

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Pharmakogenetik

Einfluss von Polymorphismen im Promotor des *MTOR*-Gens
auf den Verlauf des Nierenzellkarzinoms

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Philipp Christian Hofmann
aus Recklinghausen

2019

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird über DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/70432

URN: urn:nbn:de:hbz:464-20190920-140655-6

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Prof. Dr. med. H. S. Bachmann

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. F. Pietruck

Tag der mündlichen Prüfung: 23.Juli.2019

Ergebnisse dieser Arbeit werden publiziert:

Bachmann, H. S., Hofmann, P. C., Eisenhardt, A., Schmid, K. W., Heß, J. (2019):

Impact of *MTOR* promoter polymorphisms on survival from renal cell carcinoma

INHALT

1. EINLEITUNG	5
1.1 GENETISCHE FORSCHUNG	5
1.2 DIE DNA	5
1.3 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP).....	7
1.4 DAS NIERENZELLKARZINOM	7
1.5 MECHANISTIC TARGET OF RAPAMYCIN KINASE (MTOR).....	9
1.6 DAS <i>MTOR</i> -GEN	11
1.7 THEMA DER ARBEIT	12
2. MATERIALIEN UND METHODEN	14
2.1 MATERIALIEN	14
2.1.1 <i>Geräte</i>	14
2.1.2 <i>Restriktionsenzyme</i>	15
2.1.3 <i>DNA</i>	15
2.1.4 <i>PCR-Primer</i>	16
2.1.5 <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)-Oligonukleotide</i>	17
2.1.6 <i>Zelllinien</i>	18
2.2 METHODEN.....	18
2.2.1 <i>DNA-Extraktion</i>	18
2.2.2 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	19
2.2.3 <i>DNA-Analyse</i>	22
2.2.4 <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i>	25
2.2.5 <i>Statistische Methoden</i>	33
3. ERGEBNISSE	35
3.1 <i>MTOR-POLYMORPHISMEN IN VERSCHIEDENEN ETHNIEN</i>	35
3.1.1 <i>rs2295080 (-3162AC)-Genotypenverteilung bei Gesunden</i>	35
3.1.2 <i>rs2295079 (-3099CG)-Genotypenverteilung bei Gesunden</i>	36
3.1.3 <i>Vergleich der Genotypisierung der SNPs rs2295079 (-3099CG) und rs2295080 (-3162AC) innerhalb der Ethnien</i>	38
3.2 <i>IDENTIFIKATION VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN MITTELS EMSA</i>	39
3.3 <i>UNTERSUCHUNG DES NIERENZELLKARZINOMKOLLEKTIVS</i>	42
3.3.1 <i>Genotypisierung des SNP rs2295079 (-3099CG) bei Nierenzellkarzinompatienten</i>	42
3.3.2 <i>Untersuchung der klinisch-pathologischen Parameter</i>	43
3.3.3 <i>Untersuchung des Überlebens der Nierenzellkarzinompatienten</i>	45
3.3.4 <i>Untersuchung des Progressionsrisikos und des Metastasierungsrisikos</i>	49
4. DISKUSSION	53
4.1 <i>GENOTYPEN DES SNP rs2295079 (-3099CG)</i>	53
4.2 <i>ASSOZIATION DES SNP rs2295079 (-3099CG) MIT NIERENZELLKARZINOMEN</i>	54
4.3 <i>LIMITATIONEN</i>	57
4.4 <i>ANSÄTZE FÜR WEITERE FORSCHUNG</i>	58
5. ZUSAMMENFASSUNG	59
6 LITERATURVERZEICHNIS	60
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	67
8 LEBENS LAUF	69

1. Einleitung

1.1 Genetische Forschung

Ein vielfach untersuchtes, aber immer noch nicht vollständig erforschtes Gebiet der Wissenschaft stellt die Analyse des Erbgutes dar (Brown, 1999). Als erster großer Erforscher der Genetik wird Gregor Mendel bezeichnet, der 1866 seine Theorien zur Vererbungslehre bei Pflanzen veröffentlichte (Henig, 2001). In den folgenden Jahren konnte die Trägersubstanz des Erbgutes im Zellkern als Nukleinsäure identifiziert werden. Mithilfe der Mikroskopie fand man 1903 in mitotischen Zellen Chromosomen, wie der Name sagt, kleine, „anfärbbare Körper“ in den Zellkernen, die als Erbinformationsträger bestätigt wurden. Im Verlauf wurden weitergehende Beobachtungen zur gonosomalen Zellteilung, Meiose, und Vererbung gemacht. 1927 erkannte man auch, dass Röntgenstrahlen Mutationen auslösen können. Im Jahr 1953 wurde durch Watson und Crick die genaue Struktur der Desoxyribonukleinsäure (DNS, engl. Desoxyribo Nucleotide Acid, DNA) als Doppelhelix entdeckt und gleichzeitig der Replikationsmechanismus entschlüsselt (Watson, 2003). 1975 fand die erste DNA-Sequenzierung durch Sanger *et al.* statt (Sanger *et al.*, 1977a). Acht Jahre später wurde die Polymerase-Kettenreaktion entwickelt, die es ermöglicht, einzelne Abschnitte der DNA beliebig zu vervielfältigen und die heute die Grundlage für weitreichende Forschungen bildet (Kay, 2000).

1.2 Die DNA

Eine Zelle enthält verschiedene Organellen wie den Kern, das endoplasmatische Retikulum, Ribosomen, Mitochondrien, den Golgi-Apparat und Lysosomen. Der Träger der Erbinformationen ist der Zellkern. Hierauf richtet sich der Fokus der genetischen Forschung mit den darin enthaltenen Strukturen. Hier befindet sich die Erbinformation des Menschen kompakt gebündelt in Makromolekülen als DNA (Calladine *et al.*, 2005). Es handelt sich um langkettige, helikale Moleküle aus zwei antiparallelen Zucker-Phosphat-Ketten, welche über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den eingelagerten Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin zusammengehalten werden. Dabei bildet die Purinbase Adenin mit der Pyrimidinbase Thymin zwei Wasserstoffbrücken und die Purinbase Guanin mit der Pyrimidinbase Cytosin drei Wasserstoffbrücken (Watson, 2003). Das 1'-Ende der Pentose

Desoxyribose trägt eine der oben genannten Nukleobasen. Die Untereinheit der DNA, bestehend aus Desoxyribose und Nukleobase, nennt man Nukleosid. Eine Einheit bestehend aus einem Nukleosid und einem Phosphatrest wird als Nukleotid bezeichnet.

Im Zellkern ist die DNA durch Histonproteine eng gefaltet und somit platzsparend gebündelt (Grant, 2001).

Die DNA ist nicht überall gleich stabil. Regionen mit einem hohen Gehalt an Adenin und Thymin lösen sich schneller als Regionen, die einen hohen Gehalt an Cytosin und Guanin beinhalten. Ursache dafür ist die geringere Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Thymin (Cox, 2009).

Das Ablesen und Umschreiben der DNA in einzelsträngige messenger RNA (mRNA) nennt man Transkription, das Übersetzen in ein Protein heißt Translation (Moss, 2001). In die mRNA werden, wie bei der DNA, die Nukleobasen Adenin, Guanin und Cytosin eingebaut. Statt der Base Thymin wird Uracil verwendet. Das Uracil bildet mit Adenin 2 Wasserstoffbrücken (Moss, 2001).

Nach der Transkription der mRNA werden die Introns herausgeschnitten. Außerdem wird der Einzelstrang mit einer aus einer veränderten Form des Guanosins, dem 7-Methylguanosin, bestehender Kappe am 5'-Ende vor der regulatorischen 5'UTR-Region (untranslated region, nicht übersetzte Region) und mit einem Poly-A-Schwanz am 3'-Ende nach der 3'-UTR-Region versehen und so vor dem vorzeitigen Abbau geschützt (Moss, 2001, Chow, 1977).

Der gesamte genetische Code ist in den vier oben genannten Basen gespeichert. Drei Basen codieren für eine Aminosäure in einem fortlaufenden Leseraster. Dabei können verschiedene Basen für dieselbe Aminosäure codieren. Daneben gibt es das Start-Codon AUG, welches die Aminosäure Methionin codiert und die drei Stopp-Codons UAA, UAG und UGA. Das Genom der Eukaryoten stellt im Gegensatz zu dem der Prokaryoten eine Besonderheit dar. Die codierenden Abschnitte der DNA sind unterteilt in codierende Exons und nichtcodierende Introns. Dies dient beim Spleißen der genetischen Vielfalt. Dadurch können verschiedene Proteine aus einem Gen erschaffen werden. Fehler beim Spleißen können dazu führen, dass Proteinen weniger effizient oder sogar gar nicht mehr arbeiten können. So werden auch Krankheiten verursacht (Faustino, Cooper, 2003).

1.3 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Die meisten Gene werden über mehrere Generationen stabil ohne Veränderungen in der Basensequenz vererbt. Trotz der hohen Konservierung des Genoms trifft man auf multiple Varianten zwischen Lebewesen derselben Spezies. Diese führen unter anderem zur Individualität des einzelnen Lebewesens. Statistisch gesehen trifft man alle 500 bis 1000 Basen auf einen einzelnen Basenaustausch, eine sogenannte Punktmutation (Brookes, 1999). Diese können stumm auftreten, was bedeutet, dass das so entstandene Basentriplet für die gleiche Aminosäure kodiert wie das eigentliche Triplet und so keinen Einfluss auf die Proteinbildung hat. In der codierenden Sequenz können diese Mutationen aber auch zu einem Aminosäureaustausch im Protein oder zu Nonsense-Produkten führen, indem sie ein Stopp-Codon bilden. Die Translation bricht daraufhin ab und das Protein wird nur unvollständig gebildet.

Nur etwa 7 % der Einzelstrangpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) tauchen in proteincodierenden Regionen auf, die übrigen SNPs befinden sich in den regulatorischen Bereichen oder der Zwischen-Gen-Sequenz (Buroker, 2014).

SNPs in einem Promotor können zu einer erhöhten oder verringerten Expression eines Gens führen. Ursache hierfür ist, dass sich die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ändern können (Buroker, 2014).

SNPs sind über mehrere Generationen stabil. Der Basenaustausch auf einem Allel erfolgt in der Regel nur zwischen zwei Basen. Sie treten in der Bevölkerung mit einer Frequenz mindestens von 1 % auf (Brookes, 1999).

Im Gegensatz dazu können Mutationen unter anderem durch exogene Faktoren, wie radioaktiver Strahlung und Gifte, oder durch Fehler im DNA-Reparatursystem entstehen. Sofern eine Mutation nicht im Erbgut der Keimzellen auftritt, wird sie auch nicht an die nächste Generation vererbt, was sie von den SNPs im Wesentlichen unterscheidet (Brookes, 1999).

1.4 Das Nierenzellkarzinom

Eine der Tumorerkrankungen, bei denen der Einfluss von genetischen Veränderungen auf die Entstehung nachgewiesen ist, ist das Nierenzellkarzinom (Sidhar *et al.*, 1996, Werman *et al.*, 1996, Bühling *et al.*, 2008).

Mit ungefähr 3 % der malignen Tumore ist das Nierenzellkarzinom (Synonyme: Hypernephrom oder Grawitz-Tumor) relativ selten, tritt aber als dritthäufigster urologischer Tumor nach dem Prostata- und dem Harnblasenkarzinom in diesem Fachbereich auf. Die Inzidenz in Deutschland liegt bei 9 von 100.000 Einwohnern pro Jahr. Jedes Jahr erkranken in Deutschland etwa 15.000 Menschen an diesem Karzinom, Männer sind etwa dreimal häufiger betroffen als Frauen. In Afrika und Asien ist die Inzidenz geringer (Motzer *et al.*, 1996). Der Erkrankungsgipfel der Männer liegt im Mittel um das 68. Lebensjahr, bei Frauen im Alter von 71 Jahren. Die Mortalität wird mit 2,6 % aller Krebssterbefälle bei Männern und mit 2,1 % bei Frauen angegeben. Die relative 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 75 % bei Männern und bei 77 % bei Frauen (AWMF S3-Leitlinie Nierenzellkarzinom, 2017).

Früherkennungsmethoden existieren bislang nicht (AWMF S3-Leitlinie Nierenzellkarzinom, 2017).

Mehrere Risikofaktoren werden für das Auftreten eines Nierenzellkarzinoms verantwortlich gemacht. Hierzu zählen genetische Faktoren wie das männliche Geschlecht, Zystenieren, das von-Hippel-Lindau- und das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom, veränderbare Faktoren wie Rauchen, Übergewicht, Hypertonie und antihypertensive Medikation, Östrogeneinnahme und die chronische Niereninsuffizienz, sowie Toxine wie Petroleum, Kadmium und Asbest (Cho *et al.*, 2015, Ljungberg *et al.*, 2011, AWMF S3-Leitlinie Nierenzellkarzinom, 2017). Allerdings ist der Einfluss auf das Gesamtrisiko noch nicht vollständig erforscht.

Histologisch werden verschiedene Subtypen unterschieden. Die häufigste Form ist das klarzellige Nierenzellkarzinoms, welches seinen Ursprung im proximalen Tubulussystem hat. Als Entstehungsmöglichkeit wird ein Fragmentverlust am Chromosom 3 vermutet (Bühling, *et al.*, 2008). Im Genom papillärer Nierenzellkarzinome, der zweithäufigsten Entität, konnte die Translokation $t(X;1)(p11.2;q21.2)$ nachgewiesen werden (Sidhar *et al.*, 1996, Weterman *et al.*, 1996).

In aktuellen Studien wurde bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen eine erhöhte Aktivität der Kinase mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) festgestellt (Cao *et al.*, 2012, Husseinzadeh, Garcia 2011). Hier wird ein Zusammenhang mit dem Auftreten des Karzinoms vermutet.

1.5 Mechanistic Target of Rapamycin Kinase (mTOR)

Die Kinase mTOR ist die Zielstruktur des Immunsuppressivums Rapamycin, welches die Proteinfunktion hemmt.

Die Funktion der Serin-/Threonin-Kinase mTOR ist die Steuerung von Zellwachstum und Zellzyklus. Sie ist in eine Signalkaskade eingebunden, welche die Wachstumsfaktoren, den Energiehaushalt, die Sauerstoffkonzentration der Zelle und die Translation von Proteinen reguliert (Hanna *et al.*, 2008).

In der Zelle liegt mTOR in zwei Proteinkomplexen vor (Bhaskar, Hay, 2007). Der mTOR complex 1 (mTORC1) mit Raptor (regulatory associated protein of mTOR) und mLST8/G β L (mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein, LST8 steht für „lethal with sec thirteen 8“) (Kim *et al.*, 2002) kann von Rapamycin gehemmt werden (Choi *et al.*, 1996, Hudes, 2009, LoPiccolo *et al.*, 2008, Murakami *et al.*, 2004, Bhaskar, Hay, 2007).

Die Aktivierung von mTOR erfolgt über die Proteinkinase B (AKT). Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel die eines Tumors, aktivieren die Rezeptortyrosinkinase, welche über die Phosphatidylinositol-3-Kinase die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der AKT bewirkt. Diese hemmt den TSC-Komplex (Tuberous Sclerosis Complex), welcher dadurch den mTORC1 nicht mehr hemmen kann. mTORC1, aktiviert dadurch Ribosomen, bewirkt sowohl die Transkription von u. a. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) für die Angiogenese als auch von Faktoren für die Adipogenese und sorgt allgemein für Zellwachstum (Hay, Sonenberg, 2004).

