gefäße in spät im Vergleich zu früh entstandenen kzNZK-Metastasen (DFS > 24 *vs.* ≤ 24 Monate). Außerdem korrelierte die Zahl TSPAN7-positiver Gefäße in den Metastasen mit dem DFS, was auch hier auf eine funktionelle Rolle der TSPAN7-positiven Gefäße in der Dauer der Latenzphase hindeutet. Im Primärtumor war allerdings, im Gegensatz zu den Expressionsmessungen, kein signifikanter Unterschied der Zahl TSPAN7-positiver Gefäße in Abhängigkeit vom DFS zu beobachten. Auch hier scheint sich der Unterschied in der Zahl TSPAN7-positiver Gefäße also während des Metastasierungsprozesses selektiert zu haben. Die signifikant abnehmende Zahl TSPAN7-positiver Gefäße von nicht metastasierten über metastasierte primäre kzNZK zu kzNZK-Metastasen lässt weiterhin auf eine metastasierungssuppressive Rolle von TSPAN7 schließen. Die beobachtete Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der qPCR und der Immunhistochemie ist sicher vorrangig darauf zurückzuführen, dass zwar die Expressionsmessung, nicht aber die Immunhistochemie die Molekülzahl widerspiegelt.

Primäre kzNZK mit günstigen klinischen Parametern zeigten eine signifikant höhere Zahl TSPAN7-positiver Gefäße. Außerdem besaßen Patienten, in denen beide untersuchten Gewebestanzen TSPAN7-positive Gefäße aufwiesen, im Vergleich zu solchen mit nur einer oder keiner TSPAN7-gefäßpositiven Stanze ein signifikant längeres DFS, TSS und OS. Für das TSS war TSPAN7 sogar ein unabhängiger günstiger prognostischer Marker. Somit bestätigte die Validierung auf Proteinebene TSPAN7 als interessanten prognostischen Marker im kzNZK. Obwohl es kein unabhängiger prognostischer Marker für das DFS ist, ist es doch mit dem DFS assoziiert und somit ein sehr viel versprechender Kandidat für eine Markerkombination zur DFS-Vorhersage. Für spätere immunhistochemische Routineanalysen an kzNZK erscheint eine immunhistochemische TSPAN7-Färbung attraktiv, da es für die Überlebensanalysen nicht notwendig war, die TSPAN7-positiven Gefäße auszuzählen, sondern lediglich die Zahl der TSPAN7-gefäßpositiven Gewebestanzen zu bewerten. Vor der weiteren Validierung dieser Faktors sollte jedoch die Spezifität der Färbung mit einem unabhängigen Antikörper geprüft werden.

Wie lässt sich eine größere Zahl TSPAN7-positiver Gefäße nun funktionell mit einem geringeren Metastasierungsrisiko und einem längeren DFS in Verbindung bringen? In den Endothelzellen konnte eine genaue TSPAN7-Lokalisation nicht definiert werden; hier kann eine membranäre Färbung aber nicht ausgeschlossen werden, da das TSPAN7-Färbemuster ähnlich zu dem des Zelloberflächenproteins PECAM1 war. Zunächst einmal kann man davon ausgehen, dass TSPAN7 nicht selektiv in tumorassoziierten Gefäßen zu finden ist. Obwohl die genaue Zahl TSPAN7-positiver Gefäße aufgrund der überdeckenden tubulären Färbung in den nichtmalignen Geweben nicht ermittelt werden konnte, waren auch hier eindeutig TSPAN7-positive Gefäße vorhanden.

Eine membranäre TSPAN7-Lokalisation könnte einen ähnlichen Effekt haben wie die CD82-DARC-Wechselwirkung. Ein Membranprotein der Tumorzellen könnte mit TSPAN7 auf Endothelzellen wechselwirken, was im Primärtumor den Eintritt dieser Zellen in den Blutstrom bzw. im Blutstrom die Proliferation oder weitere Wanderung dieser Zellen ver-

hindern und somit die Metastasierung inhibieren kann. Eine solche Wechselwirkung im Sekundärorgan könnte ebenfalls die Proliferation und somit das Wachstum von Tumorzellen zu Makrometastasen unterdrücken. Je höher die Zahl TSPAN7-positiver Tumorgefäße, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine latente Tumorzelle ihr Wachstum nicht induzieren kann. Für eine zytoplasmatische Lokalisation in Endothelzellen ist ein ähnlicher Mechanismen denkbar. So könnte TSPAN7 beispielsweise den Transport von Oberflächenmolekülen zur Zellmembran verhindern, die wichtig wären, um mit Tumorzellen wechselzuwirken und somit deren Proliferation zu initiieren.

5.2.3 Zusammenfassende Bewertung und Ausblick

Die potenzielle prognostische Eignung der mutmaßlichen Metastasierungsuppressorgene *EDNRB*, *PECAM1* und *TSPAN7* wurde an einem großen Patientenkollektiv nachgewiesen. Alle drei Faktoren wurden ursprünglich in den „Microarray"-Analysen als differenziell exprimiert sowohl in spät *vs.* früh entwickelten Metastasen als auch in spät *vs.* früh metastasierten primären kzNZK identifiziert und wurden zudem in mindestens einer anderen „Microarray"-Studie als prognostisch relevant beschrieben. Dies untermauert den in der vorliegenden Arbeit gewählten Untersuchungsansatz.

Die Gene *EDNRB* und *PECAM1* sowie TSPAN7 wurden als unabhängige günstige prognostische Faktoren für das TSS identifiziert. Sie können somit potenziell die auf klinischen Parametern beruhenden TSS-Vorhersagemodelle, wie das UISS [Zisman *et al.*, 2001], verbessern. Obwohl sie nicht direkt zur Vorhersage von Metastasierungsrisiko und DFS geeignet sind, sind sie für eine klinische Anwendung hoch relevant. Mit ihrer Hilfe könnten beispielsweise Hochrisikopatienten mit einer sehr geringen Überlebenswahrscheinlichkeit identifiziert und mit speziell für solche Patienten zugelassenen Therapeutika, wie dem MTOR-Inhibitor Temsirolimus [Tong *et al.*, 2010], behandelt werden. Mit Hilfe solcher TSS-assoziierten Gene bzw. Proteine könnte man aber beispielsweise auch Patienten identifizieren, die selbst mit einem möglichen Tumorrezidiv lange überleben werden und denen eine nebenwirkungsreiche Therapie damit erspart werden könnte. Dies spielt insbesondere bei sehr alten Patienten eine Rolle, deren Lebensqualität durch eine solche Therapie erheblich abnehmen kann.

EDNRB war zudem ein unabhängiger prognostischer Marker für das DFS und könnte somit potenziell als molekularer Einzelmarker in Kombination mit klinischen Parametern zur Abschätzung des DFS und des Metastasierungsrisikos eingesetzt werden. Auch TSPAN7 war mit dem DFS assoziiert, stellte aber keinen unabhängigen Marker dar. Es könnte aber die prognostische Aussagekraft einer Kombination aus mehreren Genen potenziell verbessern. Da Tumoren und ihre Metastasierung multifaktoriell bedingt sind, ist anzunehmen, dass ein einzelner Marker nicht bei jedem Patienten eine genaue Vorhersage des DFS und des Metastasierungsrisikos erlaubt. Zudem wurde insbesondere für das kzNZK in bisherigen Analysen noch kein geeigneter prognostischer Einzelmarker identifiziert und auch die in den „Microarray"-Analysen der vorliegenden Arbeit beobachtete potenzielle prognostische Eignung vieler Gene wurde nur für drei dieser Gene in den Validierungsstudien belegt. Das deutet darauf hin, dass beim kzNZK ein prognostisch einsetzbarer Einzelmarker nicht existiert. Somit erscheint eine Kombination mehrerer molekularer Faktoren in einem Vorhersagemodell generell geeigneter für eine Anwendung in der Klinik als ein Einzelmarker. Die vorliegende Arbeit stellt mit den identifizierten prognoserelevanten Faktoren einen ersten Schritt zu

einem solchen Modell dar und liefert zudem weitere viel versprechende Kandidaten für zukünftige Arbeiten (z. B. *LDB2*, *RGS5*). Außerdem kommen die aus der Literatur bekannten prognoserelevanten Faktoren für solche Genkombinationen in Frage.

Die Expression der verschiedenen Gene könnte in folgenden Arbeiten an ein und demselben Kollektiv konsekutiver Patienten gemessen werden. Je nach prognostischer Relevanz der einzelnen Marker kann dann beispielsweise ein gewichtetes Mittel aller Expressionswerte berechnet werden. Dieser Mittelwert könnte in die bestehenden, auf klinischen Parametern beruhenden Nomogramme einbezogen werden, mit Hilfe derer man dann sehr genau das Rezidivrisiko des Patienten z. B. in halbjährlichem Abstand abschätzen könnte. Für routinemäßige Anwendungen wäre die Messung der Expression der einzelnen Gene in Form eines eigens dafür entwickelten TLDA-ähnlichen Formats oder eines „Arrays“ denkbar, wie er in Form des MammaPrint-Tests für das Mammakarzinom bereits existiert [Simon, 2007; van't Veer *et al.*, 2002].

Entsprechend des Testergebnisses könnte das Nachbeobachtungsregime der Patienten angepasst werden. Heute stellen sich NZK-Patienten in der Regel in den ersten zwei Jahren nach Nephrektomie vierteljährlich zur Nachuntersuchung vor, im dritten bis fünften Jahr nach Nephrektomie halbjährlich und danach jährlich. Eine bildgebende Untersuchung (Röntgen, Computertomographie) erfolgt in den ersten zwei Jahren halbjährlich, danach jährlich [Roigas, 2005]. Mit einer Individualisierung dieses Überwachungsregimes könnten Niedrigrisikopatienten unnötige strahlenbelastende Bildgebungen erspart werden, Hochrisikopatienten könnten frühzeitig einer wirksamen, eventuell auch adjuvanten, Therapie zugeführt werden. Damit könnte zum einen das DFS der Patienten und möglicherweise auch ihr Gesamtüberleben verlängert werden. Auch hinsichtlich einer kostengünstigeren medizinischen Versorgung spielt ein optimiertes Überwachungs- und Therapieregime eine wichtige Rolle.

Neben ihrer prognostischen Relevanz ist für EDNRB, PECAM1 und TSPAN7 auch eine funktionelle Rolle in der Regulation des DFS denkbar, die jedoch in *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen geprüft werden muss. Wird eine solche Funktion bestätigt, so sind die identifizierten Kandidaten auch als therapeutische Targets denkbar, die das DFS hinauszögern und das Wachstum manifester Metastasen im günstigsten Fall gänzlich unterdrücken können. Da alle drei Proteine die Tumorzelllatenz potenziell verlängern können, ist für solche therapeutischen Zwecke eine Erhöhung der Expression ihrer Gene nötig. Dies ist nur mit einer risikobehafteten Gentherapie möglich. Allerdings könnte man auch direkt die Proteine oder deren funktionell relevanten Domänen verabreichen, wie es beispielsweise für den antiangiogenen Faktor THBS1 bereits beschrieben wurde [Nabors *et al.*, 2010; Koskimaki *et al.*, 2009].