Bei Nahrungsmangel wird in mehreren Schritten der TSC-Komplex aktiviert, welcher dann mTORC1 hemmt (Dennis *et al.*, 2001). Pharmakologisch hemmt das Immunsuppressivum Rapamycin den mTORC1, wodurch u. a. die Transkription, die Expression von VEGF und das Zellwachstum gehemmt werden, was in der klinischen Therapie Anwendung findet (Raught *et al.*, 2001).

Der zweite Komplex ist mTORC2, in dem mTOR mit Rictor, dem rapamycin-insensitive companion of mTOR, G β L, und mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1) vorliegt. Dieser Komplex reagiert nicht auf Rapamycin (Brown *et al.*, 1994, Murakami *et al.*, 2004).

Der Komplex mTORC2 ist für den Aufbau des Zytoskelettes, die Organisation von Aktinfilamenten, das Zellüberleben und die Zellteilung zuständig (Brown *et al.*, 1994, Hu-

1.6 Das *MTOR*-Gen

Das *MTOR*-Gen ist auf Chromosom 1p36.22 in antisense Richtung lokalisiert (Abbildung 2). Ein Synonym lautet FK506-Binding Protein 12-Rapamycin Complex-Associated Protein 1, kurz FRAP1. Das 156 kb umfassende Gen enthält 58 Exons und 57 Introns, die mRNA des Gens ist 8733 Basen lang und codiert für 2.549 Aminosäuren (Brown *et al.*, 1994, Zining, Lu *et al.*, 2016). Das errechnete Molekulargewicht des zugehörigen Proteins mTOR beträgt etwa 300 kD (Brown *et al.*, 1994). Das Startcodon ATG liegt in Exon 2, das Stopp-Codon TAA in Exon 58.



Abbildung 2: Lage von *mTOR* auf dem Chromosom 1p36.22, Darstellung in sense-Richtung, Abbildung nach Genom data viewer (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2475), zuletzt abgerufen am 01.11.2018

Mehrere SNPs im *MTOR*-Gen und dessen Promotor sind beschrieben. Es finden sich einige Arbeiten zu den Auswirkungen dieser SNPs, die das Erkrankungsrisiko von Patienten mit kolorektalen Karzinomen, aber auch von Erkrankten mit Ösophaguskarzinomen und Nierenzellkarzinomen betreffen (Zining, Lu *et al.*, 2016).

Zwei SNPs sind hier von großer Bedeutung. Es handelt sich hierbei um die bereits nummerierten SNPs rs2295079 (-3099CG) und rs2295080 (-3162AC). Beide SNP liegen 63 bp voneinander entfernt in der 5'UTR-Region. Der SNP rs2295080 (-3162AC)¹ wurde bereits in Publikationen über chinesische Patienten mit Ösophaguskarzinomen, Nierenzellkarzinomen und Darmtumoren untersucht (Cao *et al.*, 2012, Zining, Lu *et al.*, 2016).

Die Genotypen-Verteilung des rs2295080 lag in einer Publikation von Chen *et al.* (2012) bei 1374 getesteten Probanden mit AA bei 61,28 %, AC 34,06 % und CC bei 4,66 %. Bei Cao *et al.* wurde 2012 bei 1470 chinesischen Probanden eine Genomverteilung von 60,68 % für AA, 33,67 % für AC und 5,65 % für CC gefunden. In beiden Studien liegen sämtliche Genotypenverteilungen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Arbeitsgruppe ermittelte ebenfalls das A-Allel als Risikofaktor für das Auftreten eines Nierenzellkarzi-

¹ In den bisher veröffentlichten Studien wurde der SNP – anders als in dieser Arbeit – in Sense-Richtung der DNA benannt. Daher wurden die T- und G-Allele beschrieben und verglichen. Um Missverständnissen vorzubeugen wurde die Nomenklatur des Artikels auf die in dieser Arbeit verwendete angepasst.

noms. Ebenso fanden sie heraus, dass eine erhöhte Expressionsrate von mTOR bei Trägern des A-Allels vorlag (Cao *et al.*, 2012).

Hildebrandt *et al.* veröffentlichten 2009 eine Studie zum SNP rs2295080 bei kaukasischen Patienten mit Ösophaguskarzinomen. Eine Untersuchung der Auswirkungen bei kaukasischen Patienten mit Nierenzellkarzinomen existiert noch nicht.

2016 wurde von Zining und Lu *et al.* eine Metaanalyse zu allen bis dato veröffentlichten Studien zum Krebsrisiko und *MTOR*-Polymorphismen veröffentlicht. Die Schlussfolgerungen dieser Metaanalyse ergaben, dass bei den untersuchten Karzinomen (Magenkarzinom, Prostatakarzinom, Nierenzellkarzinom, Ösophaguskarzinom, akute lymphatische Leukämie und akute myeloische Leukämie) kein erhöhtes Krebsrisiko eines der drei Genotypen des SNP rs2295080 vorlag. Eine genauere Analyse zum Nierenzellkarzinom wird in der Metaanalyse nicht vorgenommen.

Die aktuelle Studienlage bezieht sich ausschließlich auf das Krebsrisiko der Genotypen des rs2295080 (-3162AC) zu diversen Karzinomen. Eine Überlebensanalyse, abhängig von einem Genotyp, wurde bislang nicht veröffentlicht. Bisher existieren keine Studien zum SNP rs2295079 (-3099CG). In der Literatur sind lediglich die Allelfrequenzen bei Kaukasern, Asiaten und Afrikanern beschrieben.

1.7 Thema der Arbeit

Die aktuelle wissenschaftliche Forschung hat mit mTOR einen erfolgversprechenden Ansatzpunkt zum Eingriff in die Signalwege der Tumorsuppression und des Tumorwachstums gefunden (Brown *et al.*, 1994). In den Studien stand insbesondere die Betrachtung des Nierenzellkarzinoms im Vordergrund unter der Berücksichtigung der Genotypenverteilung des SNP rs2295080 (-3162AC) im Promotor des *MTOR*-Gens (Zining, Lu *et al.*, 2016). Diese Studie bezog sich ausschließlich auf chinesische Patientenkollektive. Bisher ist weder eine Genotypisierung des SNP rs2295080 (-3162AC) bei kaukasischen Patienten mit Nierenzellkarzinomen erfolgt, noch ein Vergleich zwischen der Genotypenverteilung zwischen Patienten und einem gesunden Normalkollektiv.

Neben dem SNP rs2295080 (-3162AC) ist ein weiterer SNP in der Promotorregion des *MTOR*-Gens bekannt. Dieser trägt die Bezeichnung rs2295079 (-3099CG) und liegt nur 63 bp entfernt. Somit ist naheliegend, dass auch dieser SNP Einflüsse auf die Expression des mTOR-Proteins haben kann. Gegebenenfalls besteht die Möglichkeit, dass beide SNPs

voneinander abhängig und Studienergebnisse des einen SNP auf den anderen SNP übertragbar sind.

In einer Studie mit Zelllinien konnte eine verminderte Expression des mTOR-Proteins bei Trägern des Genotyps -3162CC im Gegensatz zum Genotyp -3162AA nachgewiesen werden (Cao *et al.*, 2012). Die Ursache dafür ist noch unklar. Bislang sind noch keine Daten zu Bindungen von Transkriptionsfaktoren erhoben worden. Daher wurde in dieser Arbeit sowohl für den SNP rs2295080, als auch den SNP rs2295079 untersucht, ob spezifische Bindungsproteine für die Genotypen vorliegen und ob diese die Funktionalität beeinflussen können.

Weiterhin ist bekannt, dass die Hemmung des mTOR-Proteins eine etablierte Therapie in der medikamentösen Behandlung fortgeschrittener, maligner Erkrankungen ist. Hier konnten Erfolge in der Verlängerung des Überlebens von Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom erbracht werden (Husseinzadeh, Garcia, 2011). Allerdings sprechen nicht alle Patienten gleichermaßen auf die Therapie an. Für den SNP rs2295080 (-3162AC) wurde bereits durch Cao *et al.* (2012) ein Einfluss der Genotypenverteilung auf die Auftretenswahrscheinlichkeit eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms nachgewiesen. Untersuchungen zum Überleben sowie zum SNP rs2295079 (-3099CG) liegen bisher nicht vor. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Genotypenverteilung des SNP rs2295079 (-3099CG) Einfluss auf das Überleben, die Progression und die Metastasierung hat.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Autoklav	Varioklav, HP-Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Brutschrank	memmert, Greif-Laborlösungen, Karlsruhe, Deutschland Queue systems, Parkersburg, USA
Feinwaage	Denver Instrument, NY, USA
Gel-Dokumentationssystem	INTAS, Göttingen, Deutschland
Heizblöcke	Eppendorf, Hamburg, Deutschland HLC, Bovenden, Deutschland
Inkubationsschüttler	IKA, Staufen, Deutschland New Brunswick Scientific, Edison, USA
Magnetrührer	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop	Nikon, Minato, Japan
Mikrowellen	Severin, Sundern, Deutschland
Netzgeräte	Bio-Rad, Hercules, USA Consort, fisher scientific, Schwerte, Deutschland Appligene oncor, Illkirch, Frankreich LKB Macrodrive, LKB, Bromma, Schweden
Odyssey imaging system	Li-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA
pH-Meter	Metrohm, Herisau, Schweiz
Pipetten	Finnpipette (Labystems), fisher scientific, Schwerte, Deutschland Eppendorf multipipette, Hamburg, Deutschland Eppendorf multichannel, Hamburg, Deutschland Matrix multichannel, fisher scientific, Schwerte, Deutschland
Spectrometer	Nanodrop, fisher scientific, Schwerte, Deutschland
Thermo-Cycler	Biometra (Uno, UnoII, TGradient), Göttingen, Jena
Wasserbad	julabo, Seelbach, Deutschland

Sicherheitswerkbank	Microflow Biological Safety Cabinet, Astec-Microflow, Hampshire, USA
Zellzähler	CASY 1, OLS OMNI Life Science, Bremen, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus PICO 17 Heraeus, Hanau, Deutschland Biofuge 13, Biofuge A, Megafuge 1.0, Biofuge pico, Heraeus, Hanau, Deutschland ROTINA, Hettich, Mülheim a. d. Ruhr, Deutschland

2.1.2 Restriktionsenzyme

Die verwendeten Enzyme waren *BaeGI* und *BseYI* mit den Puffern NEB 1 und NEB 3 (New England Biolabs (NEB), Ipswich, Massachusetts, USA).

BaeGI aus *Bacillus aestuarii* GG790

Erkennungs- und Schnittsequenz:

```
5'...GKGCM▼C...3'
3'...▲CMCGKG...5'
```

K= G oder T; M= A oder C

BaeGI schneidet nur das C-Allel des SNP -3099CG.

BseYI aus *Bacillus species* 2521 (C. Nkenfou)

Erkennungs- und Schnittsequenz:

```
5'...▼C▼CCAGC...3'
3'...GGGTC▲G...5'
```

BseYI schneidet nur das C-Allel des SNP -3162AC.

2.1.3 DNA

Zur Genotypisierung der SNPs rs2295080 und rs2295079 wurde DNA gesunder, freiwilliger Blutspender aus Essen (n=120), aus Simbabwe (n=120) und aus China (n=120) verwendet. Hierbei handelte es sich um zufällig ausgewählte DNA-Proben eines größeren, bereits etablierten Kollektivs (Siffert *et al.*, 1999).

Die Untersuchung des SNPs rs2295079 erfolgte zudem an einem vorhandenen, anonymisierten, historischen Kollektiv kaukasischer Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzino-

men (n=142), die im Universitätsklinikum Essen behandelt wurden, Ethikvotum 06-3126 (Frey *et al.*, 2006). Eingeschlossen wurden alle Patienten, von denen genetisches Material zur Verfügung stand.

2.1.4 PCR-Primer

Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland synthetisiert.

2.1.4.1 Sequenzierprimer

Sense-Primer 5'-GCCACCGTGA CCAGCACT-3'
Antisense-Primer 5'-TAATGTCCAG ACCCACGGC-3'

Mit Hilfe beider Primer ließ sich ein 1183 bp langes DNA-Stück amplifizieren, welches den Promotor, das erste Exon und ein Teil des ersten Introns des *MTOR*-Gens (Position -4161 bis -2979 vom ATG) enthielt. Beide SNPs waren in dem PCR-Produkt erfasst. Anschließend wurden neue, kürzere DNA-Fragmente für die Genotypisierung erstellt.

2.1.4.2 Genotypisierungsprimer

Primer zur Genotypisierung des rs2295080 (-3162AC); Größe des Produkts 422 bp.

Sense-Primer 5'-TCCTAGCAGC GCCGTACCGG ATGT-3'
Antisense-Primer 5'-AATGTCCAGA CCCACGGCCA GC-3'

Primer zur Genotypisierung des rs2295079 (-3099CG); Größe des Produkts mit Antisense-Primer 1: 129 bp, mit Antisense-Primer 2: 114 bp.

Sense-Primer 5'-AGAGGACAGC GGGGAAGGC-3'
Antisense-Primer 1 5'-CTGGCACGAC CCCTCTAGGG-3'
Antisense-Primer 2 5'-CGGTGAGTCT AGGGCCTGGC-3'

Für die Genotypisierung von rs2295079 (-3099CG) aus DNA aus Blut wurde der Sense-Primer mit dem Antisense-Primer 1 verwendet. Bei der Verwendung von FFPE-Gewebe (Formalin-fixiertes, paraffin-eingebettetes Gewebe) wurde die DNA durch die Paraffinein-

bettung geschädigt (Schweiger *et al.*, 2009). Daher war es notwendig, kürzere DNA-Stücke mit Antisense-Primer 2 zu amplifizieren. Dies war bei der Genotypisierung der Nierenzellkarzinompatienten notwendig.

2.1.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)-Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Hergestellt wurden diese von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland). Alle Oligonukleotide enthielten an ihrem 3'-Ende die universelle labeled universal electrophoretic gel shift oligonucleotide (LUEGO)-Bindungssequenz (5'-ccagaccagggcac-3') für den gelabelten LUEGO-Primer (Bioscience, Lincoln, NE, USA), um diese später im Gel visualisieren zu können (Jullien, Herman, 2011).

3162A SE dezentrisch:	tcgattggtcctcaggg A tgggaaccctc ccagaccagggcac
3162A AS dezentrisch:	gaggggttccca T ccctgaggaccaatcga ccagaccagggcac
3162C SE dezentrisch:	tcgattggtcctcaggg C tgggaaccctc ccagaccagggcac
3162C AS dezentrisch:	gaggggttccca G cctgaggaccaatcga ccagaccagggcac
3099C SE dezentrisch:	gaaggcgggcggtggggca C ggggcctgaagc ccagaccagggcac
3099C AS dezentrisch:	gcttcaggcccc G tgccccaccgcccgcctc ccagaccagggcac
3099G SE dezentrisch:	gaaggcgggcggtggggca G ggggcctgaagc ccagaccagggcac
3099G AS dezentrisch:	gcttcaggcccc C tgccccaccgcccgcctc ccagaccagggcac
3162A SE zentrisch:	ttggtcctcaggg A tgggaaccctcct ccagaccagggcac
3162A AS zentrisch:	aggaggggttccca T ccctgaggaccaa ccagaccagggcac
3162C SE zentrisch:	ttggtcctcaggg C tgggaaccctcct ccagaccagggcac
3162C AS zentrisch:	aggaggggttccca G cctgaggaccaa ccagaccagggcac
3099C SE zentrisch:	gggcggtggggca C ggggcctgaagcg ccagaccagggcac
3099C AS zentrisch:	cgcttcaggcccc G tgccccaccgccc ccagaccagggcac

3099G SE zentrisch: gggcgggtggggcaGggggcctgaagcg ccagaccagggcac

3099G AS zentrisch: cgcttcaggccccCtgccccaccgccc ccagaccagggcac

Mit DY682 gelabelter LUEGO-Primer: gtgccttggtctgg

ungelabelter LUEGO-Primer: gtgccttggtctgg

2.1.6 Zelllinien

Für die EMSAs wurden Zellkernextrakte aus Hek293-Zellen verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Linie von menschlichen, embryonalen Nierenzellen, die mit DNA des humanen Adenovirus 5 versetzt wurden und dadurch die Apoptosefähigkeit verloren haben (Graham *et al.*, 1977).