Während *EDNRB* bereits als unabhängiger Marker für das TSS beschrieben wurde, wird in dieser Arbeit erstmals seine Eignung als DFS-Marker gezeigt. PECAM1 wurde bisher lediglich als Marker der Mikrogefäßdichte auf Proteinebene untersucht, hatte dort allerdings keine von klinischen Parametern unabhängige prognostische Relevanz im kzNZK. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass die *PECAM1*-Genexpression potenziell zur Prognoseabschätung im kzNZK genutzt werden kann. Eine funktionelle oder prognostische Rolle von TSPAN7 im Tumorgeschehen ist bisher überhaupt noch nicht beschrieben. Somit trägt die vorliegenden Arbeit entscheidend zur Identifikation neuer prognostisch relevanter molekularer Marker im kzNZK bei.

6 Zusammenfassung

Einleitung und Zielstellung

Klarzellige Nierenzellkarzinome (kzNZK) weisen ein sehr hohes Metastasierungsrisiko auf. Zudem sind diese Tumoren durch unterschiedlich lange Latenzphasen der Tumorzellen im Sekundärorgan charakterisiert, die sich im krankheitsfreien Überleben (DFS) der Patienten widerspiegeln. Mit den derzeit zur Verfügung stehenden klinischen Parametern kann der Krankheitsverlauf der Patienten nur unzureichend vorhergesagt werden. Molekulare Faktoren stehen hierfür bisher nicht zur Verfügung. Durch eine genaue Vorhersage des Krankheitsverlaufs könnte das Nachsorge- und Therapieregime der Patienten optimiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollten daher anhand genomweiter Expressionsanalysen Gene identifiziert werden, deren Expressionshöhe eine Aussage hinsichtlich des Metastasierungsrisikos und insbesondere des DFS von kzNZK-Patienten erlaubt. Da bisherige „Microarray"-Analysen vorwiegend an primären kzNZK vorgenommen wurden und keine konsistenten Ergebnisse lieferten, wurde in dieser Arbeit mit der vergleichenden Betrachtung von Metastasen und Primärtumoren ein völlig neuer Ansatz zur Identifikation solcher Gene verfolgt. Die in den Metastasen deregulierten Gene könnten funktionell an deren Entstehung beteiligt sein, die in Primärtumoren deregulierten sind für prognostische Zwecke nutzbar.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Identifikation DFS-assoziierter Gene wurden zunächst die Expressionsmuster spät (n = 6; DFS $\geq$ 60 Monate) und früh (n = 5; DFS $\leq$ 9 Monate) entwickelter pulmonaler Metastasen verglichen. Hierbei wurden 306 differenziell exprimierte Gene identifiziert, wobei für viele bereits eine potentielle funktionelle Rolle in der Metastasierung oder der Tumorzelllatenz bekannt war. Anschließend wurde an Primärtumoren mit unterschiedlich langen DFS geprüft, welche dieser Gene bereits im Primärtumor in ihrer Expression deregulierter waren. In nicht (n = 7; Nachbeobachtungszeit $\geq$ 99 Monate) *vs.* spät (n = 9; DFS $\geq$ 45 Monate) *vs.* früh (n = 8; DFS $\leq$ 6 Monate) metastasierten primären kzNZK waren 356 Gene differenziell exprimiert, 166 von diesen zwischen spät und früh metastasierten Tumoren. Von den 306 in spät *vs.* früh entstandenen Metastasen differenziell exprimierten Genen waren tatsächlich 36 bereits in spät *vs.* früh metastasierten Primärtumoren differenziell exprimiert. Diese Gene stellen wahrscheinlich ein tumorintrinsisches Expressionsmuster dar, das bereits im Primärtumor programmiert ist und die Tumorzelllatenz und somit das DFS der Patienten vorherbestimmt. Interessanterweise war das Ausmaß der Expressionsänderung zwischen später und früher Metastasierung für viele dieser Gene in den Metastasen deutlich größer als in den Primärtumoren. Dies lässt vermuten, dass diese Expressionsunterschiede während des Metastasierungsprozesses selektiert wurden und deutet auf deren funktionelle Relevanz in der Metastasierung sowie der Initiierung und Aufrechterhaltung der Tumorzelllatenz hin.

Unerwartet war, dass 90 % der 356 in nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierten kzNZK differenziell exprimierten Gene eine kontinuierliche Deregulation ihrer mittleren Expression von nicht über spät zu früh metastasierten primären kzNZK oder eine vergleichbare Expressionshöhe

in nicht und spät metastasierten Tumoren zeigten. Dieser Befund deutet darauf hin, dass spät metastasierte kzNZK einen Übergangszustand zwischen nicht und früh metastasierten Tumoren darstellen. Somit sind auch klinisch nicht metastasierte Tumoren möglicherweise biologisch metastasiert. Das heißt, die von ihnen abgesiedelten Tumorzellen verbleiben möglicherweise einfach sehr lange in einem latenten Zustand und sind somit für das Lebensende des Patienten nicht relevant.

Weiterhin sollten gezielt solche Gene gefunden werden, anhand derer Patienten identifiziert werden können, die in ihrem Krankheitsverlauf keine manifesten Metastasen entwickeln werden. Solchen Patienten könnte eine belastende Nachbeobachtungsprozedur von vornherein erspart werden. Zwischen primären kzNZK von Patienten, die im Krankheitsverlauf keine Metastasen bildeten (n = 7) und solchen, die initial oder später Metastasen entwickelten (n = 17), waren 128 Gene differenziell exprimiert. Der überwiegende Teil dieser Gene (77 %) war bereits in den 356 in nicht *vs.* spät *vs.* früh metastasierten kzNZK differenziell exprimierten Genen enthalten.

Aus den in den „Microarray"-Analysen identifizierten Genen wurden anhand des Vergleichs mit Literaturdaten und unter Einbeziehung funktioneller Aspekte geeignete Gene ausgewählt, deren differenzielle Expression mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) an einem erweiterten Patientenkollektiv aus 52 primären kzNZK geprüft wurde. Im Unterschied zu den „Microarray"-Analysen wurden hier weniger strenge DFS-Grenzen angewendet (DFS $>$ 24 *vs.* $\leq$ 24 Monate), um die klinische Situation besser abzubilden. Eine differenzielle Expression in spät *vs.* früh metastasierten bzw. nicht metastasierten *vs.* metastasierten primären kzNZK wurde für 11 der ausgewählten 18 Gene (61 %) bestätigt.

In weiterführenden Untersuchungen wurde die Assoziation zu klinischen Parametern und das prognostische Potenzial der Gene *CA4*, *DKK3*, *EDNRB*, *PECAM1*, *TIMP3* und *TSPAN7* an einem großen Patientenkollektiv geprüft. Diese Gene wurden basierend auf ihrem signifikanten oder tendenziellen Expressionsunterschied in spät *vs.* früh und/oder in nicht metastasierten *vs.* metastasierten kzNZK sowie ihrer bekannten oder mutmaßlichen Rolle in der Metastasierung ausgewählt. Zudem wiesen diese Gene (außer *CA4*, *DKK3*) eine kontinuierlich deregulierte Expression von nicht über spät zu früh metastasierten primären kzNZK auf und waren somit potenziell zur Unterscheidung aller drei Primärtumorgruppen geeignet. Die Expression der Gene *CA4*, *DKK3*, *EDNRB*, *PECAM1* und *TIMP3* wurde mittels qPCR an 86 primären kzNZK untersucht, TSPAN7 immunhistochemisch auf Proteinebene an 106 primären kzNZK. Sowohl *EDNRB* als auch *PECAM1* waren signifikant oder tendenziell höher exprimiert in Tumoren mit günstigen klinischen Parametern (geringes klinisches Tumorstadium TNMI/II, geringer Tumorgrad G1/2, keine Veneninvasion V0, keine initialen Metastasen N0/M0) im Vergleich zu solchen mit ungünstigen klinischen Parametern (TNMIII/IV, G3, V1, N+/M1). In der immunhistochemischen Analyse an „tissue microarrays" war TSPAN7 vorwiegend in den Gefäßen der primären kzNZK nachweisbar. Eine signifikant höhere Zahl TSPAN7-positiver Gefäße war ebenfalls in Tumoren mit günstigen klinischen Parametern zu verzeichnen (geringe lokale Tumorausdehnung pT1/2, TNMI/II, N0). Überlebensanalysen zeigten weiterhin ein signifikant längeres DFS für Patienten mit einer hohen im Vergleich zu solchen mit einer geringen *EDNRB*-Expression. Auch Patienten, die in beiden untersuchten Gewebestanzen der „tissue microarrays" TSPAN7-positive Gefäße aufwiesen, besaßen ein signifikant längeres DFS als Patienten mit nur einer oder keiner TSPAN7-gefäßpositiven

Stanze. Für Patienten mit einer hohen *CA4*-, *EDNRB*- bzw. *PECAM1*-Expression oder mit zwei im Vergleich zu keiner oder einer TSPAN7-gefäßpositiven Gewebestanze war zudem ein signifikant längeres tumorspezifisches Überleben (TSS) zu verzeichnen. Mit Hilfe multivariater Cox-Regressionsanalysen wurde ein zu klinischen Parametern zusätzlicher Einfluss auf das DFS für *EDNRB* {„hazard ratio" (HR) = 14,7 bzw. 4,0} und auf das TSS für *EDNRB* (HR = 6,6), *PECAM1* (HR = 9,6) und TSPAN7 (HR = 7,9) nachgewiesen. Aufgrund ihres unabhängigen Einflusses auf das DFS bzw. TSS der Patienten sind diese molekularen Faktoren geeignet, um die Aussagekraft der bestehenden und ausschließlich auf klinischen Parametern basierenden DFS- bzw. TSS-Vorhersagemodelle zu verbessern.

Für eine Abschätzung des DFS und des Metastasierungsrisikos, wie sie in der Zielstellung dieser Arbeit gefordert war, erscheint somit *EDNRB* geeignet. *PECAM1* und TSPAN7 mit ihrem unabhängigen Einfluss auf das TSS sind nicht notwendigerweise für solche Prognosen geeignet. Ein kzNZK-bedingter Tod, den das TSS repräsentiert, wird zwar hauptsächlich durch manifeste Metastasen bedingt. In die TSS-Analysen werden aber auch Patienten mit initialen Metastasen einbezogen, deren Metastasierung nicht mehr vorhergesagt werden muss. Dennoch ist die Vorhersage des TSS klinisch sehr relevant, um Hochrisikopatienten mit einer geringen tumorspezifischen Lebenserwartung zu identifizieren, für die spezifische Therapieoptionen zur Verfügung stehen.