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus Blut oder Tumorgewebe der Patienten bzw. Blutspender erfolgte nach Anleitung des „QIAamp® DNA Mini and Blood Mini-Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland). Für die Genotypisierung wurde im Institut vorhandene DNA der zuvor beschriebenen, ethnischen Kollektive (Siffert *et al.*, 1999) verwendet. Bei einigen Proben war nicht ausreichend Material vorhanden, weswegen DNA aus bei -20° C gelagertem Blut gewonnen werden musste.

Das Prinzip des Kits ist der Transfer von isolierter DNA auf eine Silica-Membran, das Waschen der Membran und die Elution durch ein Solvent, entweder durch H₂O_{bidest} oder Pufferlösungen. Verwendet wurde die dem Kit beiliegende Pufferlösung (10 mM Tris Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0).

Die DNA musste zuerst aus den Zellkernen und den Zellen gewonnen werden. Dazu inkubierte man 200 µl EDTA-Blut mit 20 µl Proteinase K (>600 mAU/ml) in 200 µl Lysepuffer aus dem Kit für 10 Minuten bei 56° C. Dadurch wurden die Zellmembranen und Kerne

zerstört, die DNA befand sich im entstandenen Überstand. Danach wurden 200 µl 100 % Ethanol hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde auf die oben beschriebene Filtersäule übertragen und die DNA durch Zentrifugation für eine Minute bei 6000 x g (8000 rpm) auf den Filter der Säule überführt. Es folgten zwei Waschschrte (500 µl Waschpufferlösung aus dem Kit, erst 1 min, 6000 x g (8000 rpm), dann, 20000 x g (13000 rpm), drei Minuten). Hierdurch wurde die DNA von Salzen und Lösungsmitteln gereinigt. Anschließend wurde die Membran mit 200 µl des Elutions-Puffers aus dem Kit eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert, danach bei 6000 x g (8000 rpm) eine Minute zentrifugiert und so die DNA von der Siliziumdioxid-Membran der Säule in das Lösungsmedium überführt.

Die DNA aus Tumorgewebe wurde ebenfalls mit dem „QIAamp® DNA Mini and Blood Mini-Kit“ der Firma QIAGEN gewonnen. 25 mg Tumorgewebe aus Paraffinschnitten wurde zuerst mechanisch zerteilt und danach mit 180 µl Lysepuffer-Lösung aus dem Kit vermischt. Anschließend wurde das Gemisch mit 20 µl der Proteinase K (> 600 mAU/ml) bei 56° drei Stunden inkubiert. Danach wurden 4 µl RNase A (100 mg/ml) hinzugegeben, das Medium aufgeschüttelt und anschließend zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl eines weiteren Lysepuffers hinzugegeben und das Gemisch bei 70° C zehn Minuten inkubiert. Danach wurde das Gemisch auf die oben beschriebene Filtersäule mit der Siliziumdioxid-Membran übertragen und bei 6000 x g (8000 rpm) eine Minute lang zentrifugiert. Die weiteren Waschschrte erfolgten analog zur DNA-Extraktion aus Blut. Anschließend wurde die Filtersäule zweimal mit jeweils 200 µl Elutions-Puffer eine Minute inkubiert und eine Minute bei 6000 x g (8000 rpm) zentrifugiert. Dies bewirke nach Angaben der Herstellerfirma eine Erhöhung der DNA-Ausbeute aus der Filtersäule.

2.2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mit Hilfe dieses Verfahrens, für das 1993 Kary Mullis der Nobelpreis für Chemie verliehen wurde, ist man in der Lage, bestimmte Gensequenzen *in vitro* zu vervielfältigen. Für diese Methode werden eine Matrize, eine hitzestabile Polymerase, DNA-Primer und eine durch Puffer optimierte Umgebung für das Enzym benötigt.

Als Enzym hat sich unter anderem die *Taq*-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* bewährt. Diese ist hitzestabil und somit während der gesamten Reaktionszeit aktiv.

Die PCR besteht aus mehreren Zyklen mit jeweils drei gleichen Schritten, die Denaturierung der DNA, das Annealing der Primer und die Elongation (Mullis *et al.*, 1986).

Die Denaturierung (30 sec) findet normalerweise bei 93-96° C statt. Bei dieser Temperatur lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der Doppelhelix, das Erbgut liegt danach in Einzelsträngen vor.

Im Schritt des Annealings wird die Temperatur schnell auf 55-70° C gesenkt (je nach verwendetem Primerset). Dieser Schritt dauert in der Regel 30 Sekunden. In diesem Temperaturbereich lagern sich die zugefügten Primer an ihre Bindungsstelle an. Die optimale Annealing-Temperatur muss mittels einer Gradienten-PCR ermittelt werden. Sie hängt unter anderem vom PCR-Ansatz, der Primerkonzentration, der Primerlänge und dem Gehalt an Cytosin und Guanin ab. Bei der Gradienten-PCR laufen mehrere gleiche Reaktionen bei verschiedenen Temperaturstufen – in etwa 1-2° C-Schritten im Bereich zwischen 55° C und 70° C ab. Danach kann man anhand der entstandenen Produkt-Menge das Temperaturoptimum für diesen PCR-Ansatz bestimmen. Für die Sequenzierprimer lag die ideale Annealingtemperatur bei 60° C, für die Restriktionsprimer für das Fragment um -3162AC bei 65° C, für -3099CG (Sense und Antisense 1) bei 68° C und für das kurze Stück mit den Primern Sense und Antisense 2 bei 70° C.

Als letztes erfolgt die Elongation. Dazu wird die Temperatur im Thermocycler auf 72° C erhöht, das Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase. Die Dauer des Schrittes hängt von der Länge des gewünschten Abschnitts ab. Grob gerechnet braucht die *Taq*-Polymerase 30 Sekunden pro 500 bp. Diese Schritte werden 38-40 Mal wiederholt, um das Produkt exponentiell zu vermehren. Zur Veranschaulichung dient die Abbildung 3.

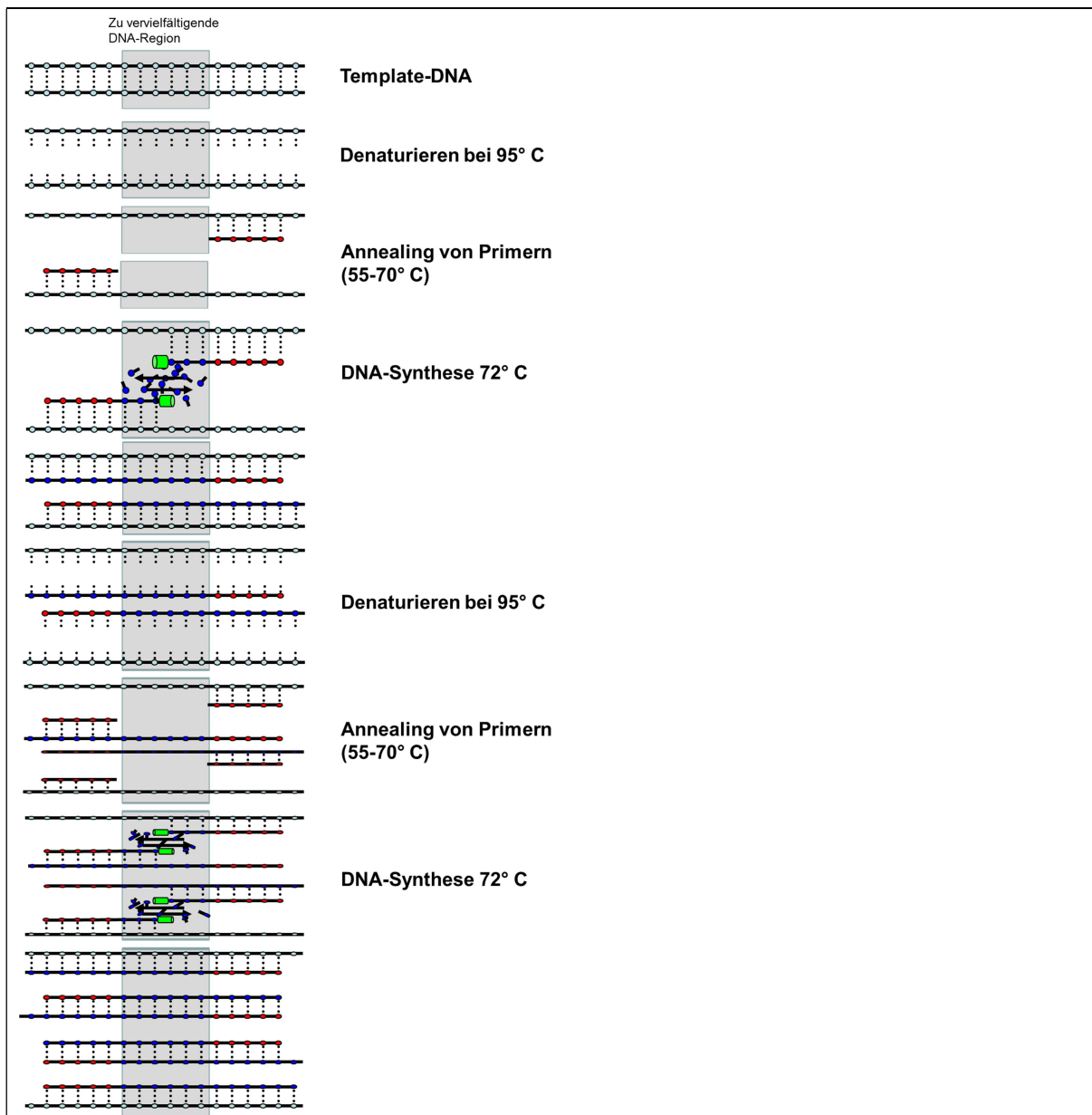


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Abläufe bei der PCR

Verwendete PCR-Ansätze:

Ansatz 40+2 μ l für die Gensequenzierung
 21 μ l *Taq*-Master-Mix (Ampliqon, Odense, Dänemark)
 je 1 μ l Primer Sense und Anti-Sense (1 pmol/ μ l)
 17 μ l Aqua bidest
 2 μ l DNA

Ansatz 30+2 μ l für die Genotypisierung
16 μ l *Taq*-Master-Mix (Ampliqon, Odense, Dänemark)
je 1 μ l Primer Sense und Anti-Sense (1 pmol/ μ l)
12 μ l Aqua bidest
2 μ l DNA

Einstellung des Thermocyclers für das Produkt zur Gensequenzierung

95° C 5 min
Anschließend 38 Zyklen à
95° C 30 sek
60° C 30 sek
72° C 45 sek
Abschließend
72° C 10 min

Einstellung des Thermocyclers für das Produkt zur Genotypisierung

95° C 5 min
Anschließend 38 Zyklen à
95° C 30 sek
Primer-Temperatur 30 sek
72° C 30 sek
Abschließend
72° C 10 min

2.2.3 DNA-Analyse

2.2.3.1 Kettenabbruch-Methode nach Sanger

Die Kettenabbruch-Sequenzierung wurde von einem kommerziellen Labor übernommen (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland). Daher folgt hier die Beschreibung des Verfahrens in der Theorie.

Die Didesoxymethode wird als enzymatisches Verfahren mittels PCR durchgeführt. Zusätzlich zu den Desoxyribonukleotiden (dNTP) enthält der Ansatz jeweils einen kleinen

Anteil an mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Didesoxyribunukleotidtriphosphaten (ddNTP). Dieses hat an seinem 3'-Ende keine OH-Gruppe, sodass die DNA-Synthese über diese Stelle hinaus nicht weiterlaufen kann und abbricht. Die PCR wird durchgeführt und durch den Zusatz an ddNTPs finden sich hinterher unterschiedlich lange DNA-Stränge nach der Reaktion. Diese werden mittels einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt und durch einen Laser werden die ddNTPs am Ende der Stränge zur Fluoreszenz gebracht. Ein Detektor erkennt die Farbe und wandelt diese in ein Chromatogramm um. Das fertige Ergebnis ist der sequenzierte DNA-Strang (Sanger *et al.*, 1977a). Eine Beispielabbildung eines Chromatogramms findet sich in der Abbildung 4.

Technisch bedingt liegt die Reichweite dieser Methode bei ungefähr 800-1000 Basen. Nach diversen Abbruchreaktionen ist nicht mehr genug genetisches Material vorhanden um weitere Reaktionen auszuführen (Sanger *et al.*, 1977a, Sanger *et al.*, 1977b).

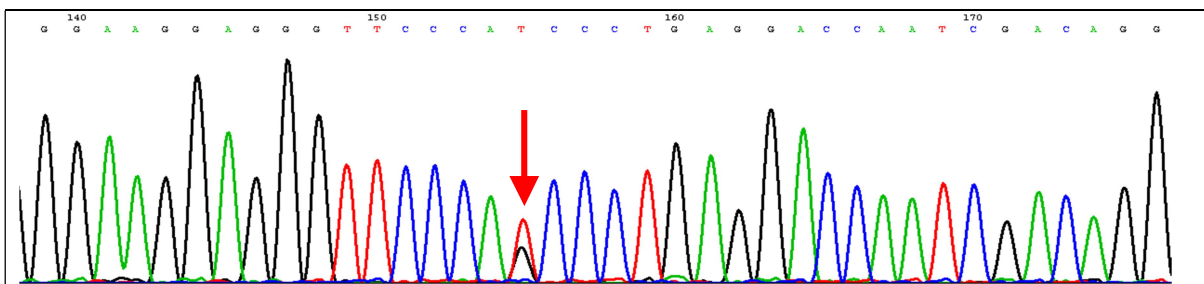


Abbildung 4: Darstellung eines Chromatogramms nach einer Kettenabbruchsynthese. Jeder Kurvenausschlag steht für eine Base. Bei Doppelausschlägen handelt es sich um einen SNP (Pfeil).

2.2.3.2 Agarose-Gel-Elektrophorese

Für Agarose-Gele wurde der 10x TBE-Puffer 1:20 auf 0,5x mit Aqua bidest verdünnt. Die verwendete Agarose wurde von der Firma Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland, bezogen. Es wurden Gele mit Agarose-Konzentrationen zwischen 1,5 und 2,5 % hergestellt. Hierzu wurden 3,75 g Agarose in 250 ml 0,5x TBE-Puffer (für 1,5 %iges Gel) erhitzt, gelöst und anschließend in einer Form mit einer Vorrichtung für die Geltaschen erkalten lassen. Zur Visualisierung der DNA wurde der warmen Agarose-Lösung Sybr™ Safe (1:100.000, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA). Die Elektrophorese nach der Restriktion der kurzen Fragmente mit dem Enzym *BaeGI* erfolgte in einem 2,5 %igem Agarose-Gel. Hierzu wurden 6,25 g Agarose in 250 ml 0,5x TBE-Puffer nach der oben genannten Anleitung verarbeitet.