Bisher war weder die *PECAM1*-Genexpression als unabhängiger prognostischer Marker für das TSS noch die *EDNRB*-Genexpression als DFS-Marker im kzNZK bekannt. Eine Assoziation von TSPAN7 zu Tumorgenese oder -progression wurde bisher überhaupt nicht beschrieben. Somit leistet die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Identifikation neuer, viel versprechender molekularer Faktoren zur Prognoseabschätzung von kzNZK-Patienten.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die drei in den Validierungsstudien als unabhängige prognostische Faktoren identifizierten Gene *EDNRB*, *PECAM1* und *TSPAN7* waren in den „Microarray"-Analysen sowohl in den Metastasen- als auch in den Primärtumorsubgruppen differenziell exprimiert. Der gewählte Ansatz der Metastasen- und Primärtumoranalyse ist somit geeignet, um prognostische Marker im kzNZK zu identifizieren. Die Ergebnisse legen nahe, dass die prognostisch relevanten Faktoren EDNRB, PECAM1 und TSPAN7 eine metastasierungssuppressive und die Tumorzelllatenz induzierende Rolle im kzNZK spielen. Für alle Faktoren ist anhand der in der Literatur beschriebenen funktionellen Daten eine solche Funktion denkbar, muss aber in jedem Fall in zukünftigen *in vitro*- und *in vivo*-Analysen geprüft werden. Da Tumoren und deren Metastasierung multifaktoriell bedingte Erkrankungen darstellen, ist für eine routinemäßige Prognoseabschätzung eine Kombination mehrerer molekularer Faktoren viel versprechender als die Verwendung eines spezifischen Einzelmarkers. In folgenden Arbeiten sollte dies durch Einbeziehung weiterer Gene an einem konsekutiven Patientenkollektiv geprüft werden. Hierfür legt die vorliegende Arbeit mit den drei identifizierten und nachweislich prognostisch relevanten sowie vielen weiteren bisher hinsichtlich ihres prognostischen Potenzials noch nicht validierten Genen, einen wichtigen Grundstein.

Literaturverzeichnis

Affymetrix. GeneChip expression analysis - data analysis fundamentals, 2004.

Aguirre-Ghiso J. A., Kovalski K., Ossowski L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J. Cell Biol.*, 147:89–104, 1999.

Aguirre-Ghiso J. A., Liu D., Mignatti A., Kovalski K., Ossowski L. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol. Biol. Cell*, 12:863–879, 2001.

Aguirre-Ghiso J. A., Estrada Y., Liu D., Ossowski L. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res.*, 63:1684–1695, 2003.

Almog N., Henke V., Flores L., Hlatky L., Kung A. L., Wright R. D., Berger R., Hutchinson L., Naumov G. N., Bender E., Akslen L. A., Achilles E. G., Folkman J. Prolonged dormancy of human liposarcoma is associated with impaired tumor angiogenesis. *FASEB J.*, 20:947–949, 2006.

Almog N., Ma L., Raychowdhury R., Schwager C., Erber R., Short S., Hlatky L., Vajkoczy P., Huber P. E., Folkman J., Abdollahi A. Transcriptional switch of dormant tumors to fast-growing angiogenic phenotype. *Cancer Res.*, 69:836–844, 2009.

Altman D. G. Practical statistics for medical research. *Chapman & Hall/CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.*, 1. überarbeitete Auflage, 1999.

Applied Biosystems. Taq Man Array Micro Fluidic Cards, 2009.

Ashburner M., Ball C. A., Blake J. A., Botstein D., Butler H., Cherry J. M., Davis A. P., Dolinski K., Dwight S. S., Eppig J. T., Harris M. A., Hill D. P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J. C., Richardson J. E., Ringwald M., Rubin G. M., Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.*, 25:25–29, 2000.

Bagnato A., Salani D., Di Castro V., Wu-Wong J. R., Tecce R., Nicotra M. R., Venuti A., Natali P. G. Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res.*, 59:720–727, 1999.

Baldewijns M. M., Thijssen V. L., Van denEynden G. G., Van Laere S. J., Bluekens A. M., Roskams T., vanPoppel H., De Bruine A. P., Griffioen A. W., Vermeulen P. B. High-grade clear cell renal cell carcinoma has a higher angiogenic activity than low-grade renal cell carcinoma based on histomorphological quantification and qRT-PCR mRNA expression profile. *Br. J. Cancer*, 96:1888–1895, 2007.

Baldi P., Long A. D. A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics*, 17:509–519, 2001.

Bandyopadhyay S., Zhan R., Chaudhuri A., Watabe M., Pai S. K., Hirota S., Hosobe S., Tsukada T., Miura K., Takano Y., Saito K., Pauza M. E., Hayashi S., Wang Y., Mohinta S., Mashimo T., Iiizumi M., Furuta E., Watabe K. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat. Med.*, 12:933–938, 2006.

Batzler W. U., Giersiepen K., Hentschel S., Husmann H., Kaatsch P., Katalinic A., Kieschke J., Kraywinkel K., Meyer M., Stabenow R., Stegmaier C., Bertz J., Haberland J., Wolf U. Krebs in Deutschland 2003 - 2004. Häufigkeiten und Trends. *Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.*, Berlin, Lübeck, 6. überarbeitete Auflage, 2004.

Beck S. D., Patel M. I., Snyder M. E., Kattan M. W., Motzer R. J., Reuter V. E., Russo P. Effect of papillary and chromophobe cell type on disease-free survival after nephrectomy for renal cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*, 11:71–77, 2004.

Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57:289–300, 1995.

Benjamini Y., Drai D., Elmer G., Kafkafi N., Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.*, 125:279–284, 2001.

Bhargava S., Stummeyer T., Hotz B., Hines O. J., Reber H. A., Buhr H. J., Hotz H. G. Selective inhibition of endothelin receptor A as an anti-angiogenic and anti-proliferative strategy for human pancreatic cancer. *J. Gastrointest. Surg.*, 9:703–709, 2005.

Bissig H., Richter J., Desper R., Meier V., Schraml P., Schaffer A. A., Sauter G., Mihatsch M. J., Moch H. Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Am. J. Pathol.*, 155:267–274, 1999.

Black W. C., Welch H. G. Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy. *N. Engl. J. Med.*, 328:1237–1243, 1993.

Blalock E. M. Experimental design and data analysis. *In:* A beginner´s guide to microarrays, Hrsg. E. M. Blalock, *Kluwer Academic Publishers, Boston, New York, Dordrecht, London*, 1. Auflage, S. 179-241, 2003.

Bluemke K., Bilkenroth U., Meye A., Fuessel S., Lautenschlaeger C., Goebel S., Melchior A., Heynemann H., Fornara P., Taubert H. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma correlates with prognosis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 18:2190–2194, 2009.

Boer J. M., Huber W. K., Sultmann H., Wilmer F., vonHeydebreck A., Haas S., Korn B., Gunawan B., Vente A., Fuzesi L., Vingron M., Poustka A. Identification and classification of differentially expressed genes in renal cell carcinoma by expression profiling on a global human 31,500-element cDNA array. *Genome Res.*, 11:1861–1870, 2001.

Bolstad B. M., Irizarry R. A., Astrand M., Speed T. P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19:185–193, 2003.

Bonifacino J. S., Traub L. M. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 72:395–447, 2003.

Bratslavsky G., Sudarshan S., Neckers L., Linehan W. M. Pseudohypoxic pathways in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 13:4667–4671, 2007.

Buchner A., Riesenberg R., Kotter I., Hofstetter A., Stief C., Oberneder R. Frequency and prognostic relevance of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*, 106:1514–1520, 2006.

Buchner A., Castro M., Hennig A., Assmann G., Stief C.-G., Zimmermann W. Identifikation deregulierter Pathways beim metastasierten Nierenzellkarzinom mittels Gene Set Enrichment Analysis. Posterpräsentation, *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Urologie*, 2009.

Bui M. H., Seligson D., Han K. R., Pantuck A. J., Dorey F. J., Huang Y., Horvath S., Leibovich B. C., Chopra S., Liao S. Y., Stanbridge E., Lerman M. I., Palotie A., Figlin R. A., Belldegrun A. S. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin. Cancer Res.*, 9:802–811, 2003.

Bui M. H., Visapaa H., Seligson D., Kim H., Han K. R., Huang Y., Horvath S., Stanbridge E. J., Palotie A., Figlin R. A., Belldegrun A. S. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and KI67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *J. Urol.*, 171:2461–2466, 2004.

Buyse M., Loi S., van'tVeer L., Viale G., Delorenzi M., Glas A. M., d'Assignies M. S., Bergh J., Lidereau R., Ellis P., Harris A., Bogaerts J., Therasse P., Floore A., Amakrane M., Piette F., Rutgers E., Sotiriou C., Cardoso F., Piccart M. J. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 98:1183–1192, 2006.

Byun S. S., Yeo W. G., Lee S. E., Lee E. Expression of survivin in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome. *Urology*, 69:34–37, 2007.

Chiang A. C., Massague J. Molecular basis of metastasis. *N. Engl. J. Med.*, 359:2814–2823, 2008.

Cho N. H., Shim H. S., Rha S. Y., Kang S. H., Hong S. H., Choi Y. D., Hong S. J., Cho S. H. Increased expression of matrix metalloproteinase 9 correlates with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Eur. Urol.*, 44:560–566, 2003.

Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature*, 441:444–450, 2006.

Cindolo L., Patard J. J., Chiodini P., Schips L., Ficarra V., Tostain J., deLa Taille A., Altieri V., Lobel B., Zigeuner R. E., Artibani W., Guille F., Abbou C. C., Salzano L., Gallo C. Comparison of predictive accuracy of four prognostic models for nonmetastatic renal cell carcinoma after nephrectomy: a multicenter European study. *Cancer*, 104:1362–1371, 2005.

Clark E. A., Golub T. R., Lander E. S., Hynes R. O. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, 406:532–535, 2000.

Coller H. A., Grandori C., Tamayo P., Colbert T., Lander E. S., Eisenman R. N., Golub T. R. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:3260–3265, 2000.

Condeelis J., Pollard J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*, 124:263–266, 2006.

Coukos G., Makrigiannakis A., Amin K., Albelda S. M., Coutifaris C. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 is expressed by a subpopulation of human trophoblasts: a possible mechanism for trophoblast-

endothelial interaction during haemochorial placentation. *Mol. Hum. Reprod.*, 4:357–367, 1998.

Cui X., Churchill G. A. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol.*, 4:210, 2003.

De Jesus S. M. N., Correa L. A., Trindade Filho J. C. S. Surgical treatment of metachronous metastases in different organs following radical nephrectomy. *Int. Braz. J. Urol.*, 29:238–40, 2003.

Demicheli R., Biganzoli E., Boracchi P., Greco M., Retsky M. W. Recurrence dynamics does not depend on the recurrence site. *Breast Cancer Res.*, 10:R83, 2008.

Deutsche Gesellschaft für Urologie. Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des Nierenparenchymkarzinoms. *Urologe A*, 37:327–341, 1998.

Doms A., Schroeder M. GoPubMed: exploring PubMed with the Gene Ontology. *Nucleic Acids Res.*, 33: W783–786, 2005.

Driouch K., Landemaine T., Sin S., Wang S., Lidereau R. Gene arrays for diagnosis, prognosis and treatment of breast cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*, 24:575–85, 2007.

Dudoit S., Shaffer J. P., Boldrick J. C. Multiple hypothesis testing in microarray experiments. *University of California, Berkeley (USA), Division of Biostatistics Working Paper Series*, Working Paper 110, 2002.

Eichelberg C., Heuer R., Zacharias M., Heinzer H. Perioperative Risikostratifizierung beim Nierenzellkarzinom. *Onkologe*, 14:1071–1076, 2008.

Eichelberg C., Junker K., Ljungberg B., Moch H. Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. *Eur. Urol.*, 55: 851–863, 2009.

Eltze E., Bertolin M., Korsching E., Wulfing P., Maggino T., Lelle R. Expression and prognostic relevance of endothelin-B receptor in vulvar cancer. *Oncol. Rep.*, 18:305–311, 2007.

Enquist E., Zambrano N., Zbar B., Linehan W. M., M. Walther M. Molecular genetics of renal cell carcinoma. *In:* Renal cell carinoma. Molecular biology, immunology, and clinical management, Hrsg. R. M. Bukowski, A. C. Novick, *Humana Press, Totowa, New Jersey*, 1. Auflage, S. 79-92, 2000.

Frank I., Blute M. L., Leibovich B. C., Cheville J. C., Lohse C. M., Zincke H. Independent validation of the 2002 American Joint Committee on cancer primary tumor classification for renal cell carcinoma using a large, single institution cohort. *J. Urol.*, 173:1889–1892, 2005.

Froehner M., Manseck A., Lossnitzer A., Wirth M. P. Late local and pulmonary recurrence of renal cell carcinoma. *Urol. Int.*, 60:248–50, 1998.

Fuhrman S. A., Lasky L. C., Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.*, 6:655–663, 1982.

Fukata S., Inoue K., Kamada M., Kawada C., Furihata M., Ohtsuki Y., Shuin T. Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ-specific metastasis of renal cell carcinoma. *Cancer*, 103:931–942, 2005.

Golub T. R., Slonim D. K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J. P., Coller H., Loh M. L., Downing J. R., Caligiuri M. A., Bloomfield C. D., Lander E. S. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286:531–537, 1999.

Goodison S., Kawai K., Hihara J., Jiang P., Yang M., Urquidi V., Hoffman R. M., Tarin D. Prolonged dormancy and site-specific growth potential of cancer cells spontaneously disseminated from nonmetastatic breast tumors as revealed by labeling with green fluorescent protein. *Clin. Cancer Res.*, 9:3808–3814, 2003.

Gould J., Getz G., Monti S., Reich M., Mesirov J. P. Comparative gene marker selection suite. *Bioinformatics*, 22:1924–1925, 2006.

Grabmaier K., A deWeijert M. C., Verhaegh G. W., Schalken J. A., Oosterwijk E. Strict regulation of CAIX(G250/MN) by HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*, 23:5624–5631, 2004.

Gudbjartsson T., Hardarson S., Petursdottir V., Thoroddsen A., Magnusson J., Einarsson G. V. Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: a retrospective nation-wide study of 629 patients. *Eur. Urol.*, 48:593–600, 2005.

Gunawan B., Huber W., Holtrup M., vonHeydebreck A., Efferth T., Poustka A., Ringert R. H., Jakse G., Fuzesi L. Prognostic impacts of cytogenetic findings in clear cell renal cell carcinoma: gain of 5q31-qter predicts a distinct clinical phenotype with favorable prognosis. *Cancer Res.*, 61:7731–7738, 2001.

Gupta G. P., Perk J., Acharyya S., deCandia P., Mittal V., Todorova-Manova K., Gerald W. L., Brogi E., Benezra R., Massague J. ID genes mediate tumor reinitiation during breast cancer lung metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104:19506–19511, 2007.

Gupta G. P., Nguyen D. X., Chiang A. C., Bos P. D., Kim J. Y., Nadal C., Gomis R. R., Manova-Todorova K., Massague J. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*, 446:765–770, 2007a.

Guruli G., Pflug B. R., Pecher S., Makarenkova V., Shurin M. R., Nelson J. B. Function and survival of dendritic cells depend on endothelin-1 and endothelin receptor autocrine loops. *Blood*, 104:2107–2115, 2004.

Gustafsson A., Martuszewska D., Johansson M., Ekman C., Hafizi S., Ljungberg B., Dahlback B. Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival. *Clin. Cancer Res.*, 15:4742–4749, 2009.

Hagemann T., Gunawan B., Schulz M., Fuzesi L., Binder C. mRNA expression of matrix metalloproteases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas. *Eur. J. Cancer*, 37:1839–1846, 2001.

Han K. R., Bui M. H., Pantuck A. J., Freitas D. G., Leibovich B. C., Dorey F. J., Zisman A., Janzen N. K., Mukouyama H., Figlin R. A., Belldegrun A. S. TNM T3a renal cell carcinoma: adrenal gland involvement is not the same as renal fat invasion. *J. Urol.*, 169:899–903, 2003.

Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57–70, 2000.

Helczynska K., Kronblad A., Jogi A., Nilsson E., Beckman S., Landberg G., Pahlman S. Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer Res.*, 63:1441–1444, 2003.

Hemmerlein B., Kugler A., Ozisik R., Ringert R. H., Radzun H. J., Thelen P. Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinomas. *Virchows Arch.*, 439:645–652, 2001.

Herbst C., Kosmehl H., Stiller K. J., Berndt A., Eiselt M., Schubert J., Katenkamp D. Evaluation of microvessel density by computerised image analysis in human renal cell carcinoma. Correlation to pT category, nuclear grade, proliferative activity and occurrence of metastasis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 124:141–147, 1998.

Herrmann E., Eltze E., Bierer S., Bogemann M., Brinkmann O. A., Balnowair H., Hertle L., Wulfing C. Expression of the Endothelin-axis in the different histologic subtypes of renal cell carcinoma: a tissue microarray analysis. *Oncol. Rep.*, 17:275–280, 2007.

Hicklin D. J., Ellis L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.*, 23:1011–1027, 2005.

Higgins J. P., Shinghal R., Gill H., Reese J. H., Terris M., Cohen R. J., Fero M., Pollack J. R., van deRijn M., Brooks J. D. Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray. *Am. J. Pathol.*, 162:925–932, 2003.

Hülsken J. Therapies against metastasis are essential for successful cancer treatment. http://www.nccr-oncology.ch/scripts/index.aspx?idd=93, aktualisiert am 03.03.2010.

Hoffmann N. E., Sheinin Y., Lohse C. M., Parker A. S., Leibovich B. C., Jiang Z., Kwon E. D. External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker for metastatic progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*, 112:1471–1479, 2008.

Horgan G. False discovery rates. http://www.rowett.ac.uk/ gwh/fdr.html, Stand 13.07.2010.

Hosack D. A., Dennis G., Sherman B. T., Lane H. C., Lempicki R. A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol.*, 4:R70, 2003.

Huang D. W., Sherman B. T., Tan Q., Kir J., Liu D., Bryant D., Guo Y., Stephens R., Baseler M. W., Lane H. C., Lempicki R. A. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res.*, 35:W169–175, 2007.

Huang Z., Bao S. D. Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J. Gastroenterol.*, 10:463–470, 2004.

Im J. H., Fu W., Wang H., Bhatia S. K., Hammer D. A., Kowalska M. A., Muschel R. J. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res.*, 64:8613–8619, 2004.

Imao T., Egawa M., Takashima H., Koshida K., Namiki M. Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *Int. J. Urol.*, 11:948–953, 2004.

Irizarry R. A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Barclay Y. D., Antonellis K. J., Scherf U., Speed T. P. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4:249–264, 2003.

Irizarry R. A., Bolstad B. M., Collin F., Cope L. M., Hobbs B., Speed T. P. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.*, 31:e15, 2003a.

James N. D., Caty A., Borre M., Zonnenberg B. A., Beuzeboc P., Morris T., Phung D., Dawson N. A. Safety and efficacy of the specific endothelin-A receptor antagonist ZD4054 in patients with hormone-resistant prostate cancer and bone metastases who were pain free or mildly symptomatic: a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 2 trial. *Eur. Urol.*, 55:1112–1123, 2009.

Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Thun M. J. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.*, 59: 225–249, 2009.

Jögi A., Ora I., Nilsson H., Lindeheim A., Makino Y., Poellinger L., Axelson H., Pahlman S. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:7021–7026, 2002.

Johnson W. E., Li C., Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*, 8:118–127, 2007.

Jones J., Otu H., Spentzos D., Kolia S., Inan M., Beecken W. D., Fellbaum C., Gu X., Joseph M., Pantuck A. J., Jonas D., Libermann T. A. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11:5730–5739, 2005.

Joyce J. A., Pollard J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 9:239–252, 2009.

Jung M., Ramankulov A., Roigas J., Johannsen M., Ringsdorf M., Kristiansen G., Jung K. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol. Biol.*, 8:47, 2007.

Junker K., Weirich G., Amin M. B., Moravek P., Hindermann W., Schubert J. Genetic subtyping of renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Recent Results Cancer Res.*, 162:169–175, 2003.

Junker K., Sanger J., Schmidt A., Hindermann W., Presselt N., Helfritzsch H., Schubert J. Genetic characterization of lung metastases in renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.*, 10:1035–1038, 2003a.

Kadota K., Huang C. L., Liu D., Ueno M., Kushida Y., Haba R., Yokomise H. The clinical significance of lymphangiogenesis and angiogenesis in non-small cell lung cancer patients. *Eur. J. Cancer*, 44:1057–1067, 2008.