10x TBE-Puffer

TrisBase 108 g

Borsäure 55 g

EDTA 7,44 g

ad 1 Liter Aqua bidest

Titrierung mit 1 M Natronlauge (NaOH) auf einen pH-Wert von 7,0

Die Chemikalien wurden von der Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland bezogen. Der Puffer wurde autoklaviert.

2.2.3.3 Gel-Extraktion

Für die Gelextraktion wurde das Zymoclean TM Gel DNA Recovery Kit (HISS, Freiburg, Deutschland) verwendet. Unter einem UV-Geldokumentationssystem wurden einzelne DNA-Banden aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend nach der Anleitung des oben genannten Kits aus der Agarose gelöst.

2.2.3.4 Restriktionsverdau

Das zweite angewandte Verfahren zur Genotypisierung war der sogenannte enzymatische Restriktionsverdau. Hierfür ist Voraussetzung, dass die DNA-Sequenz bekannt ist. Der Restriktionsverdau ist ein selektives Verfahren, in dem eine bekannte DNA-Sequenz detektiert wird.

Die benötigten Enzyme wurden mit dem NEBcutter V2.0, einer frei über das Internet verfügbaren Software der Firma NEB, ermittelt (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

Mit für die unterschiedlichen Genotypen spezifischen Restriktionsenzymen wurden die PCR-Produkte bei optimaler Enzymarbeitstemperatur, hier bei 37° C und enzyspezifischen Pufferbedingungen über Nacht inkubiert. Nach einer Agarose-Gelelektrophorese ließ sich das Ergebnis unter UV-Licht untersuchen. Es ermöglichte die Unterscheidung zwischen den zwei homozygoten und dem einen heterozygoten Genotyp.

Der Restriktionsverdau zur Identifizierung der Genotypen des SNP rs2295080 (-3162AC) aus dem PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *Bse*YI ergab folgende Ergebnismuster:

CC: geschnitten	234 + 188 bp
AC: geschnitten und ungeschnitten	422 + 234 + 188 bp
AA: ungeschnitten	422 bp

Zur Detektion der Genotypen des SNP rs2295079 (-3099CG) im Blut wurde das PCR-Produkt mit dem Enzym *Bae*GI inkubiert und folgende Ergebnisse erwartet:

CC: geschnitten	97 + 32 bp
CG: geschnitten und ungeschnitten	129 + 97 + 32 bp
GG: ungeschnitten	129 bp

Analog dazu ergab die Genotypisierung des SNP rs2295079 (-3099CG) des PCR-Produkts von DNA aus Paraffinblöcken mit dem Enzym *Bae*GI die folgenden Muster zur Identifikation der Genotypen:

CC: geschnitten	82 + 32 bp
CG: geschnitten und ungeschnitten	114 + 82 + 32 bp
GG: ungeschnitten	114 bp

30 µl Ansatz für die Restriktion:

16,8 µl Aqua bidest

3 µl NEB Puffer

0,2 µl Enzym (= 20 Units)

10 µl PCR-Produkt

Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37° C über Nacht.

2.2.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der EMSA gehört zu den Affinitäts-Elektrophoresen und ist ein Verfahren zur Detektion von Protein-Bindungen an DNA- oder RNA-Fragmente. Dabei wurden Proteingemische aus Zellkernen mit Oligonukleotid-Stücken aus Promotoren oder Exonen inkubiert. Mit speziellen Kompetitionsverfahren wurde die Spezifität der Bindung zum zu untersuchenden DNA-Stück differenziert. Durch die Proteinbindung waren die Fragmente schwerer

und bewegten sich langsamer in einem elektrischen Feld in einem Acrylamid-Gel (Garner, Revzin, 1981).

Der EMSA zeigt Bindungen zwischen spezifischen Adhäsionsmolekülen aus Zellkernen an der DNA in Form von Banden. Die gebundenen DNA-Fragmente bewegen sich langsamer im Gel während einer Elektrophorese als ungebundene Fragmente. Da ein vollständiger DNA-Strang keine verwertbaren Ergebnisse hervorbringen würde, werden kurze Fragmente verwendet, die den jeweils zu untersuchenden SNP beinhalten. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide hatten Längen von 26-32 bp (Abbildung 7, Seite 28 und Abbildung 8, Seite 29).

2.2.4.1 Kultivierung von Hek293-Zellen

Die Hek293-Zellen wurden in Kultivierungsflaschen in DMEM-Medium, versetzt mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10% fetal bovine Serum, bei 37° C unter einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80-90 % in einem Brutschrank kultiviert. Die verwendeten Medien wurden von der Firma PAA Laboratories, Pasching, Österreich bezogen. Alle Arbeiten mit Kulturzellen fanden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank statt. Die Oberflächen wurden vor und nach den Arbeiten mit 70 %-igem Alkohol desinfiziert. Außerdem wurden nur steril verpackte oder zuvor autoklavierte Arbeitsmaterialien verwendet.

2.2.4.2 Herstellung von Zellkernextrakten

Transkriptionsfaktoren befinden sich im Zellkern. Daher mussten die Zellen so präpariert werden, dass nur noch die Kernproteine erhalten blieben.

Für die Herstellung wurden Zellkernextrakte aus Kulturzellen der Zellreihe Hek293 verwendet. Die einzelnen Schritte erfolgten nach der Anleitung des CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit For mammalian tissue or cultured cells (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland).

Zunächst wurden die Hek293-Zellen aus der Kulturflasche abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die weiteren Schritte erfolgten auf Eis oder bei einer Temperatur von 4° C. Reste der Kulturmedien wurden bei 1100 rpm abzentrifugiert, die Zellen zwei-

mal mit PBS-Puffer gewaschen und der Puffer wieder bei 1100 rpm abzentrifugiert. Im Anschluss wurde das Volumen der Zellen (Zellpackvolumen) bestimmt, die fünffache Menge an Lysis-Puffer hinzugegeben und anschließend das Gemisch 15 Minuten auf Eis inkubiert. Unter dem Mikroskop zeigte sich ein Anschwellen der Zellen, aber keine Lyse. Anschließend wurde IGEPAL (10 %) hinzugegeben, sodass das Gemisch eine Konzentration von 0,6 % IGEPAL enthielt. Danach wurde das Reaktionsgefäß 15 Sekunden gevortext und sofort bei 13000 rpm 30 Sekunden bei 4° C zentrifugiert. Unter dem Mikroskop zeigten sich anschließend lysierte Zellen mit intakten Kernen. Das so entstandene Pellet wurde in ein frisches Röhrchen überführt und mit 2/3 des Zellpackvolumens mit Extraktionspuffer resuspendiert. Dieses Gemisch wurde 15-30 Minuten bei 4° C geschüttelt, danach bei 13000 rpm für fünf Minuten bei 4° C zentrifugiert. Der so entstandene Überstand enthielt die gewünschten Proteine (die Zellkernextrakte) und wurde bei -80° C eingefroren.

Lysis-Puffer (Sigma-Aldrich)

1x Lysis-Puffer	500 µl
0,1 M DTT	5 µl
Protease Inh. cocktail	5 µl

Extraktionspuffer (Sigma-Aldrich)

Extraktionspuffer	98 µl
0,1 M DTT	1 µl
Protease Inh. cocktail	1 µl

PBS (Sigma-Aldrich)

IGEPAL 10 % (Sigma-Aldrich)

2.2.4.3 *in silico*-Analyse der Transkriptionsfaktoren

Mögliche Bindungsproteine wurden *in silico* mit AliBaba2.1 auf der Internetseite www.gene-regulation.com ermittelt.

Für den rs2295080 (-3162AC) wurden der SP1 (Synonyme: simian-virus-40-protein-1; specificity protein 1; Stimulating Protein 1; stimulatory protein 1) (Jones, Tjian, 1985) für

das A-Allel und der NF1 (nuclear factor 1) (Ritzenthaler *et al.*, 1991) für das C-Allel als mögliche Transkriptionsfaktoren ermittelt (Abbildung 5).



Abbildung 5: Mögliche Transkriptionsfaktorbindungen an den Oligonukleotiden der beiden Allele des rs2295080 (-3162AC), Sense-Richtung

Für den rs2295079 (-3099CG) wurden ebenfalls der SP1 für das G-Allel und der USF1, der Upstream Stimulatory Factor 1 (Lefrancois-Martinez *et al.*, 1995), für das C-Allel als mögliche Bindungs- und Transkriptionsfaktoren ausgegeben (Abbildung 6).



Abbildung 6: Mögliche Transkriptionsfaktorbindungen an den Oligonukleotiden der beiden Allele des rs2295079 (-3099CG), Sense-Richtung

Es wurden zwei verschiedene Oligonukleotide für die EMSA verwendet, da die möglichen Transkriptionsfaktoren nicht gleichermaßen an die Oligonukleotide binden. Daher wurden Oligonukleotide hergestellt, in denen der SNP zentral lag und Oligonukleotide, in welchen der SNP dezentral an Position 20 lag (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8).

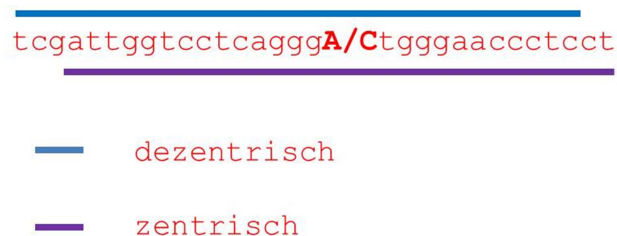


Abbildung 7: Position des SNP rs2295080 (-3162AC) auf dem zentrischen und dezentrischen Oligonukleotid, Sense-Richtung

gaaggcgggcggtggggca**C/G**ggggcctgaagcg

— dezentrisch

— zentrisch

Abbildung 8: Position des SNP rs2295079 (-3099CG) auf dem zentrischen und dezentrischen Oligonukleotid, Sense-Richtung

2.2.4.4 Labeling der Oligonukleotide

Damit Banden sichtbar gemacht werden können, müssen die Oligonukleotide markiert werden. Hierzu wurden alle Oligonukleotide zunächst auf 20 pmol/μl in 1 x TE Puffer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt. Anschließend wurden jeweils 5 μl der Sense- und Antisense-Oligonukleotide mit 5 μl des universellen, mit DY682 gelabeltem, LUEGO-Oligonukleotids (Jullien, Herman, 2011) in der Konzentration 100 pmol/μl nach folgendem Schema inkubiert: Inkubation des Gemischs für zwei Minuten bei 94° C, Absenkung der Temperatur auf 70°C, (-5° C pro Sekunde). Die 70° C wurden für fünf Sekunden gehalten. Anschließend langsames Kühlen des Oligonukleotid-Gemischs auf 18° C. Diese Temperaturstufe wurde für zehn Minuten gehalten, danach konnten die fertigen Oligonukleotide bei -20° C gelagert werden. Ein schematischer Aufbau des Oligonukleotid-Hybrids ist in Abbildung 9 dargestellt.

Die ungelabelten Oligonukleotide wurden analog hergestellt, hierzu wurden allerdings ungelabelte LUEGO-Oligonukleotide in der Konzentration von 100 pmol/μl verwendet.

Die gelabelten Oligonukleotide wurden auf die Konzentration von 25 fmol/μl mit Aquabidest verdünnt, die ungelabelten Oligonukleotide wurden auf die Konzentration von 1000 fmol/μl verdünnt.

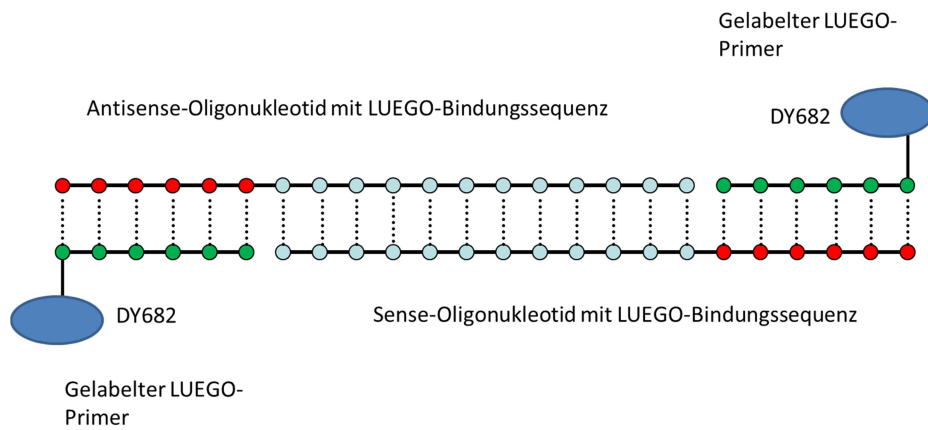


Abbildung 9: Schematischer Aufbau der Oligonukleotide. Das Sense- und Antisense-Oligonukleotid enthält jeweils am 3'-Ende eine LUEGO-Bindungssequenz, an die sich jeweils ein mit DY682 am 5'-Ende gelabelter LUEGO-Primer anlagert.

2.2.4.5 Herstellung des Acrylamid-Gels

Nach der gründlichen Reinigung zweier Glasplatten und der Plastikbegrenzungen der Gele mit 70 %-igem Alkohol wurde die Gießvorrichtung zusammgebaut. Als erstes wurde das Verschlussgel angefertigt und ca. einen Zentimeter hoch zwischen die Glasplatten eingefüllt. Danach wurde das Acrylamid-Gel hergestellt und auf das erstarrte Verschlussgel pipettiert. Mittels eines Kamms wurden die Taschen im Gel gebildet. Zur Auspolymerisierung wurde das Acrylamid-Gel erschütterungsfrei für einen Tag bei 4° C gekühlt aufbewahrt.

EMSA-Gel (6 % Acrylamid)

10x TBE-Puffer	2,0 ml
29:1 acrylamide/bisacrylamide (40 % w/v)	2,9 ml
40 % acrylamide (w/v)	3,1 ml
80 % Glycerol	1,25 ml
Aqua bidest	30,43 ml
TEMED	20 µl
10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)	300 µl

Verschluss-Gel

8 % Resolving-Puffer	3 ml
29:1 acrylamide/bisacrylamide (40 % w/v)	30 ml
TEMED	30 μ l
10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)	30 μ l

Alle Chemikalien wurden von der Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland bezogen.

2.2.4.6 Durchführung des EMSAs

Zunächst wurden acht Reaktionsgefäße nach unten genanntem Schema auf Eis befüllt. Anschließend inkubierten die Ansätze 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen. Danach wurden acht Taschen des Acrylamid-Gels beladen, jeweils vier Taschen pro Genotyp. Die erste Tasche stellte die Negativkontrolle mit LUEGO-gelabelten Oligonukleotiden, aber ohne Zellkernextrakte dar. Die zweite Tasche enthielt LUEGO-gelabelte Oligonukleotide und Zellkernextrakte. Die dritte Tasche wurde mit LUEGO-gelabelten Oligonukleotiden, Zellkernextrakten und mit einer 200-fachen Konzentration an den gleichen, nicht gelabelten Oligonukleotiden gefüllt. Die vierte Tasche wurde mit LUEGO-gelabelten Oligonukleotiden, Zellkernextrakten und einer 200-fachen Konzentration an ungelabelten Oligonukleotiden des anderen Genotyps befüllt. In der Tabelle 1 ist das Pipettierschema für den SNP rs2295079 (-3099CG) dargestellt.