Kaplan R. N., Riba R. D., Zacharoulis S., Bramley A. H., Vincent L., Costa C., MacDonald D. D., Jin D. K., Shido K., Kerns S. A., Zhu Z., Hicklin D., Wu Y., Port J. L., Altorki N., Port E. R., Ruggero D., Shmelkov S. V., Jensen K. K., Rafii S., Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438:820–827, 2005.

Karrison T. G., Ferguson D. J., Meier P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 91:80–85, 1999.

Köhler W., Schachtel G., Voleske P. Biostatistik. Einführung in die Biometrie für Biologen und Agrarwissenschaftler. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York*, 2. aktualisierte und erweiterte Auflage, 1995.

Kienast Y., vonBaumgarten L., Fuhrmann M., Klinkert W. E., Goldbrunner R., Herms J., Winkler F. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat. Med.*, 16:116–122, 2010.

Kim H. L., Seligson D., Liu X., Janzen N., Bui M. H., Yu H., Shi T., Figlin R. A., Horvath S., Belldegrun A. S. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 10: 5464–5471, 2004.

Kim H. N., Choi D. W., Lee K. T., Lee J. K., Heo J. S., Choi S. H., Paik S. W., Rhee J. C., Lowe A. W. Gene expression profiling in lymph node-positive and lymph node-negative pancreatic cancer. *Pancreas*, 34:325–334, 2007.

Kim W. Y., Kaelin W. G. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J. Clin. Oncol.*, 22:4991–5004, 2004.

Kitchen R. R., Sabine V. S., Sims A. H., Macaskill E. J., Renshaw L., Thomas J. S., vanHemert J. I., Dixon J. M., Bartlett J. M. Correcting for intra-experiment variation in Illumina BeadChip data is necessary to generate robust gene-expression profiles. *BMC Genomics*, 11:134, 2010.

Kluger H. M., Chelouche Lev D., Kluger Y., McCarthy M. M., Kiriakova G., Camp R. L., Rimm D. L., Price J. E. Using a xenograft model of human breast cancer metastasis to find genes associated with clinically aggressive disease. *Cancer Res.*, 65:5578–5587, 2005.

Knight L. J., Burrage J., Bujac S. R., Haggerty C., Graham A., Gibson N. J., Ellison G., Growcott J. W., Brooks A. N., Hughes A. M., Xinarianos G., Nikolaidis G., Field J. K., Liloglou T. Epigenetic silencing of the endothelin-B receptor gene in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.*, 34:465–471, 2009.

Kosari F., Parker A. S., Kube D. M., Lohse C. M., Leibovich B. C., Blute M. L., Cheville J. C., Vasmatzis G. Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor

aggressiveness. *Clin. Cancer Res.*, 11:5128–5139, 2005.

Koskimaki J. E., Karagiannis E. D., Rosca E. V., Vesuna F., Winnard Jr. P. T., Raman V., Bhujwalla Z. M., Popel A. S. Peptides derived from type IV collagen, CXC chemokines, and thrombospondin-1 domain-containing proteins inhibit neovascularization and suppress tumor growth in MDA-MB-231 breast cancer xenografts. *Neoplasia*, 11(12):1285–1291, 2009.

Kramer B. A., Gao X., Davis M., Hall M., Holzbeierlein J., Tawfik O. Prognostic significance of ploidy, MIB-1 proliferation marker, and p53 in renal cell carcinoma. *J. Am. Coll. Surg.*, 201:565–570, 2005.

Krtolica A., Parrinello S., Lockett S., Desprez P. Y., Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:12072–12077, 2001.

Kuc R., Davenport A. P. Comparison of endothelin-A and endothelin-B receptor distribution visualized by radioligand binding versus immunocytochemical localization using subtype selective antisera. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 44 Suppl 1:S224–226, 2004.

Kumar S., Millis A. J., Baglioni C. Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:4683–4687, 1992.

Kurose K., Sakaguchi M., Nasu Y., Ebara S., Kaku H., Kariyama R., Arao Y., Miyazaki M., Tsushima T., Namba M., Kumon H., Huh N. H. Decreased expression of REIC/Dkk-3 in human renal clear cell carcinoma. *J. Urol.*, 171:1314–1318, 2004.

Kutzner H. Gefäßtumoren. *In:* Dermatologie und Venerologie, Hrsg. O. Braun-Falco, G. Plewig, H. H. Wolff, W. H. C. Burgdorf, M. Landthaler, *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg*, 5. Auflage, S. 1350-1360, 2005.

Lahav R., Heffner G., Patterson P. H. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:11496–11500, 1999.

Lahav R., Suva M. L., Rimoldi D., Patterson P. H., Stamenkovic I. Endothelin receptor B inhibition triggers apoptosis and enhances angiogenesis in melanomas. *Cancer Res.*, 64:8945–8953, 2004.

Lalich M., McNeel D. G., Wilding G., Liu G. Endothelin receptor antagonists in cancer therapy. *Cancer Invest.*, 25:785–794, 2007.

Lam J. S., Shvarts O., Said J. W., Pantuck A. J., Seligson D. B., Aldridge M. E., Bui M. H., Liu X., Horvath S., Figlin R. A., Belldegrun A. S. Clinicopathologic and molecular correlations of necrosis in the primary tumor of patients with renal cell carcinoma. *Cancer*, 103:2517–2525, 2005.

Landemaine T., Jackson A., Bellahcene A., Rucci N., Sin S., Abad B. M., Sierra A., Boudinet A., Guinebretiere J. M., Ricevuto E., Nogues C., Briffod M., Bieche I., Cherel P., Garcia T., Castronovo V., Teti A., Lidereau R., Driouch K. A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis. *Cancer Res.*, 68: 6092–6099, 2008.

Lane B. R., Li J., Zhou M., Babineau D., Faber P., Novick A. C., Williams B. R. Differential expression in clear cell renal cell carcinoma identified by gene expression profiling. *J. Urol.*, 181:849–860, 2009.

Larue L., Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*, 24:7443–7454, 2005.

Lee J. H., Seo Y. W., Park S. R., Kim Y. J., Kim K. K. Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res.*, 63:7247–7255, 2003.

Leibovich B. C., Blute M. L., Cheville J. C., Lohse C. M., Frank I., Kwon E. D., Weaver A. L., Parker A. S., Zincke H. Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer*, 97:1663–1671, 2003.

Lenburg M. E., Liou L. S., Gerry N. P., Frampton G. M., Cohen H. T., Christman M. F. Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer*, 3:31, 2003.

Li C., Wong W. H. DNA-chip analyzer (dChip). *Harvard School of Public Health, Boston (USA), Dept. of Bioinformatics*, 2003.

Lin E. Y., Li J. F., Gnatovskiy L., Deng Y., Zhu L., Grzesik D. A., Qian H., Xue X. N., Pollard J. W. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res.*, 66:11238–11246, 2006.

Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. *Methods*, 25:402–408, 2001.

Ljungberg B., Hanbury D. C., Kuczyk M. A., Merseburger A. S., Mulders P. F. A., Patard J.-J., Sinescu I. C. Guidelines on renal cell carcinoma. *European Association of Urology*, 2009.

Lopez-Beltran A., Scarpelli M., Montironi R., Kirkali Z. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur. Urol.*, 49:798–805, 2006.

Luzzi K. J., MacDonald I. C., Schmidt E. E., Kerkvliet N., Morris V. L., Chambers A. F., Groom A. C. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.*, 153:865–873, 1998.

Mahnke Y. D., Schwendemann J., Beckhove P., Schirrmacher V. Maintenance of long-term tumour-specific T-cell memory by residual dormant tumour cells. *Immunology*, 115:325–336, 2005.

Mallat A., Fouassier L., Preaux A. M., Gal C. S., Raufaste D., Rosenbaum J., Dhumeaux D., Jouneaux C., Mavier P., Lotersztajn S. Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor-mediated pathway. *J. Clin. Invest.*, 96:42–49, 1995.

McLachlan G. F., Do K.-A., Ambroise C. Analyzing microarray gene expression data. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 1. Auflage, 2004.

McMahon B., Kwaan H. C. The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, 36:184–194, 2008.

Millenaar F. F., Okyere J., May S. T., vanZanten M., Voesenek L. A., Peeters A. J. How to decide? Different methods of calculating gene expression from short oligonucleotide array data will give different results. *BMC Bioinformatics*, 7, 2006.

Minn A. J., Kang Y., Serganova I., Gupta G. P., Giri D. D., Doubrovin M., Ponomarev V., Gerald W. L., Blasberg R., Massague J. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J. Clin. Invest.*, 115:44–55, 2005.

Minn A. J., Gupta G. P., Siegel P. M., Bos P. D., Shu W., Giri D. D., Viale A., Olshen A. B., Gerald W. L., Massague J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 436:518–524, 2005a.

Miranti C. K. Controlling cell surface dynamics and signaling: how CD82/KAI1 suppresses metastasis. *Cell. Signal.*, 21:196–211, 2009.

Mülhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin*, 3. Auflage, 2002.

Müller H.-J., Röder T. Der Experimentator: Microarrays. *Spektrum Akademischer Verlag, München*, 1. Auflage, 2004.

Müller O., Lightfoot S., Schröder A. RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control, *Agilent Technologies*, 2004.

Moch H., Schraml P., Bubendorf L., Mirlacher M., Kononen J., Gasser T., Mihatsch M. J., Kallioniemi O. P., Sauter G. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 154:981–986, 1999.

Montgomery J. P., Patterson P. H. Endothelin receptor B antagonists decrease glioma cell viability independently of their cognate receptor. *BMC Cancer*, 8:354, 2008.

Morey J. S., Ryan J. C., Van Dolah F. M. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol. Proced. Online*, 8:175–193, 2006.

Motzer R. J., Berg W. J. Role of interferon in metastatic renal cell carcinoma. *In:* Renal cell carinoma. Molecular biology, immunology, and clinical management, Hrsg. R. M. Bukowski, A. C. Novick, *Humana Press, Totowa, New Jersey*, 1. Auflage, S. 319-330, 2000.

Motzer R. J., Bander N. H., Nanus D. M. Renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 335:865–875, 1996.

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

Motzer R. J., Hutson T. E., Tomczak P., Michaelson M. D., Bukowski R. M., Oudard S., Negrier S., Szczylik C., Pili R., Bjarnason G. A., Garcia-delMuro X., Sosman J. A., Solska E., Wilding G., Thompson J. A., Kim S. T., Chen I., Huang X., Figlin R. A. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 27:3584–3590, 2009.

Muller W. A., Weigl S. A., Deng X., Phillips D. M. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.*, 178:449–460, 1993.

Mundel T. M., Kalluri R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors. *Microvasc. Res.*, 74:85–89, 2007.

Muscat J. E. The epidemiology of renal cell carcinoma. *In:* Renal cell carinoma. Molecular biology, immunology, and clinical management, Hrsg. R. M. Bukowski, A. C. Novick, *Humana Press, Totowa, New Jersey*, 1. Auflage, S. 3-14, 2000.

Nabors L. B., Fiveash J. B., Markert J. M., Kekan M. S., Gillespie G. Y., Huang Z., Johnson M. J., Meleth S., Kuo H., Gladson C. L., Fathallah-Shaykh H. M. A phase 1 trial of ABT-510 concurrent with standard chemoradiation for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Arch. Neurol.*, 67(3):313–319, 2010.

Nakahashi T., Fukuo K., Nishimaki H., Hata S., Shimizu M., Suhara T., Takimoto M., Morimoto S., Ogihara T. Endothelin-1 enhances nitric oxide-induced cell death in cultured vascular smooth-muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 31 Suppl 1:S351–353, 1998.

National Center for Biotechnology Information. http://www.ncbi.nlm.nih.gov, Stand 17.05.2010.

Naumov G. N., Akslen L. A., Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle*, 5:1779–1787, 2006.

Naumov G. N., Bender E., Zurakowski D., Kang S. Y., Sampson D., Flynn E., Watnick R. S., Straume O., Akslen L. A., Folkman J., Almog N. A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J. Natl. Cancer Inst.*, 98:316–325, 2006a.

Nelson J. B., Chan-Tack K., Hedican S. P., Magnuson S. R., Opgenorth T. J., Bova G. S., Simons J. W. Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res.*, 56:663–668, 1996.

Nguyen D. X., Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat. Rev. Genet.*, 8:341–352, 2007.

Nguyen D. X., Bos P. D., Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer*, 9:274–285, 2009.

Niederacher D. Genchipdiagnostik. *Gynäkologe*, 37:203–209, 2004.

Nielsen M., Thomsen J. L., Primdahl S., Dyreborg U., Andersen J. A. Breast cancer and atypia among young and middle-aged women: a study of 110 medicolegal autopsies. *Br. J. Cancer*, 56:814–819, 1987.

Nieswandt B., Hafner M., Echtenacher B., Mannel D. N. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.*, 59:1295–1300, 1999.

Okazawa M., Shiraki T., Ninomiya H., Kobayashi S., Masaki T. Endothelin-induced apoptosis of A375 human melanoma cells. *J. Biol. Chem.*, 273:12584–12592, 1998.

Olencki T., Bukowski R. M. Interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *In:* Renal cell carinoma. Molecular biology, immunology, and clinical management, Hrsg. R. M. Bukowski, A. C. Novick, *Humana Press, Totowa, New Jersey*, 1. Auflage, S. 301-318, 2000.

Oncomine-Datenbank. http://www.oncomine.org, Stand 12.04.2010.

Pan J., Mestas J., Burdick M. D., Phillips R. J., Thomas G. V., Reckamp K., Belperio J. A., Strieter R. M. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol. Cancer*, 5:56, 2006.

Pantel K., Woelfle U. Detection and molecular characterisation of disseminated tumour cells: implications for anti-cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1756:53–64, 2005.

Parker A. S., Kosari F., Lohse C. M., Houston Thompson R., Kwon E. D., Murphy L., Riehle D. L., Blute M. L., Leibovich B. C., Vasmatzis G., Cheville J. C. High expression levels of survivin protein independently predict a poor outcome for patients who undergo surgery for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*, 107:37–45, 2006.

Parmigiani G., Garrett E. S., Irizarry R. A., Zeger S. L. The analysis of gene expression data: an overview of methods and software. *In:* The analysis of gene expression data. Methods and software, Hrsg. G. Parmigiani, E. S. Garrett, R. A. Irizarry, S. L. Zeger, *Springer -Verlag, New York*, 1. Auflage, S. 1-45, 2003.

Patard J. J., Leray E., Rioux-Leclercq N., Cindolo L., Ficarra V., Zisman A., De La Taille A., Tostain J., Artibani W., Abbou C. C., Lobel B., Guillé F., Chopin D. K., Mulders P. F., Wood C. G., Swanson D. A., Figlin R. A., Belldegrun A. S., Pantuck A. J. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J. Clin. Oncol.*, 23:2763–2771, 2005.

Patel N. S., Muneer A., Blick C., Arya M., Harris A. L. Targeting vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma. *Tumour Biol.*, 30:292–299, 2009.

Patel P. H., Chadalavada R. S., Chaganti R. S., Motzer R. J. Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 12:7215–7220, 2006.

Peng X., Stromberg A. J. Microarray experiment design and statistical analysis. *In:* A beginner´s guide to microarrays, Hrsg. E. M. Blalock, *Kluwer Academic Publishers, Boston, New York, Dordrecht, London*, 1. Auflage, S. 243-275, 2003.

Pflug B. R., Zheng H., Udan M. S., D'Antonio J. M., Marshall F. F., Brooks J. D., Nelson J. B. Endothelin-1 promotes cell survival in renal cell carcinoma through the ET(A) receptor. *Cancer Lett.*, 246:139–148, 2007.

Pollard J. W. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J. Leukoc. Biol.*, 84: 623–630, 2008.

Pols M. S., Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.*, 315:1584–1592, 2009.

Ponten F., Jirstrom K., Uhlen M. The Human Protein Atlas – a tool for pathology. *J. Pathol.*, 216(4): 387–93, 2008.

Presti J. C., Wilhelm M., Reuter V., Russo P., Motzer R., Waldman F. Allelic loss on chromosomes 8 and 9 correlates with clinical outcome in locally advanced clear cell carcinoma of the kidney. *J. Urol.*, 167: 1464–1468, 2002.

Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nat. Rev. Genet.*, 2:418–427, 2001.

Rak J., Yu J. L. Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular supply and vascular demand. *Semin. Cancer Biol.*, 14:93–104, 2004.

Ramaswamy S., Golub T. R. DNA microarrays in clinical oncology. *J. Clin. Oncol.*, 20:1932–1941, 2002.

Ramaswamy S., Ross K. N., Lander E. S., Golub T. R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.*, 33:49–54, 2003.

Reich M., Ohm K., Angelo M., Tamayo P., Mesirov J.P. GeneCluster 2.0: an advanced toolser for bioarray analysis. *Bioinformatics*, 20:1797–1798, 2004.

Reich M., Liefeld T., Gould J., Lerner J., Tamayo P., Mesirov J. P. GenePattern 2.0. *Nat. Genet.*, 38: 500–501, 2006.

Reiner A., Yekutieli D., Benjamini Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics*, 19:368–375, 2003.

Rioux-Leclercq N., Epstein J. I., Bansard J. Y., Turlin B., Patard J. J., Manunta A., Chan T., Ramee M. P., Lobel B., Moulinoux J. P. Clinical significance of cell proliferation, microvessel density, and CD44 adhesion molecule expression in renal cell carcinoma. *Hum. Pathol.*, 32:1209–1215, 2001.

Roigas J. Nachsorge ist wichtig. *In:* Immuntherapie bei Nierenkrebs. Ratgeber für Patienten, Hrsg. M. Siebels, *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York*, 1. Auflage, S. 30-32, 2005.

Rosano L., Spinella F., Genovesi G., Di Castro V., Natali P. G., Bagnato A. Endothelin-B receptor blockade inhibits molecular effectors of melanoma cell progression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 44 Suppl 1:S136–139, 2004.

Roscigno M., Zigeuner R., Stradaa E., Petraliaa G., Sozzia F., Matlooba R, Colomboa R, Guazzonia G., Suardia N., Freschia M., Montorsia F., Rigattia P., Bertinia R. The new TNM staging system for renal cell carcinoma does not improve accuracy in predicting cancer-specific mortality. Posterpräsentation, *Jahrestagung der American Urological Association*, 2010.

Sabo E., Boltenko A., Sova Y., Stein A., Kleinhaus S., Resnick M. B. Microscopic analysis and significance of vascular architectural complexity in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 7:533–537, 2001.

Sanchez-Mejias A., Fernandez R. M., Lopez-Alonso M., Antinolo G., Borrego S. New roles of EDNRB and EDN3 in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Genet. Med.*, 12:39–43, 2010.

Sandlund J., Hedberg Y., Bergh A., Grankvist K., Ljungberg B., Rasmuson T. Evaluation of CD31 (PECAM-1) expression using tissue microarray in patients with renal cell carcinoma. *Tumour Biol.*, 28:158–164, 2007a.

Sandlund J., Oosterwijk E., Grankvist K., Oosterwijk-Wakka J., Ljungberg B., Rasmuson T. Prognostic impact of carbonic anhydrase IX expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int.*, 100:556–560, 2007b.

Sardari Nia P., Hendriks J., Friedel G., Van Schil P., Van Marck E. Distinct angiogenic and non-angiogenic growth patterns of lung metastases from renal cell carcinoma. *Histopathology*, 51:354–361, 2007.

Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270:467–470, 1995.

Schirrmacher V. T-cell immunity in the induction and maintenance of a tumour dormant state. *Semin. Cancer Biol.*, 11:285–295, 2001.

Sebastiani P., Ramoni M. F. Statistical challenges in functional genomics. *University of Massachusetts, Department of Mathematics and Statistics, Amherst (USA)*, 2002.

Seo J., Hoffman E. P. Probe set algorithms: is there a rational best bet? *BMC Bioinformatics*, 7:395, 2006.

Sharma S., Sharma M. C., Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology*, 46:481–489, 2005.

Sharov A. A., Dudekula D. B., Ko M. S. A web-based tool for principal component and significance analysis of microarray data. *Bioinformatics*, 21:2548–2549, 2005.

Shiozawa Y., Pedersen E. A., Patel L. R., Ziegler A. M., Havens A. M., Jung Y., Wang J., Zalucha S., Loberg R. D., Pienta K. J., Taichman R. S. GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche. *Neoplasia*, 12:116–127, 2010.

Siebels M., Stief C. G. Neue Therapieansätze beim metastasierten Nierenzellkarzinom. *UNI-MED Verlag AG, Bremen, London, Boston*, 1. Auflage, 2007.

Silverstein R. L., Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci. Signal.*, 2:re3, 2009.

Simon I. MammaPrint®: Klassifizierung von Mamma-Tumoren durch Genexpressionsanalyse. *Laborwelt*, 5: 27–29, 2007.

Slaton J. W., Swanson D. A. Renal cell carcinoma: Diagnosis and staging. *In:* Renal cell carinoma. Molecular biology, immunology, and clinical management, Hrsg. R. M. Bukowski, A. C. Novick, *Humana Press, Totowa, New Jersey*, 1. Auflage, S. 111-134, 2000.

Sültmann H., vonHeydebreck A., Huber W., Kuner R., Buness A., Vogt M., Gunawan B., Vingron M., Fuzesi L., Poustka A. Gene expression in kidney cancer is associated with cytogenetic abnormalities, metastasis formation, and patient survival. *Clin. Cancer Res.*, 11:646–655, 2005.