Tabelle 1: Pipettierschema des EMSA rs2295079 (-3099CG) mit Hek293-Zellkernextrakten mit dem EMSA buffer Kit der Firma Li-COR Bioscience, alle Angaben in μ l

-3099CG Oligos HEK293 ZKE								
Reihe	1	2	3	4	5	6	7	8
Aqua dest	13,0	12,0	11,0	11,0	13,0	12,0	11,0	11,0
10x Binding Buffer (Tube 1)	2	2	2	2	2	2	2	2
25 mM DTT/2,5% Tween20 (Tube 2)	2	2	2	2	2	2	2	2
1 μg/ml Poly (dIdC) (Tube 3)	1	1	1	1	1	1	1	1
200 mM EDTA (Tube 9)	1	1	1	1	1	1	1	1
G Allel gelabelt (25 fmol/μl)	1	1	1	1				
Competition G Allel ungelabelt (40x)			1					1
C Allel gelabelt (25 fmol/μl)					1	1	1	1
Competition C Allel ungelabelt (40x)				1			1	
ZKE Hek293 (4 μg/μl)		1	1	1		1	1	1
Die Reagenzien wurden vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 2 μ l Orange G (Tube 10) hinzugefügt.								

Analog zum EMSA rs2295079 (-3099 CG) wurden EMSA des SNP rs2295080 (-3162 AC) angefertigt. Das Pipettierschema ist in der Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: Pipettierschema des EMSA rs2295080 (-3162AC) mit Hek293-Zellkernextrakten mit dem EMSA buffer Kit der Firma Li-COR Bioscience, alle Angaben in μ l

-3162AC Oligos HEK293 ZKE								
Reihe	1	2	3	4	5	6	7	8
Aqua dest	13,0	12,0	11,0	11,0	13,0	12,0	11,0	11,0
10x Binding Buffer (Tube 1)	2	2	2	2	2	2	2	2
25 mM DTT/2,5% Tween20 (Tube 2)	2	2	2	2	2	2	2	2
1 μg/ml Poly (dIdC) (Tube 3)	1	1	1	1	1	1	1	1
1 % NP-40 (Tube 6)	1	1	1	1	1	1	1	1
A Allel gelabelt (25 fmol/μl)	1	1	1	1				
Competition A Allel ungelabelt (20 x)			1					1
C Allel gelabelt (25 fmol/μl)					1	1	1	1
Competition C Allel ungelabelt (20 x)				1			1	
ZKE Hek293 (4 μg/μl)		1	1	1		1	1	1
Die Reagenzien wurden vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 2 μ l Orange G (Tube 10) hinzugefügt.								

Danach wurden mittels Elektrophorese im Dunklen bei konstant 150 Volt in 0,5x TBE-Puffer die Reaktionsgemische im Gel aufgetrennt.

2.2.4.7 Visualisierung der Banden

Nach der Elektrophorese wurde das Acrylamid-Gel in das Odyssey imaging system, ohne es vorher aus dem Glas herauszunehmen, gelegt und dort ausgelesen. Die mit IRDye® 700 (DY682) markierten LUEGO-Primer wurden mit einem Laser mit einer Wellenlänge von 700 nm angeregt und dann detektiert. Wenn die Abbildung noch kein eindeutiges Ergebnis brachte, konnte das Acrylamid-Gel zurück in die Elektrophorese-Kammer gestellt, weiter bei konstanter Spannung aufgetrennt und anschließend erneut ausgewertet werden.

2.2.5 Statistische Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ war. Die statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS 24 von IBM und GraphPad Prism 4.0 durchgeführt. Ausnahmen werden explizit erwähnt. Die Ausgangswerte der klinischen Parameter der Patientenkollektive wurden durch eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) für kontinuierliche Variablen und durch einen Chi-Quadrat-Test für kategorisierte Variablen getestet.

Mithilfe einer Cox-Regression wurde die Zeit bis zum Eintreten des Todes, des tumorassoziierten Todes, des Progresses und der Metastasierung analysiert. Hier wurde in einer Analyse ein Parameter (Univariatanalyse) und einer weiteren Analyse mehrere Parameter gegeneinander (Multivariatanalyse) als Einflussparameter getestet. Dadurch konnte die Effektstärke eines einzelnen Parameters im Vergleich zu den anderen herausgearbeitet werden.

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde mit Microsoft Excel 2010 errechnet. Hierzu wurde die frei verfügbare Datei der von der Seite www.dr-petrek.eu/documents/HWE.xls (zuletzt abgerufen am 01.11.2018) verwendet. Eine Population befand sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, wenn $p > 0,05$ war.

Die Einflussgrößen des Kopplungsungleichgewichts (linkage disequilibrium, LD), r^2 (quadratische Allel-Korrelation) und D' (LD-Koeffizient), wurden nach den Formeln aus der Publikationen von Abdallah *et al.* (2003) und Lewontin (1964a, 1964b, 1988) berech-

net. Ein Wert von 1 für r^2 und D' beispielsweise besagt, dass eine vollständige Kopplung der SNP vorliegt und dass die SNPs nie einer Trennung durch Rekombination unterlegen sind.

3. Ergebnisse

3.1 *MTOR*-Polymorphismen in verschiedenen Ethnien

3.1.1 rs2295080 (-3162AC)-Genotypenverteilung bei Gesunden

Die Ergebnisse der Genotypisierung des SNP rs2295080 (-3162AC) sind in den Tabelle 3, Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 3: Genotypenverteilung des SNP rs2295080 (-3162AC) bei gesunden Kaukasiern (n=120)

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
AA	60	50,00 %
AC	49	40,83 %
CC	11	9,17 %
A-Allelfrequenz 0,704		
C-Allelfrequenz 0,296		
HWE $\chi^2=0,048$		
HWE p=0,827		

Tabelle 4: Genotypenverteilung des SNP rs2295080 (-3162AC) bei gesunden Asiaten (n=120)

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
AA	76	63,87 %
AC	35	29,41 %
CC	8	6,72 %
A-Allelfrequenz 0,786		
C-Allelfrequenz 0,214		
1 Probe ohne Ergebnis		
HWE $\chi^2=1,906$		
HWE p=0,167		

Tabelle 5: Genotypenverteilung des SNP rs2295080 (-3162AC) bei gesunden Afrikanern (n=120)

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
AA	0	0,00 %
AC	4	3,33 %
CC	116	96,66 %
A-Allelfrequenz 0,017		
C-Allelfrequenz 0,983		
HWE $\chi^2=0,034$		
HWE p=0,853		

Die Genotypverteilungen aller Populationen waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Bei Kaukasiern und Chinesen war der Genotyp -3162AA am häufigsten anzutreffen, gefolgt vom heterozygoten Genotyp. Bei den Afrikanern hingegen war der Genotyp -3162CC der häufigste.

3.1.2 rs2295079 (-3099CG)-Genotypenverteilung bei Gesunden

Bei der Genotypisierung des SNP rs2295079 (-3099CG) zeigte sich folgendes Verteilungsmuster, dargestellt in den Tabelle 6, Tabelle 7 und Tabelle 8.

Tabelle 6: Genotypenverteilung des SNP rs2295079 (-3099CG) bei gesunden Kaukasiern (n=120)

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
CC	60	50,00 %
CG	49	40,83 %
GG	11	9,17 %
C-Allelfrequenz 0,704		
G-Allelfrequenz 0,296		
HWE $\chi^2=0,048$		
HWE p=0,827		

Tabelle 7: Genotypenverteilung des SNP rs2295079 (-3099CG) bei gesunden Asiaten (n=120)

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
CC	76	63,87 %
CG	35	29,41 %
GG	8	6,72 %
C-Allelfrequenz 0,786		
G-Allelfrequenz 0,214		
1 Probe ohne Ergebnis		
HWE $\chi^2=1,906$		
HWE p=0,167		

Tabelle 8: Genotypenverteilung des SNP rs2295079 (-3099CG) bei gesunden Afrikanern (n=120)

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
CC	0	0,00 %
CG	4	3,33 %
GG	116	96,66 %
C-Allelfrequenz 0,017		
G-Allelfrequenz 0,983		
HWE $\chi^2=0,034$		
HWE p=0,853		

Hier befand sich in allen Gruppen die Genotypverteilung im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Den Genotyp -3099CC traf man bei Kaukasiern und Chinesen am häufigsten, gefolgt vom heterozygoten Genotyp -3099CG. Bei den Afrikanern hingegen war der Genotyp -3099GG am häufigsten zu finden.

Wenn man die Ergebnisse des SNP -3162AC hinzuzieht, ist anzunehmen, dass die bei den Afrikanern vorrangig vorkommenden Genotypen -3162CC und -3099GG die entwicklungs geschichtlich älteren Genotypen sind („Out-of-Africa-Theorie“, Stringer, Andrews, 1988). Die Genotypen -3162AA und -3099CC sind damit die entwicklungs geschichtlich neuen Genotypen.

3.1.3 Vergleich der Genotypisierung der SNPs rs2295079 (-3099CG) und rs2295080 (-3162AC) innerhalb der Ethnien

Auffallend ist, dass die Ergebnisse der Genotypisierung der SNPs -3099CG und -3162AC der Ethnien entsprechen. In den folgenden Kreuztabellen Tabelle 9, Tabelle 10 und Tabelle 11 sind die beiden SNPs gegeneinander dargestellt.

Tabelle 9: Kreuztabelle der SNPs rs2295079 (-3099CG) und rs2295080 (-3162AC) der kaukasischen Blutspender

		-3099			Summe
		CC	CG	GG	
-3162	AA	60	0	0	60
	AC	0	49	0	49
	CC	0	0	11	11
Summe		60	49	11	120

Tabelle 10: Kreuztabelle der SNPs rs2295079 (-3099CG) und rs2295080 (-3162AC) der chinesischen Blutspender

		-3099			Summe
		CC	CG	GG	
-3162	AA	76	0	0	76
	AC	0	35	0	35
	CC	0	0	8	8
Summe		76	35	8	119

1 ohne Ergebnis

Tabelle 11: Kreuztabelle der SNPs rs2295079 (-3099CG) und rs2295080 (-3162AC) der Blutspender aus Simbabwe

		-3099			Summe
		CC	CG	GG	
-3162	AA	0	0	0	0
	AC	0	4	0	4
	CC	0	0	116	116
Summe		0	4	116	120

Die SNPs rs2295079 (-3099CG) und rs2295080 (-3162AC) befinden sich im kompletten Kopplungsungleichgewicht. Der Genotyp -3162AA koppelte mit -3099CC, der Genotyp -3162AC koppelte mit dem Genotyp -3099CG und -3162CC koppelte mit -3099GG.

Hieraus ergibt sich, dass $r^2=1$ und $D'=1$ sind (Abdallah *et al.*, 2003, Lewontin, 1964a, 1964b, 1988). Beide SNPs liegen nur 63 bp auseinander.

3.2 Identifikation von Transkriptionsfaktoren mittels EMSA

Die Genotypisierung zeigte unterschiedliche Ergebnisse in den verschiedenen Ethnien. Daher stellte sich die Frage, ob ein evolutionärer Vorteil durch den anderen Genotyp vorliegt und ob die Genotypen einer unterschiedlichen Regulation unterliegen. Um diese Frage beantworten zu können, wurden EMSAs zur Beurteilung allelspezifischer Bindungsproteine erstellt.

Bei der Versuchsreihe mit dezentrischen Oligonukleotiden rs2295080 (-3162AC) konnten keine spezifischen Banden nachgewiesen werden (Abbildung 10).

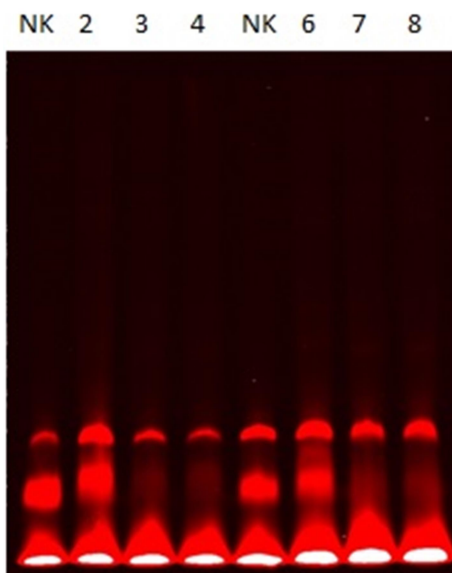


Abbildung 10: EMSA mit Hek293-Zellkernextrakten des SNP rs2295080 (-3162AC) mit dezentrischen Oligonukleotiden, repräsentatives Bild.

Von links nach rechts:

Tasche 1: Negativkontrolle des A-Allels ohne Zellkernextrakte, Tasche 2: A-Allel mit Zellkernextrakten, Tasche 3: Konkurrenz mit ungelabeltem A-Allel, Tasche 4: Gegenkonkurrenz mit ungelabeltem C-Allel, Tasche 5: Negativkontrolle des C-Allels ohne Zellkernextrakte, Tasche 6: C-Allel mit Zellkernextrakten, Tasche 7: Konkurrenz mit ungelabeltem C-Allel, Tasche 8: Gegenkonkurrenz mit ungelabeltem A-Allel.

Die Analyse des rs2295080 (-3162AC) mit Hek293 und zentrischen Oligonukleotiden erbrachte ein ähnliches Bild (Abbildung 11). Hier zeigten sich mehrere Banden, die allerdings bei beiden Allelen vorhanden waren. Das bedeutet, dass die Zellkernproteine bei beiden Allelen binden und keine spezifischen Bindungsproteine zu finden sind.

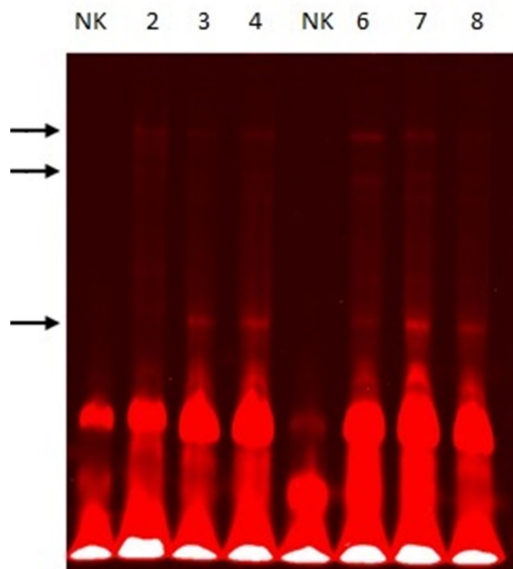


Abbildung 11: EMSA mit Hek293-Zellkernextrakten des SNP rs2295080 (-3162AC) mit zentrischen Oligonukleotiden, repräsentatives Bild.

Von links nach rechts:

Tasche 1: Negativkontrolle des A-Allels ohne Zellkernextrakte, Tasche 2: A-Allel mit Zellkernextrakten, Tasche 3: Konkurrenz mit ungelabeltem A-Allel, Tasche 4: Gegenkonkurrenz mit ungelabeltem C-Allel, Tasche 5: Negativkontrolle des C-Allels ohne Zellkernextrakte, Tasche 6: C-Allel mit Zellkernextrakten, Tasche 7: Konkurrenz mit ungelabeltem C-Allel, Tasche 8: Gegenkonkurrenz mit ungelabeltem A-Allel. Die Pfeile zeigen nicht signifikante Banden dar.

Die Analyse des EMSA rs2295079 (-3099CG) mit dezentrischen Oligonukleotiden bei Hek293-Zellen zeigte keine spezifischen Banden (Abbildung 12).

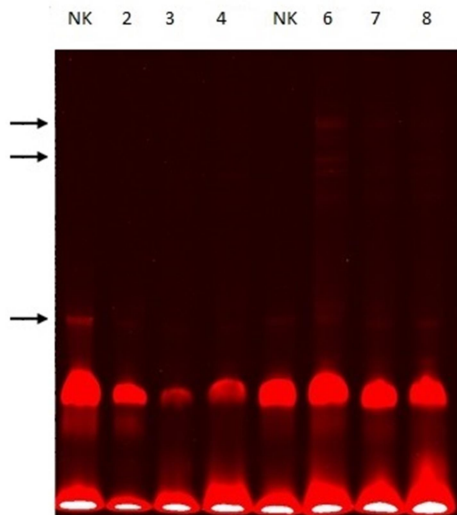


Abbildung 12: EMSA mit Hek293-Zellkernextrakten des SNP rs2295079 (-3099CG) mit dezentrischen Oligonukleotiden, repräsentatives Bild.

Von links nach rechts:

Tasche 1: Negativkontrolle des G-Allels ohne Zellkernextrakte, Tasche 2: G-Allel mit Zellkernextrakten, Tasche 3: Konkurrenz mit ungelabeltem G-Allel, Tasche 4: Gegenkonkurrenz mit ungelabeltem C-Allel, Tasche 5: Negativkontrolle des C-Allels ohne Zellkernextrakte, Tasche 6: C-Allel mit Zellkernextrakten, Tasche 7: Konkurrenz mit ungelabeltem C-Allel, Tasche 8: Gegenkonkurrenz mit ungelabeltem G-Allel. Die Pfeile zeigen nicht spezifische Banden.

Die Auswertung der EMSA rs2295079 (-3099CG) mit zentralen Oligonukleotiden und Hek293-Zellkernextrakten ist in Abbildung 13 dargestellt.

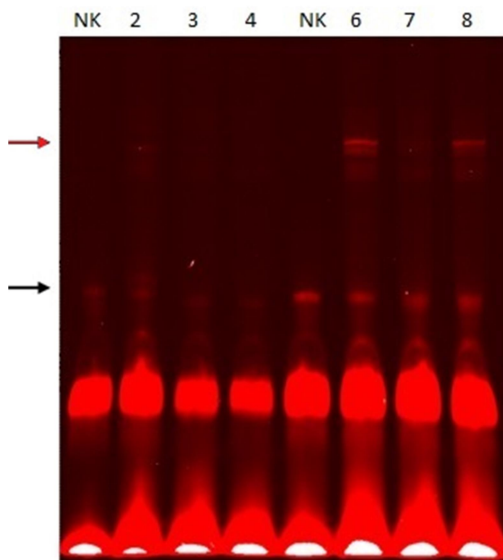


Abbildung 13: EMSA mit Hek293-Zellkernextrakten des SNP rs2295079 (-3099CG) mit zentralen Oligonukleotiden, repräsentatives Bild.

Von links nach rechts:

Tasche 1: Negativkontrolle des G-Allels ohne Zellkernextrakte, Tasche 2: G-Allel mit Zellkernextrakten, Tasche 3: Konkurrenz mit ungelabeltem G-Allel, Tasche 4: Gegenkonkurrenz mit ungelabeltem C-Allel, Tasche 5: Negativkontrolle des C-Allels ohne Zellkernextrakte, Tasche 6: C-Allel mit Zellkernextrakten, Tasche 7: Konkurrenz mit ungelabeltem C-Allel, Tasche 8: Gegenkonkurrenz mit ungelabeltem G-Allel. Der rote Pfeil zeigt spezifische Banden in den Taschen 6 und 8. Der schwarze Pfeil zeigt nicht spezifische Banden, die in jeder Tasche vorkamen.

Auffallend waren hierbei spezifische Banden im C-Allel. Die Abbildung zeigt eine Bande zuoberst in der Tasche 6 und 8. Im G-Allel und in der Competition lässt sich diese Bande nicht nachweisen. Daher konnten hier spezifische Bindungsproteine an dem Allel -3099C bestätigt werden. Aufgrund der zuvor durchgeführten Recherche mit AliBaba 2.1 könnte es sich hier um den USF1 als Bindungsprotein handeln. Dabei handelt es sich um einen stimulierenden Transkriptionsfaktor.

3.3 Untersuchung des Nierenzellkarzinomkollektivs

3.3.1 Genotypisierung des SNP rs2295079 (-3099CG) bei Nierenzellkarzinompatienten

Nachdem in den EMSA allelspezifische Bindungen für das -3099C-Allel nachgewiesen werden konnten, stellte sich die Frage, ob diese Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf Patienten mit Karzinomen haben könnten. Daher wurde im Folgenden das eingangs beschriebene Kollektiv der Nierenzellkarzinompatienten untersucht (Tabelle 12).

Tabelle 12: Genotypisierung des SNP rs2295079 (-3099CG) bei Essener Nierenzellkarzinompatienten

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
CC	68	47,9 %
CG	56	39,4 %
GG	18	12,7 %
C-Allelfrequenz 0,676		
G-Allelfrequenz 0,324		
HWE $\chi^2=1,410$		
HWE $p=0,235$		

Die Verteilung der Genotypen war im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Hier konnte als häufigster Genotyp der SNP -3099CC identifiziert werden (47,9 %), gefolgt vom heterozygoten Genotyp (39,4 %). Mit 12,7 % trat der Homozygote -3099GG am seltensten auf.

Tabelle 13: Vergleich der Genotypenverteilung der kaukasischen Blutspender mit den kaukasischen Nierenzellkarzinompatienten

	-3099CG			Summe
	CC	CG	GG	
Nierenzellkarzinompatienten	68	56	18	142
Kaukasische Blutspender	60	49	11	120
Summe	128	105	29	262
p=0,665				

Tabelle 13 zeigt den Vergleich der Genotypenverteilung der kaukasischen Nierenzellkarzinompatienten mit den gesunden, kaukasischen Blutspendern. Hierbei fällt auf, dass sich die Genotypenverteilung nicht signifikant voneinander unterscheidet. Bei beiden Kollektiven tritt der Genotyp -3099CC am häufigsten auf, gefolgt vom Genotyp -3099CG. Bei beiden Kollektiven trat der Homozygote -3099GG am seltensten auf. Eine Häufung eines Genotypen als Risikofaktor für das Auftreten eines Nierenzellkarzinom konnte nicht gefunden werden ($p=0,665$).

3.3.2 Untersuchung der klinisch-pathologischen Parameter

Die Ergebnisse der Genotypisierung der gesunden kaukasischen Bevölkerung und der an einem Nierenzellkarzinom erkrankten kaukasischen Patienten entsprachen einander, wie oben in Tabelle 13 gezeigt wurde.

Da Auswirkungen auf die Erkrankung untersucht werden sollen, erfolgt als nächstes die Untersuchung der demographischen Daten der Patienten. Hierzu wurden die im Rahmen der Studie von Frey *et al.* (2006) erfassten Daten zur Verlaufsbeobachtung in Bezug auf die Genotypen des SNP rs2295079 (-3099CG) analysiert.

Hier konnten bei Alter und Geschlecht keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (Tabelle 14). Es waren etwa doppelt so viele Männer wie Frauen im Essener Nierenzellkarzinomkollektiv. Die meisten Karzinomfälle traten bei Patienten zwischen dem 56. und 65. Lebensjahr auf.

Tabelle 14: Klinisch-pathologische Klassifikation bei Diagnose, Alter, Geschlecht und Genotypverteilung der Nierenzellkarzinompatienten

	Gesamtzahl	MTOR -3099 Genotyp			p-Wert
		CC	CG	GG	
n (%)	142	68 (47.9)	56 (39.4)	18 (12.7)	
Mittlerer Beobachtungszeitraum (Monate)	107 (4-155)	109.5 (10-153)	107 (4-154)	102 (8-155)	
Männlich	94 (66.2)	43 (45.7)	39 (41.5)	12 (12.8)	0.754
Weiblich	48 (33.8)	25 (52.1)	17 (35.4)	6 (12.5)	
Alter bei Diagnosestellung					
≤ 35 Jahre	3 (2.2)	2 (66.7)	0 (0.0)	1 (33.3)	0.520
36 – 45 Jahre	11 (7.7)	5 (45.4)	4 (36.4)	2 (18.2)	
46 – 55 Jahre	27 (19.0)	13 (48.2)	9 (33.3)	5 (18.5)	
56 – 65 Jahre	53 (37.3)	29 (54.7)	19 (35.8)	5 (9.5)	
66 – 75 Jahre	39 (27.5)	15 (38.5)	21 (53.8)	3 (7.7)	
≥ 76 Jahre	9 (6.3)	4 (44.5)	3 (33.3)	2 (22.2)	
Tumorgrad					
G1	20 (17.7)	12 (60.0)	3 (15.0)	5 (25.0)	0.357
G2	75 (66.4)	37 (49.4)	28 (37.3)	10 (13.3)	
G3	18 (15.9)	8 (44.4)	7 (38.9)	3 (16.7)	
Tumorstadium					
pT1	17 (12.0)	10 (58.8)	3 (17.6)	4 (23.6)	0.359
pT2	67 (47.2)	33 (49.3)	26 (38.8)	8 (11.9)	
pT3	57 (40.1)	25 (43.9)	26 (45.6)	6 (10.5)	
pT4	1 (0.7)	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)	
Lymphknotenstatus					
pN0	115 (81.0)	57 (49.5)	44 (38.3)	14 (12.2)	0.729
pN1	6 (4.2)	1 (16.7)	4 (66.6)	1 (16.7)	
pN2	5 (3.5)	3 (60.0)	2 (40.0)	0 (0.0)	
pN3	1 (0.7)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
pNx	15 (10.6)	6 (40.0)	6 (40.0)	3 (20.0)	
Metastasierung					
pM0	117 (82.4)	57 (48.7)	46 (39.3)	14 (12.0)	0.620
pM1	14 (9.9)	7 (50.0)	6 (42.9)	1 (7.1)	
pMx	11 (7.7)	4 (36.4)	4 (36.4)	3 (27.2)	

Prozentangaben in Klammern. Kategorialvariablen wurden mittels χ^2 -Test analysiert. Die p-Werte wurden mittels ANOVA für kontinuierliche Variablen errechnet.

Bei Betrachtung der pathologischen Parameter der Tumorgraduierung, sowie der TNM-Klassifikation, konnten hier ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei Betrachtung der einzelnen Genotypen ermittelt werden.

3.3.3 Untersuchung des Überlebens der Nierenzellkarzinompatienten

3.3.3.1 Untersuchung des Gesamtüberlebens

Hinsichtlich der Auswertung des Überlebens der Patienten, aufgetragen in Kaplan-Meier-Kurven, zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen.

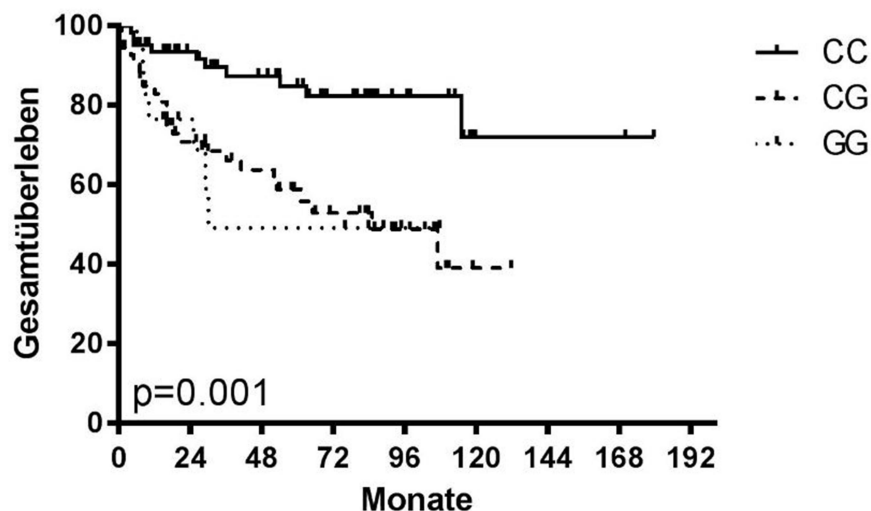


Abbildung 14: Gesamtüberleben der Patienten mit Nierenzellkarzinomen, unterteilt nach dem SNP rs2295079 (-3099CG)

Im Gesamtüberleben (Abbildung 14) zeigte sich ein hochsignifikanter Vorteil des Genotyps CC gegenüber CG und GG ($p=0,001$). Die 5-Jahresüberlebensrate der Nierenzellkarzinompatienten mit dem Genotyp CC betrug 85 %, bei CG ungefähr 55 % und bei homozygotem G ungefähr 50 %. Bei Betrachtung der 10-Jahres-Überlebensrate hebt sich der Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen noch weiter hervor. Es zeigt sich ein weiterer Abfall der Überlebenskurve des CG-Genotyps auf 40 %. Im Gegensatz dazu liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit CC-Genotyp bei etwa 75 %. Die 10-Jahresüberlebensrate des Genotyps GG konnte nicht bestimmt werden, da die Patienten nicht ausreichend lange in der Nachsorge beobachtet wurden. Nach 8 Jahren lebten noch ca. 50 % der Patienten mit dem Genotyp -3099GG.

Tabelle 15: Analyse der Gesamtsterblichkeit des Essener Nierenzellkarzinomkollektivs

Variable	Univariatanalyse		Multivariatanalyse	
	HR (95 % CI)	p-Wert	HR (95 % CI)	p-Wert
<u>Gesamtsterberate</u>				
-3099CG				
CC	1*		1*	
CG	3.695 (1.379-9.709)	0.001	4.129 (1.706-9.997)	0.002
GG	3.471 (1.653-7.286)	0.009	4.428 (1.441-13.608)	0.009
Alter				
	1.010 (0.983-1,037)	0.488	0.998 (0.962-1.035)	0.924
Geschlecht				
weiblich	1*		1*	
männlich	0.786 (0.418-1.478)	0.455	1.581 (0.692-3.616)	0.278
Tumorgrad				
G1	1*		1*	
G2	1.601 (0.549-4.670)	0.389	1.262 (0.383-4.106)	0.702
G3	11.987 (3.695-38.891)	< 0.001	12.432 (3.081-50.163)	< 0.001
Stadium				
1+2	1*		1*	
3+4	3.334 (1.778-6.250)	< 0.001	1.233 (0.541-2.814)	0.618
Metastasen				
M0	1*		1*	
M1	3.592 (1.629-7.918)	0.002	2.620 (1.082-6.346)	0.033
*Referenzgruppe				

In Tabelle 15 ist die Sterberisikoerhöhung der Genotypen des SNP rs 2295079 und der Einfluss der klinisch-pathologischen Parameter dargestellt. Bei der Gesamtsterblichkeit wurden alle Todesursachen der Patienten berücksichtigt. In der Univariatanalyse zeigte sich eine signifikante Sterberisikoerhöhung von CG zu CC mit 3,695 ($p=0,001$) und GG zu CC mit 3,471 ($p=0,009$). Wie klinisch zu erwarten, war ein fortgeschrittenes Tumorstadium ebenso signifikant mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert.

Unter Berücksichtigung aller Parameter stellt sich in der Multivariatanalyse der Einfluss der entsprechenden Genotypen noch ausgeprägter dar. Die Sterberisikoerhöhung von CG zu CC betrug 4,129 ($p=0,002$) und von GG zu CC 4,428 ($p=0,009$). Die Auswirkung der klinisch-pathologischen Parameter trat gegenüber der Effektstärke des SNPs in den Hintergrund und ergab hier nur noch teilweise signifikante Ergebnisse.