Smith S. L., Damato B. E., Scholes A. G., Nunn J., Field J. K., Heighway J. Decreased endothelin receptor B expression in large primary uveal melanomas is associated with early clinical metastasis and short survival. *Br. J. Cancer*, 87:1308–1313, 2002.

Stacker S. A., Baldwin M. E., Achen M. G. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J.*, 16:922–934, 2002.

Staller P., Sulitkova J., Lisztwan J., Moch H., Oakeley E. J., Krek W. Chemokine receptor CXCR4 down-regulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*, 425:307–311, 2003.

Statistisches Bundesamt. Herz-/Kreislauferkrankungen sind die häufigste Todesursache (Pressemitteilung Nr. 344). http://www.destatis.de, aktualisiert am 15.09.2009.

Stoecklein N. H., Klein C. A. Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int. J. Cancer*, 126:589–598, 2010.

Sturn A. Cluster analysis for large scale gene expression studies. Masterarbeit, *Universität Graz, Graz (Österreich) und The Institute for Genomic Research, Rockville (USA)*, Dez. 2000.

Sturn A., Quackenbush J., Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*, 18: 207–208, 2002.

Suojanen J., Salo T., Koivunen E., Sorsa T., Pirila E. A novel and selective membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) inhibitor reduces cancer cell motility and tumor growth. *Cancer Biol. Ther.*, 8:2362–2370, 2009.

Swietach P., Vaughan-Jones R. D., Harris A. L. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev.*, 26:299–310, 2007.

Takagi S., Fujikawa K., Imai T., Fukuhara N., Fukudome K., Minegishi M., Tsuchiya S., Konno T., Hinuma Y., Yoshie O. Identification of a highly specific surface marker of T-cell acute lymphoblastic leukemia and neuroblastoma as a new member of the transmembrane 4 superfamily. *Int. J. Cancer*, 61:706–715, 1995.

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

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

Takenawa J., Kaneko Y., Kishishita M., Higashitsuji H., Nishiyama H., Terachi T., Arai Y., Yoshida O., Fukumoto M., Fujita J. Transcript levels of aquaporin 1 and carbonic anhydrase IV as predictive indicators for prognosis of renal cell carcinoma patients after nephrectomy. *Int. J. Cancer*, 79:1–7, 1998.

Takino T., Miyamori H., Kawaguchi N., Uekita T., Seiki M., Sato H. Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun., 304:160–166, 2003.

Thoenes W., Storkel S., Rumpelt H. J. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol. Res. Pract.*, 181:125–143, 1986.

Toma M. I., Grosser M., Herr A., Aust D. E., Meye A., Hoefling C., Fuessel S., Wuttig D., Wirth M. P., Baretton G. B. Loss of heterozygosity and copy number abnormality in clear cell renal cell carcinoma discovered by high-density affymetrix 10K single nucleotide polymorphism mapping array. *Neoplasia*, 10: 634–642, 2008.

Tong T. Q., Rohde D., Peter S. Progress in the management of advanced renal cell carcinoma (RCC). *Aktuelle Urol*, 41 Suppl 1:57–60, 2010.

US National Institutes of Health. http://www.clinicaltrials.gov, Stand 16.04.2010.

Uzzo R. G., Rayman P., Novick A. C., Bukowski R. M., Finke J. H. Molecular mechanisms of immune dysfunction in renal cell carcinoma. *In:* Renal cell carinoma. Molecular biology, immunology, and clinical management, Hrsg. R. M. Bukowski, A. C. Novick, *Humana Press, Totowa, New Jersey*, 1. Auflage, S. 63-78, 2000.

van denEynden G. G., Van Laere S. J., Van derAuwera I., Gilles L., Burn J. L., Colpaert C., vanDam P., Van Marck E. A., Dirix L. Y., Vermeulen P. B. Differential expression of hypoxia and (lymph)angiogenesis-related genes at different metastatic sites in breast cancer. *Clin. Exp. Metastasis*, 24:13–23, 2007.

van derPoel H. G., Roukema J. A., Horenblas S., vanGeel A. N., Debruyne F. M. Metastasectomy in renal cell carcinoma: A multicenter retrospective analysis. *Eur. Urol.*, 35:197–203, 1999.

van deVijver M. J., He Y. D., van'tVeer L. J., Dai H., Hart A. A., Voskuil D. W., Schreiber G. J., Peterse J. L., Roberts C., Marton M. J., Parrish M., Atsma D., Witteveen A., Glas A., Delahaye L., van derVelde T., Bartelink H., Rodenhuis S., Rutgers E. T., Friend S. H., Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 347:1999–2009, 2002.

vanSpronsen D. J., Mulders P. F., De Mulder P. H. Novel treatments for metastatic renal cell carcinoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 55:177–191, 2005.

van'tVeer L. J., Dai H., van deVijver M. J., He Y. D., Hart A. A., Mao M., Peterse H. L., van derKooy K., Marton M. J., Witteveen A. T., Schreiber G. J., Kerkhoven R. M., Roberts C., Linsley P. S., Bernards R., Friend S. H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415:530–536, 2002.

Vasselli J. R., Shih J. H., Iyengar S. R., Maranchie J., Riss J., Worrell R., Torres-Cabala C., Tabios R., Mariotti A., Stearman R., Merino M., Walther M. M., Simon R., Klausner R. D., Linehan W. M. Predicting survival in patients with metastatic kidney cancer by gene-expression profiling in the primary tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:6958–6963, 2003.

Venables W. N., Smith D. M. An introduction to R. *The R development core team.* 2010.

Wakelin M. W., Sanz M. J., Dewar A., Albelda S. M., Larkin S. W., Boughton-Smith N., Williams T. J., Nourshargh S. An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane. *J. Exp. Med.*, 184:229–239, 1996.

Walker W. L., Liao I. H., Gilbert D. L., Wong B., Pollard K. S., McCulloch C. E., Lit L., Sharp F. R. Empirical Bayes accomodation of batch-effects in microarray data using identical replicate reference samples: application to RNA expression profiling of blood from Duchenne muscular dystrophy patients. *BMC Genomics*, 9:494, 2008.

Westermarck J., Kahari V. M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.*, 13:781–792, 1999.

Wilhelm M., Veltman J. A., Olshen A. B., Jain A. N., Moore D. H., Presti J. C., Kovacs G., Waldman F. M. Array-based comparative genomic hybridization for the differential diagnosis of renal cell cancer. *Cancer Res.*, 62:957–960, 2002.

Wilson J. L., Burchell J., Grimshaw M. J. Endothelins induce CCR7 expression by breast tumor cells via endothelin receptor A and hypoxia-inducible factor-1. *Cancer Res.*, 66:11802–11807, Dec 2006.

Wittke F., Hoffmann R., Buer J., Dallmann I., Oevermann K., Sel S., Wandert T., Ganser A., Atzpodien J. Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 79:1182–1184, 1999.

Wülfing P., Diallo R., Kersting C., Wulfing C., Poremba C., Rody A., Greb R. R., Bocker W., Kiesel L. Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human breast cancer and

correlation with long-term follow-up. *Clin. Cancer Res.*, 9:4125–4131, 2003.

Wuttig D., Baier B., Fuessel S., Meinhardt M., Herr A., Hoefling C., Toma M., Grimm M. O., Meye A., Rolle A., Wirth M. P. Gene signatures of pulmonary metastases of renal cell carcinoma reflect the disease-free interval and the number of metastases per patient. *Int. J. Cancer*, 125:474–482, 2009.

Yamazaki D., Kurisu S., Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.*, 96:379–386, 2005.

Yao M., Huang Y., Shioi K., Hattori K., Murakami T., Sano F., Baba M., Kondo K., Nakaigawa N., Kishida T., Nagashima Y., Yamada-Okabe H., Kubota Y. A three-gene expression signature model to predict clinical outcome of clear cell renal carcinoma. *Int. J. Cancer*, 123:1126–1132, 2008.

Yao X., Qian C. N., Zhang Z. F., Tan M. H., Kort E. J., Yang X. J., Resau J. H., Teh B. T. Two distinct types of blood vessels in clear cell renal cell carcinoma have contrasting prognostic implications. *Clin. Cancer Res.*, 13:161–169, 2007.

Yates D. R., Rehman I., Abbod M. F., Meuth M., Cross S. S., Linkens D. A., Hamdy F. C., Catto J. W. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin. Cancer Res.*, 13:2046–2053, 2007.

Yegnasubramanian S., Kowalski J., Gonzalgo M. L., Zahurak M., Piantadosi S., Walsh P. C., Bova G. S., De Marzo A. M., Isaacs W. B., Nelson W. G. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res.*, 64:1975–1986, 2004.

Yildiz E., Ayan S., Goze F., Gokce G., Gultekin E. Y. Relation of microvessel density with microvascular invasion, metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *BJU Int.*, 101:758–764, 2008.

Yilmazer D., Han U., Onal B. A comparison of the vascular density of VEGF expression with microvascular density determined with CD34 and CD31 staining and conventional prognostic markers in renal cell carcinoma. *Int. Urol. Nephrol.*, 39:691–698, 2007.

Yoshida T., Kawano Y., Sato K., Ando Y., Aoki J., Miura Y., Komano J., Tanaka Y., Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic*, 9:540–558, 2008.

Young A. C., Craven R. A., Cohen D., Taylor C., Booth C., Harnden P., Cairns D. A., Astuti D., Gregory W., Maher E. R., Knowles M. A., Joyce A., Selby P. J., Banks R. E. Analysis of VHL Gene Alterations and their Relationship to Clinical Parameters in Sporadic Conventional Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 15:7582–7592, 2009.

Zabel B. Microarray-Biochip-Technologie. *Monatsschr. Kinderheilkd.*, 149:1304–1310, 2001.

Zemni R., Bienvenu T., Vinet M. C., Sefiani A., Carrie A., Billuart P., McDonell N., Couvert P., Francis F., Chafey P., Fauchereau F., Friocourt G., desPortes V., Cardona A., Frints S., Meindl A., Brandau O., Ronce N., Moraine C., vanBokhoven H., Ropers H. H., Sudbrak R., Kahn A., Fryns J. P., Beldjord C., Chelly J. A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat. Genet.*, 24:167–170, 2000.

Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W. G., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J. Q., Harris S., Wiedemann L. M., Mishina Y., Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425:836–841, 2003.

Zhang X., Yamashita M., Uetsuki H., Kakehi Y. Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases. *Int. J. Urol.*, 9:509–514, 2002.

Zhao B. J., Sun D. G., Zhang M., Tan S. N., Ma X. Identification of aberrant promoter methylation of EDNRB gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis. Esophagus*, 22:55–61, 2009.