3.3.3.2 Untersuchung des tumorassoziierten Überlebens

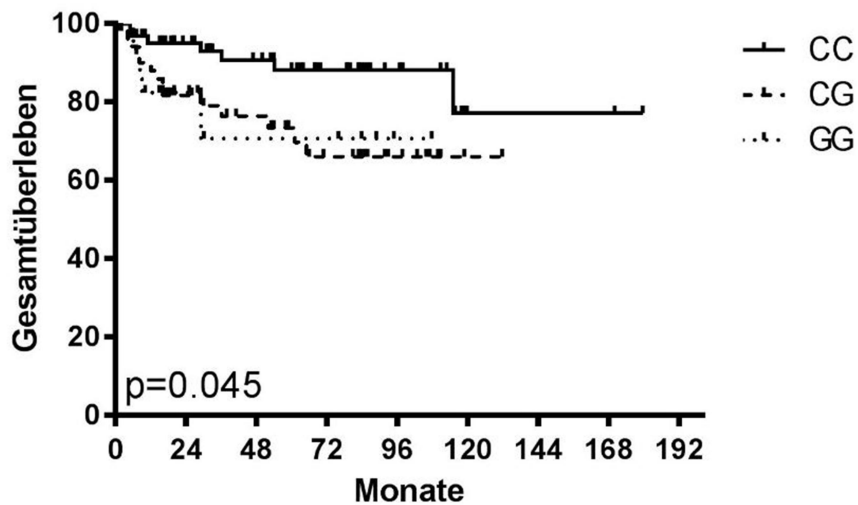


Abbildung 15: Tumor-assoziiertes Überleben der Patienten mit Nierenzellkarzinomen, unterteilt nach dem SNP rs2295079 (-3099CG)

Die Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 15 stellt das tumorassoziierte Überleben bzw. die Letalität des Nierenzellkarzinoms in Abhängigkeit des SNPs rs2295079 dar.

Hier präsentierte sich ein Überlebensvorteil des Genotypen CC gegenüber CG und GG, was mit einem p-Wert von 0,045 signifikant war.

In den ersten 5 Jahren betrug die Letalität in der Subgruppe des Genotypen CC 10%, nach 10 Jahren stieg diese auf insgesamt 20 % an.

Beim Genotyp CG starben in den ersten 5 Jahren etwa 25 % der Patienten am Tumor, nach 10 Jahren waren es ca. 35 %. Der Genotyp GG wies eine Letalität von 30 % nach 5 Jahren auf, welche nach 9 Jahren stabil blieb. Auffallend ist außerdem, dass die Träger des heterozygoten Genotyps annähernd die gleiche tumor-assoziierte Sterblichkeit aufwiesen.

Tabelle 16 stellt in Bezug auf die tumorassoziierte Sterblichkeit die Risikoerhöhung bei Betrachtung der einzelnen Genotypen und der klinisch-pathologischen Parameter dar.

Tabelle 16: Analyse des tumor-assoziierten Todes des Essener Nierenzellkarzinomkollektivs

Variable	Univariatanalyse		Multivariatanalyse	
	HR (95 % CI)	p-Wert	HR (95 % CI)	p-Wert
<u>Risiko, am Tumor zu versterben</u>				
-3099CG				
CC	1*		1*	
CG	2.895 (1.161-7.222)	0.023	4.775 (1.610-14.159)	0.005
GG	2.962 (0.853-10.289)	0.087	4.727 (1.147-19.490)	0.032
Alter				
	0.985 (0.952-1.019)	0.383	0.959 (0.914-1.007)	0.091
Geschlecht				
weiblich	1*		1*	
männlich	1.131 (0.474-2.701)	0.782	1.927 (0.669-5.554)	0.224
Tumorgrad				
G1	1*		1*	
G2	3.719 (0.483-28.639)	0.207	2.011 (0.216-18.705)	0.644
G3	40.631 (4.858-339.819)	0.001	24.974 (2.373-262.815)	0.007
Stadium				
1+2	1*		1*	
3+4	5.980 (2.398-14.909)	<0.001	2.063 (0.684-6.224)	0.199
Metastasen				
M0	1*		1*	
M1	6.092 (2.592-14.318)	<0.001	4.247 (1.528-11.805)	0.006
*Referenzgruppe				

In der Univariatanalyse präsentiert sich eine Risikoerhöhung von CG und GG gegenüber CC, was sich in der Multivariatanalyse weiter hervorhebt. Hier zeigt sich eine Risikoerhöhung von CG zu CC von 4,775 ($p = 0,005$) und von GG zu CC von 4,727 ($p = 0,032$). Analog zu den Beobachtungen beim Gesamtüberleben, zeigt sich auch hier ein signifikanter Einfluss der klinisch-pathologischen Parameter auf die Letalität, welcher aber in Relation zu dem Effekt der Genotypen wiederum leicht in den Hintergrund tritt. Wie bereits nach der Betrachtung der Kaplan-Meier-Kurve vermutet (Abbildung 15), ist hier eine signifikante Risikoerhöhung des heterozygoten Genotyps vorhanden. Die Univariatanalyse ergibt keinen signifikanten Risikozuwachs für das homozygote GG.

3.3.4 Untersuchung des Progressionsrisikos und des Metastasierungsrisikos

3.3.4.1 Untersuchung des Progressionsrisikos

Bei dem Vergleich der progressionsfreien Zeit der Patienten, dargestellt in der Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 16, wies der Genotyp CC, im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen, ein deutlich niedrigeres Risiko für einen Progress auf. Nach 5 und 10 Jahren waren 75 % der beobachteten Patienten progressionsfrei. Bei CG hingegen waren nach 5 Jahren etwa 60 % progressionsfrei, nach 9 Jahren 55 %. Für einen 10-Jahreswert reichte die Stichprobe nicht aus. Bei dem Genotyp GG waren nach 5 Jahren 48 % der Patienten progressionsfrei. Die 10-Jahresrate konnte nicht berechnet werden, da die restlichen Patienten aus der Beobachtung ausgeschieden waren. Nach 9 Jahren waren weiterhin 48 % der Patienten progressionsfrei.

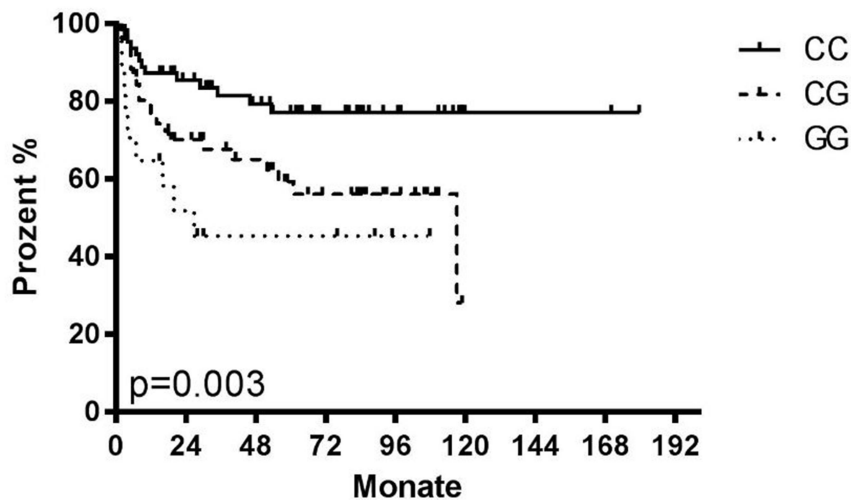


Abbildung 16: Progressionsfreie Patienten mit Nierenzellkarzinomen, unterteilt nach dem SNP rs2295079 (-3099CG)

Auch in der Cox-Regression konnten signifikante Zunahmen des Progressionsrisikos (Tabelle 17) verzeichnet werden. CG zu GG erhöhte das Risiko um 2,302 ($p=0,018$, Univariatanalyse), bzw. in der Multivariatanalyse um 4,256 ($p=0,002$), GG gegenüber CC um 3,974 ($p=0,002$) und hochsignifikant in der Multivariatanalyse um 12,071 ($p<0,001$).

Tabelle 17: Analyse des Progressionsrisikos des Essener Nierenzellkarzinomkollektivs

Variable	Univariatanalyse		Multivariatanalyse	
	HR (95 % CI)	p-Wert	HR (95 % CI)	p-Wert
<u>Progressionsrisiko</u>				
-3099CG				
CC	1*		1*	
CG	2.302 (1.151-4.607)	0.018	4.256 (1.708-10.606)	0.002
GG	3.974 (1.685-9.369)	0.002	12.071 (3.841-37.934)	<0.001
Alter				
	0.982 (0.958-1.006)	0.140	0.973 (0.941-1.006)	0.102
Geschlecht				
weiblich	1*		1*	
männlich	0.969 (0.519-1.811)	0.922	1.015 (0.456-2.260)	0.971
Tumorgrad				
G1	1*		1*	
G2	2.355 (0.706-7.854)	0.164	3.508 (0.740-16.635)	0.114
G3	15.302 (4.323-54.161)	<0.001	32.265 (6.035-172.512)	<0.001
Stadium				
1+2	1*		1*	
3+4	3.304 (1.825-5.979)	<0.001	1.311 (0.597-2.877)	0.500
Metastasen				
M0	1*		1*	
M1	4.811 (2.399-9.649)	<0.001	5.729 (2.196-14.945)	<0.001
*Referenzgruppe				

3.3.4.2 Untersuchung des Metastasierungsrisikos

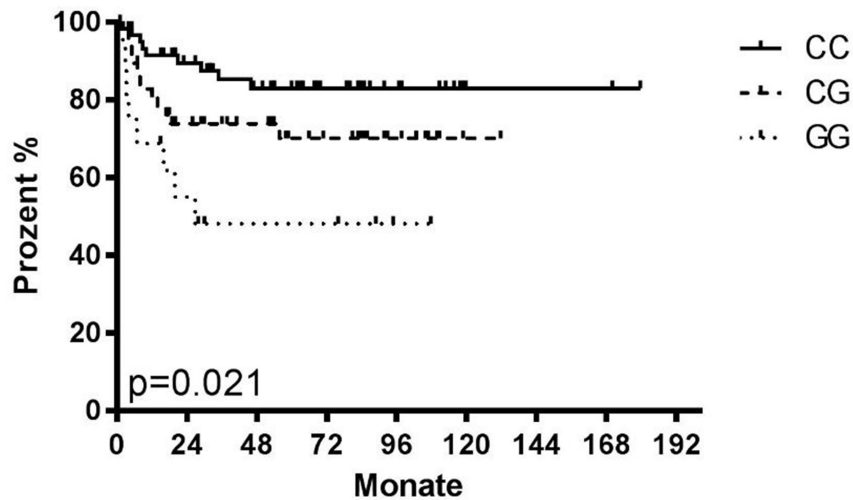


Abbildung 17: Metastasierungsfreie Patienten mit Nierenzellkarzinomen, unterteilt nach dem SNP rs2295079 (-3099CG)

Abschließend wurde der Zeitraum bis zum Auftreten von Metastasen, unterteilt in die drei Genotypen, untersucht. Die Auftretenswahrscheinlichkeit für neue Metastasen lag bei CC nach 5 und 10 Jahren bei etwa 15 % (Abbildung 17). Die Wahrscheinlichkeit mit dem Genotyp CG nach 5 Jahren für eine Metastasierung liegt bei 25 %. Nach 10 Jahren ist es 30 %. Das höchste Risiko für eine Metastasierung bestand bei den GG-Genotypträgern. Hier waren ca. 50 % der Patienten nach 5 Jahren metastasiert. Dieser Zusammenhang stellte sich mit einem p-Wert von 0,021 signifikant dar.

Tabelle 18: Analyse des Metastasierungsrisikos des Essener Nierenzellkarzinomkollektivs

Variable	Univariatanalyse		Multivariatanalyse	
	HR (95 % CI)	p-Wert	HR (95 % CI)	p-Wert
<u>Metastasierungsrisiko</u>				
-3099CG				
CC	1*		1*	
CG	1.744 (0.867-3.509)	0.119	2.995 (1.231-7.286)	0.016
GG	3.092 (1.335-7.163)	0.008	4.858 (1.796-13.137)	0.002
Alter				
	0.980 (0.956-1.005)	0.121	0.968 (0.934-1.004)	0.081
Geschlecht				
weiblich	1*		1*	
männlich	0.968 (0.516-1.817)	0.919	0.971 (0.444-2.123)	0.941
Tumorgrad				
G1	1*		1*	
G2	2.086 (0.624-6.973)	0.233	1.887 (0.388-9.171)	0.431
G3	11.316 (3.264-39.234)	<0.001	10.026 (1.932-52.030)	0.006
Stadium				
1+2	1*		1*	
3+4	3.555 (1.917-6.594)	<0.001	0.904 (0.386-2.117)	0.817
Metastasen				
M0	1*		1*	
M1	11.332 (5.693-22.555)	<0.001	8.047 (3.117-20.773)	<0.001
*Referenzgruppe				

Das Risiko für Metastasierung stieg bei Genotyp CG gegenüber CC um 1,744 ($p=0,119$) bzw. 2,995 (multivariat, $p=0,016$) und bei Genotyp GG gegenüber CC um 3,092 ($p=0,008$) bzw. um 4,858 (multivariat, $p=0,002$). Das größte Risiko auf neue bzw. weitere Metastasierung bestand bei Patienten, die bereits eine Metastasierung bei Diagnosestellung hatten. Das Risiko lag bei 11,332 ($p<0,001$) gegenüber Patienten, die keine Metastasen hatten, und bei 8,047 ($p<0,001$) in der Multivariatanalyse (Tabelle 18).

4. Diskussion

Die Auswirkungen von SNPs auf einen Krankheitsverlauf sind ein spannendes und interessantes Gebiet in der aktuellen Forschung. Untersucht wurden sowohl ethnische Unterschiede in der Ausprägung der Genotypen und vor allem auf das Risiko für eine Tumorerkrankung und die Beeinflussung der Therapie.

4.1 Genotypen des SNP rs2295079 (-3099CG)

In der Auswertung der Genotypen des SNP rs2295079 (-3099CG) konnte gezeigt werden, dass der Genotyp -3099GG der entwicklungsgeschichtlich ältere ist. In der afrikanischen Bevölkerung ist dieser vorwiegend zu finden. Die europäische und asiatische Bevölkerung trägt vorwiegend den Genotyp -3099CC, gefolgt vom heterozygoten Genotyp. In der Anpassung der Menschen an andere Lebensräume scheint das C-Allel einen Überlebensvorteil geboten zu haben.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Genotypen -3162AA und -3099CC im kompletten Kopplungsungleichgewicht liegen. Ursache hierfür scheint die unmittelbare Nähe der beiden SNPs im Promotor zu sein, sie sind nur 63 bp voneinander entfernt. Daher ist anzunehmen, dass beide SNP auf dem gleichen Block liegen und in der Anaphase I der Meiose beim cross-over der homologen Chromatiden nicht getrennt werden (Campbell, N. A., 2000). Dadurch ist das Kopplungsungleichgewicht über Generationen stabil. Somit ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse der Genotypisierung des SNP rs2295079 (-3099CG) in gewissem Maße auch auf den SNP rs2295080 (-3162AC) übertragen werden können. Das komplette Kopplungsungleichgewicht der SNPs rs2295079 (-3099CG) und rs2295080 (-3162AC) ist bislang in der Literatur noch nicht beschrieben und bietet somit neue Ansätze für die weitere Forschung.

4.2 Assoziation des SNP rs2295079 (-3099CG) mit Nierenzellkarzinomen

In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass keine der Ausprägungen des SNPs rs2295079 (-3099CG) mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Nierenzellkarzinome assoziiert war, wobei hier der Fokus auf dem klarzelligen Nierenzellkarzinom lag. In Bezug auf das Auftreten von Nierenzellkarzinomen scheint der SNP der kaukasischen Bevölkerung allerdings einen Nachteil gebracht zu haben. In Afrika und Asien tritt das Nierenzellkarzinom weniger häufig auf als in Europa (Motzer *et al.*, 1996). Die gesunde, afrikanische Bevölkerungsgruppe trägt vor allem den Genotyp -3099GG. Möglich ist, dass dieser Genotyp protektiv für das Erkrankungsrisiko ist. Andernfalls wäre ein Überwiegen von alternativen Todesursachen zu diskutieren, welche das Nierenzellkarzinom in den Hintergrund treten lassen.