Ziegler A., Lange S., Bender R. Überlebenszeitanalyse: Die Cox-Regression. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 132: e42–e44, 2007.

Zisman A., Pantuck A. J., Dorey F., Said J. W., Shvarts O., Quintana D., Gitlitz B. J., deKernion J. B., Figlin R. A., Belldegrun A. S. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J. Clin. Oncol.*, 19:1649–1657, 2001.

A Anhang

Ergänzende Daten zu den „Microarray“-Analysen

Die Rohdaten der einzelnen „Microarrays“ (*.cel-Dateien) sind unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/ (GSE14378, GSE22541) erhältlich. Die Listen der zwischen den Metastasensubgruppen differenziell exprimierten Gene sind in den ergänzenden Daten der Publikation Wuttig *et al.* [2009] (PubMed-ID 19391132) aufgelistet. Die zwischen den Primärtumorsubgruppen differenziell exprimierten Gene sind unter http://urologie.uniklinikum-dresden.de/ba_labor_research_download.htm erhältlich.

Die Qualitätsparameter der RNA und der „Microarrays“ aller untersuchten pulmonalen Metastasen und primären kzNZK sind in den Tab. A.1 und A.2 gezeigt.

Tab. A.1: Mittels „Microarray“-Analysen untersuchte pulmonale Metastasen. Alle Metastasen wurden im Fachkrankenhaus Coswig reseziert. (RIN = „RNA integrity number“)

Microarray-Bezeichnung	**Tumorzell-gehalt [%]**	**RNA-Qualität (RIN)**	**eingesetzte RNA-Menge [μg]**	**Hintergrund-signal**	**„scaling factor“**	**„present calls“ [%]**	***GAPDH* 3´/5´**	***ACTB* 3´/5´**
Met1	> 95	8,3	2,5	41,42	5,641	47,5	1,00	3,43
Met2	> 95	7,5	2,5	34,27	9,542	43,9	1,22	9,16
Met3	80 – 90	7,3	2,5	31,36	10,374	45,3	1,31	6,36
Met4	90	6,5	2,5	34,42	7,225	51,3	1,34	5,20
Met5	90 – 95	9,0	2,0	36,47	8,403	47,8	2,07	12,05
Met6	90	7,9	2,5	32,57	8,403	48,5	2,21	14,23
Met7	70 – 90	9,1	2,5	33,77	8,068	51,1	1,17	4,88
Met8	> 95	6,0	2,5	32,15	17,423	42,5	2,00	14,19
Met9	95	8,1	2,5	32,57	9,926	47,1	1,35	5,39
Met11	70 – 95	5,4	2,5	31,94	11,533	46,6	2,01	5,55
Met12	> 95	8,3	2,5	31,28	9,878	45,7	1,25	5,93
Met13	85 – 90	4,5	3,2	54,80	11,769	39,6	2,18	9,22
Met14	90	7,7	2,5	39,80	5,099	51,5	1,21	2,87
Met15	> 95	9,1	2,5	37,34	5,990	47,3	1,30	2,50
Met16	90 – 95	6,2	2,5	38,18	6,709	51,5	1,51	3,60
Met17	> 95	6,9	2,5	33,98	9,834	45,4	1,42	3,38
Met18	85 – 90	8,3	1,7	34,65	9,938	45,0	1,53	6,57
Met20	80 – 90	7,3	2,5	34,18	14,211	44,3	3,26	9,20
Met22	85 – 95	6,1	2,5	37,26	16,097	40,3	2,59	18,82
Met23	90	7,5	1,0	37,59	7,327	47,3	1,22	3,73
Met25	80 – 90	6,2	2,5	42,99	6,371	48,1	1,89	3,06
NZK15	80	8,6	1,5	57,16	5,680	43,8	2,52	4,31
NZK20	85 – 95	7,1	1,5	53,93	3,123	51,8	1,31	1,47
NZK21	90	8,9	2,5	52,74	6,457	42,2	1,36	4,39

Tab. A.2: Mittels „Microarray“-Analysen untersuchte primäre klarzellige Nierenzellkarzinome. Die Primärtumoren wurden in den urologischen Kliniken der Universitätskliniken Dresden bzw. Jena ([1]) reseziert. (RIN = „RNA integrity number“)

Microarray-Bezeichnung	**Tumorzell-gehalt [%]**	**RNA-Qualität (RIN)**	**eingesetzte RNA-Menge [μg]**	**Hintergrund-signal**	**„scaling factor“**	**„present calls“ [%]**	***GAPDH* 3´/5´**	***ACTB* 3´/5´**
NZK1	> 95	8,6	1,0	42,59	3,963	51,5	1,38	3,50
NZK2	> 95	8,0	1,0	50,37	3,209	49,1	1,11	2,21
NZK3	90	6,9	1,0	45,23	3,933	47,4	1,12	3,21
NZK4	80	6,1	1,0	54,93	5,550	40,9	1,14	5,07
NZK5	90 – > 95	8,3	1,0	51,47	2,934	51,2	1,12	2,59
NZK6	70 – 80	9,0	1,0	55,70	3,844	50,2	1,54	5,01
NZK7	> 95	8,4	1,0	60,79	4,466	44,7	1,19	5,87
NZK8	> 95	7,9	1,0	62,99	3,064	49,1	1,65	6,86
NZK9	> 95	8,2	1,0	72,89	2,086	51,7	1,12	2,20
NZK10	80 – 90	8,3	1,0	58,11	3,033	52,3	1,08	2,01
NZK11	> 95	8,3	1,0	53,77	2,942	49,7	1,17	2,45
NZK12	> 95	9,4	1,0	59,94	3,441	48,5	1,34	5,23
NZK13	> 95	6,9	1,0	62,94	4,799	47,0	1,28	10,46
NZK14	80 – 90	8,1	1,0	56,48	3,727	49,5	1,28	2,43
NZK16	> 95	8,0	1,0	60,46	4,147	46,9	1,55	8,60
NZK17	80 – 90	7,0	2,5	55,77	4,355	47,2	1,29	2,51
NZK18	> 95	8,3	2,5	55,03	3,305	50,2	1,22	2,45
NZK19_Wied	90	8,3	2,5	58,28	3,888	47,3	1,22	2,57
NZK22 [1]	> 90	9,5	1,0	52,89	3,633	47,3	1,14	1,87
NZK23 [1]	> 90	9,6	1,0	55,69	3,378	48,5	1,11	1,61
NZK24 [1]	> 90	8,5	1,0	50,85	5,461	45,2	1,25	2,09
NZK25 [1]	> 90	7,8	1,0	49,45	5,204	45,1	1,14	1,80
NZK26 [1]	> 90	7,2	1,0	46,65	5,673	45,0	1,50	1,56
NZK27 [1]	> 90	7,7	1,0	43,08	7,489	48,5	2,29	4,56

Danksagung

Ich danke allen, die zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz großer Dank geht an Prof. van Pée für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und seine wertvollen kritischen Hinweise.

Bei Herrn Prof. Wirth bedanke ich mich ganz herzlich für die Möglichkeit, dieses interessante Thema im urologischen Forschungslabor des Universitätsklinikums Dresden bearbeiten zu können, die Unterstützung der Teilnahme an zahlreichen Kongressen und Weiterbildungen sowie die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Kollegen des urologischen Forschungslabors. Ich danke euch für das sehr angenehme Arbeitsklima, eure stetige Hilfsbereitschaft und unsere konstruktive Zusammenarbeit. Sowohl beruflich als auch privat habe ich mich bei euch sehr wohl gefühlt und danke euch für die schöne und lehrreiche Zeit. Insbesondere bei Frau Dr. Susanne Füssel bedanke ich mich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die mir übertragene Verantwortung, allem voran die Freiheiten bei der Projektplanung und -durchführung. Für die anregenden Diskussionen, die wertvollen fachlichen Ratschläge sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit danke ich den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Labors — Frau Dr. Susanne Füssel, Frau Dr. Kati Erdmann, Doreen Kunze und Herrn Dr. Kai Krämer. Frau Andrea Lohse, Frau Silke Tomasetti und Herrn Jörg Hofmann möchte ich für die praktische Unterstützung bei der quantitativen PCR und der Immunhistochemie danken.

Weiterer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Zastrow und Herrn PD Dr. Marc-Oliver Grimm für die Erhebung der klinischen Daten, die wertvollen fachlichen Gespräche und Ratschläge sowie Daniel Kretschmer und Andreas Schwarz für ihre geduldige Unterstützung bei zahlreichen technischen Problemen.

Für die stets sehr gute Zusammenarbeit, die histologischen Begutachtungen und die Hilfe bei den immunhistochemischen Analysen danke ich Frau Dr. Marieta Toma, Herrn Dr. Matthias Meinhardt und Frau Dr. Mildred Sergon.

Auch bei den Kollegen aus dem urologischen Labor der Friedrich Schiller-Universität Jena, insbesondere Frau PD Dr. Kerstin Junker und Frau Dr. Jimsgene Sanjmyatav, möchte ich mich für die konstruktive Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Gewebeproben bedanken.

Weiterhin haben Herr Prof. Rolle, Frau Baier und Herr Dr. Holotiuk durch die Bereitstellung und histologische Begutachtung der Metastasengewebe sowie Frau Dr. Marianne Großer und Herr Dr. Alexander Herr mit ihrer Hilfe bei den „Microarray“-Analysen zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Die „TaqMan Low Density Array“-Analysen wurden im Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI in Leipzig in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Jörg Hackermüller mit der Hilfe von Kerstin Ullmann und Stephan Schreiber vorgenommen. Die „tissue microarrays“ wurden von Frau Kristin Kalman angefertigt.

Weiterhin danke ich der Dr. Robert Pfleger- und der Jürgen Manchot-Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Auch bei der Medizinischen Fakultät der Technischen

Universität Dresden bedanke ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung verschiedener Reisestipendien und finanzieller Mittel.

In besonderem Maße danke ich meinen Eltern und meinem Bruder Marcel, die durch ihre liebevolle Unterstützung, ihre Ratschläge und ihr Vertrauen während der letzten Jahre maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss meines Studiums und meiner Promotion beigetragen haben.

Ganz lieb möchte ich mich außerdem bei meinem Freund Markus für sein Verständnis, seine mentale Unterstützung, seine wertvollen kritischen Hinweise sowie das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Dissertation wurde im urologischen Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. K.-H. van Pée, Herrn Prof. M. P. Wirth und Frau Dr. S. Füssel angefertigt.

Hiermit erkenne ich die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 20. März 2000 in ihrer aktuellen Fassung vom 17. Juli 2008 an.

Dresden, 14. Juli 2010

Daniela Wuttig