Da die asiatische Bevölkerung ebenfalls den Genotyp -3099CC als häufigsten trägt, müsste hier ebenfalls eine hohe Prävalenz für Nierenzellkarzinome zu finden sein. Daher ist zu diskutieren, ob die weiteren Risikofaktoren (Rauchen, Übergewicht, Hypertonie und chronische Niereninsuffizienz) hier eine größere Rolle in der Entstehung der Krankheit spielen und somit den Effekt des Genotypen relativieren. Andernfalls kann auch eine weitere, bislang nicht entdeckte genetische Ursache nicht ausgeschlossen werden.

Entgegen der Darstellung von Cao *et al.* (2012), welche das homozygote A-Allel des SNP rs2295080 (-3162AC) als Risiko einstufen, konnte hier nachgewiesen werden, dass das C-Allel beim SNP rs2295079 (-3099CG) mit einem signifikant besseren Überleben assoziiert ist. Aufgrund der Kopplung der SNPs kann man somit auch schließen, dass auch für das A-Allel des SNP rs2295080 (-3162AC) ein Überlebensvorteil bestehen könnte.

Da in der Studie von Cao *et al.* (2012) lediglich erkrankte Patienten untersucht wurden, ist ein vollständiger Vergleich jedoch nicht möglich, gegebenenfalls ist auch von einem Selektionsbias auszugehen. Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass in der oben genannten Studie nur chinesische Patienten untersucht wurden, die Studie in dieser Arbeit sich aber mit kaukasischen Patienten befasst.

In dieser Arbeit wurde insbesondere das Augenmerk auf den Verlauf der Erkrankung in Abhängigkeit der Genotypen gelegt. Für das homozygote G-Allel von rs2295079 (-3099CG) konnte nicht nur ein geringeres Überleben dargestellt werden, weiterhin scheint es auch Einfluss auf die klinisch-pathologischen Parameter, wie die Tumorprogression und die Metastasierung zu haben. Bei Patienten mit dem Genotyp -3099GG

traten Metastasen früher und häufiger auf als bei Patienten mit dem homozygoten -3099CC. Ebenfalls erlitten die Patienten früher und häufiger einen Progress der Erkrankung.

Bei dem Vergleich der Gesamtsterblichkeit mit der tumorassoziierten Sterblichkeit fällt auf, dass insgesamt mehr Patienten mit den Genotypen -3099CG und -3099GG in der Gesamtsterblichkeit versterben als bei der tumorassoziierten Sterblichkeit. Möglich ist, dass der SNP weitere Faktoren triggert, die eine höhere Sterblichkeit hervorrufen.

Auffallend war außerdem, dass die Patienten mit heterozygotem Genotyp in Bezug auf das Gesamtüberleben und das tumor-assoziierte Überleben ein signifikant erhöhtes Risiko zu versterben haben. Dies wurde ebenfalls bei Cao *et al.* (2012) in dem chinesischen Patientenkollektiv nachgewiesen. Somit ist es sinnvoll, in weiteren Studien erneut den SNP rs2295080 (-3162AC) zu untersuchen, um die hier gefundenen Ergebnisse nach Möglichkeit zu bestätigen oder zu widerlegen.

Die Multivariatanalysen ergaben, dass mehrere Faktoren für eine signifikante Risikoerhöhung zum Auftreten eines bestimmten Ereignisses vorhanden sind. In allen Analysen (Gesamtsterblichkeit, tumorassoziierte Sterblichkeit, Progressionsrisiko und Metastasierungsrisiko) konnte für die klinischen Parameter Stadium 3+4, M1, sowie G3 ein signifikantes Risiko ermittelt werden. Allerdings war der Einfluss des Genotypen -3099GG höher.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit mittels EMSA gezeigt werden, dass für das C-Allel des SNP rs2295079 (-3099CG) spezifische Transkriptionsfaktoren binden. Mit dem Analyseprogramm AliBaba 2.1 wurde der Upstream Stimulatory Factor 1 (Lefrancois-Martinez *et al.*, 1995) als möglicher Transkriptionsfaktor identifiziert, welcher stimulierende Eigenschaften aufweist. Wenn man sich nun die Ergebnisse der Genotypisierung vergegenwärtigt, wurde der Genotyp -3099CC als der entwicklungsgeschichtlich jüngere Genotyp bestätigt, wodurch sich die Theorie aufstellen lässt, dass die Regulation von mTOR im Genotyp -3099CC einen entwicklungsgeschichtlichen Vorteil gebracht hat und es somit zu einer Selektion in der kaukasischen Bevölkerung gekommen ist.

Klinisch zeigt sich, dass afrikanische Patienten erhöhte Dosen des Immunsuppressivums Rapamycin (Rapamune®) benötigen, um im Rahmen der Inhibition von mTOR Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, als dies bei europäischen Patienten der Fall ist. Bei der Anwendung von Everolimus (Afinitor®) konnte gezeigt werden, dass Patienten mit afrikanischer Abstammung eine um zwanzig Prozent höhere Clearance haben als vergleichbare, kaukasische Patienten.

Die hier gefundenen Daten lassen sich in der klinischen Anwendbarkeit nutzbar machen, da beim Vorliegen des C-Allels von einem besseren medikamentösen Ansprechen der Patienten auf mTOR-Inhibitoren auszugehen ist. Daher ließe sich eine Genotypisierung nutzen, um, je nach Vorliegen des entsprechenden Genotyps, die Medikamentendosis individuell noch vor Therapiebeginn anzupassen und somit nach Möglichkeit einen frühzeitigen und besseren Erfolg der Therapie zu erreichen.

Pharmakologisch lässt sich dies so erklären: wenn ein Patient eine höhere Dosis eines Immunsuppressivums benötigt, ist entweder eine vermehrte Anzahl an Kopien des Zielmoleküls vorhanden, das Molekül ist überaktiv oder die Rezeptorstruktur ist leicht verändert. Da der EMSA einen stimulierenden Transkriptionsfaktor für das -3099C-Allel nachweisen konnte, ist die wahrscheinlichste Ursache dieses Phänomens die Überaktivität, bzw. die fehlende Regulierbarkeit des -3099G-Allels durch Transkriptionsfaktoren.

Ein Ansatzpunkt für die weitere Forschung wäre somit die Überprüfung dieser These mittels Real-Time-PCR von complementary DNA (cDNA).

Wie zuvor beschrieben, wurde bei Cao *et al.* (2012) eine Überexpression von mTOR bei dem SNP rs2295080 (-3162AC) für das A-Allel nachgewiesen. Durch die nachgewiesene Kopplung zwischen rs2295080 (-3162AC) und rs2295079 (-3099CG) scheint dies zunächst im Widerspruch zu den hier ermittelten Ergebnissen zu stehen.

Eine Hypothese wäre, dass beide Aussagen zutreffend sind, aber beide SNPs auf unterschiedliche Art und Weise sowohl die Stimulation von mTOR beeinflussen, als auch mit einem erhöhten Risiko für Nierenzellkarzinome verknüpft sind. Somit wäre eine Studie sinnvoll, die untersucht, welche weiteren Faktoren speziell diese SNPs regulieren. Weiterhin bleibt zu beachten, dass es sich bei den Ergebnissen von Cao *et al.* (2012) um rein epidemiologische Daten handelt und keine Analyse des Verlaufs und Überlebens vorliegt. Weiterhin gibt es in der Studie keine Kontrollgruppe. Bei der untersuchten Population lag ein deutlich vermehrtes Auftreten des A-Allels vor, wodurch in absoluten Zahlen ein vermehrtes Tumoraufreten logisch ist.

Der SNP rs2295079 (-3099CG) ist nicht mit einem erhöhten Risiko für ein Nierenzellkarzinom behaftet. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der Genotyp -3099CC Patienten mit einem signifikanten Überlebensvorteil, sowie ein niedrigeres Progressions- und Metastasierungsrisiko assoziiert ist. In den aktuellen Leitlinien zum klarzelligen Nierenzellkarzinom (Ljungberg *et al.*, 2015, AWMF-Leitlinie Nierenzellkarzinom, 2017) ist eine geneti-

sche Untersuchung nicht erwähnt. Die Stadieneinteilung und die Therapiemodalitäten richten sich nach klinischen Parametern. Auch die Therapie fortgeschrittener, metastasierter Karzinome richtet sich nach einem Standardschema. Hier sind mTOR-Inhibitoren generell keine Erstlinien-Therapie, sondern Zweit- bzw. Drittlinien-Therapie (Motzer *et al.*, 2014, Abraham, Eng, 2008, Powles *et al.*, 2016). Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse zeigen, dass die Therapie sich nicht einzig auf die klinischen Parameter stützen sollte, sondern gerade die Genotypisierung hier einen entscheidenden Einflussfaktor für die Therapieentscheidung bringen könnte und somit ein individuelleres Behandlungsschema für die einzelnen Patienten etabliert werden könnte. Hierzu ist eine prospektive Studie notwendig.

4.3 Limitationen

Die statistische Auswertung ergab, dass alle untersuchten Kollektive im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht waren. Ein Selektionsbias der Blutspender ist somit unwahrscheinlich, aber letztlich noch möglich. In die statistische Analyse wurden insgesamt 120 Proben eingeschlossen, womit mathematisch die Signifikanz errechnet werden kann. Letztlich führt eine weitere Erhöhung der Probenanzahl natürlich zu einer genaueren Aussagekraft.

Bei einer Probe eines chinesischen Patienten konnte nach mehrfacher PCR kein Ergebnis erzielt werden. Ursache hierfür können eine Mutation in einer der Primerbindungsstellen sein oder auch die Denaturierung der DNA bei der Lagerung der Blutprobe.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass das Kollektiv 1999 erstellt wurde und gegebenenfalls die Lagerung der Proben zu möglichen DNA-Schäden geführt haben könnte. Daher wurden alle Proben in Zweifachbestimmung bearbeitet, um die Aussagekraft zu erhöhen.

Für die Analyse der DNA aus FFPE-Gewebe musste ein neues, kürzeres PCR-Produkt für die Genotypisierung der Nierenzellkarzinome amplifiziert werden. Möglich sind weitere Schäden in der DNA, ebenso wie ein Basenaustausch durch die Paraffinlagerung, die die Ergebnisse verfälscht haben könnten (Schweiger *et al.*, 2009).

Weiterhin sind bei allen Versuchen die Ergebnisse durch Veränderungen der Umweltbedingungen beeinflussbar. Dies trifft insbesondere auf enzymatische Abläufe zu. Daher fanden alle Arbeiten unter sterilen und standardisierten Laborbedingungen statt, um somit die äußeren Einflüsse und Verunreinigungen der Proben zu minimieren. Alle Versuche wurden für die jeweiligen Reaktionen unter optimalen Reaktionstemperaturen und Pufferbedingungen durchgeführt.

Bei den gefundenen Assoziationen muss berücksichtigt werden, dass durch diese keine Kausalität nachzuweisen ist. Nur durch weitere mechanistische Untersuchungen auf molekularer Ebene, wie bereits durchgeführte EMSA-Versuche, lässt sich die Evidenz für einen kausalen Zusammenhang steigern.

Die EMSA wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die spezifischen Banden konnten in jedem Versuch bestätigt werden. In den EMSA, in denen keine spezifischen Banden gefunden wurden, wurde dies in jedem Versuch bestätigt.

4.4 Ansätze für weitere Forschung

Wie bereits oben angeführt wird die genetische Untersuchung der Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom zur Therapieentscheidung bislang nicht genutzt, obwohl dies in Publikationen als sinnvoll erachtet wird. Patienten könnten nicht nur nach klinischen Parametern in Risikoklassen eingeteilt werden, sondern auch nach ihrem „genetischen Risikoprofil“. Der Genotyp -3099CC des SNP rs2295079 hat ein deutlich geringeres Risiko für ein Fortschreiten der Krankheit als der Genotyp -3099GG.

Es wurden bereits die real-time PCR der cDNA von Nierenzellkarzinomen sowie der Bestimmung der Luciferase-Aktivität des rs2295079 (-3099CG) als weitere Forschungsansätze genannt. Sollte sich hierbei eine Überexpression von mTOR bei dem Genotyp -3099GG herausstellen, so bietet sich hier ein neuer Beobachtungspunkt auch beispielsweise in Bezug auf die Wirksamkeit der mTOR-Inhibitoren.

Ein Ansatz wäre somit zu untersuchen, ob die Auswirkungen der Genotypen auf die unterschiedlichen mTOR-Inhibitoren (Everolimus oder Temsirolimus) gleichermaßen übertragbar sind und ob die Medikamente im klinischen Verlauf dieselbe Wirkung erzielen.

Möglich wäre es – wenn unterschiedliche Wirkprofile der mTOR-Inhibitoren bei den verschiedenen Genotypen des SNP rs2295079 (-3099CG) festgestellt werden – die Patienten vor Einleitung einer Therapie genetisch auf den SNP im Promotor zu untersuchen und danach eine angepasste Medikamentendosis zu verabreichen und dadurch die gewünschte Wirkung zu erzielen. Somit könnte eine Verbesserung im Überleben der Patienten erzielt werden.

5. Zusammenfassung

Eine häufige, urologische Tumorerkrankung ist das Nierenzellkarzinom. Es betrifft beide Geschlechter, eine Früherkennung ist nicht vorhanden, es wird oftmals zufällig gefunden. Neben der chirurgischen Therapie stehen diverse Therapien, wie unter anderem die mTOR-Inhibitoren zur Verfügung. Nicht alle Patienten sprechen gleichermaßen auf die Behandlungen an. Aus der genetischen Forschung sind verschiedene SNPs (Einzelbasen-Polymorphismen) bekannt, die die Aktivität von Genen beeinflussen können. Untersucht wurden die Genotypen des SNPs -3099CG (rs2295079) bei der gesunden Normalbevölkerung und bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen.

Nach der Analyse der Genotypen mittels Polymerasekettenreaktion und enzymatischem Restriktionsverdau bei gesunden, kaukasischen Blutspendern erfolgte die Analyse bei gesunden chinesischen und afrikanischen Blutspendern. Danach wurde die Ausprägung des SNPs im Tumorgewebe von Nierenzellkarzinompatienten des Universitätsklinikums Essen untersucht. Zusätzlich erfolgte die funktionelle Untersuchung des SNP mittels EMSA (electrophoretic mobility shift assay) an Hek293-Zellen.

Die EMSAs zeigten spezifische Banden für das -3099C-Allel. Die Datenanalyse ergab, dass es sich hierbei um den USF1, den Upstream Stimulatory Factor 1, einen stimulierenden Transkriptionsfaktor, handeln könnte.

In der statistischen Auswertung ergab sich, dass der Genotyp -3099GG der entwicklungs-geschichtlich ältere Genotyp war, welches hauptsächlich bei der afrikanischen Bevölkerung vorkam. In der kaukasischen und asiatischen Bevölkerung war vorwiegend der Genotyp -3099CC zu finden. Die Verteilung bei den Patienten mit Nierenzellkarzinomen entsprach der Verteilung der kaukasischen Bevölkerung. Hinsichtlich der Auswertung der klinischen Parameter konnte ein signifikanter Überlebensvorteil für den Genotyp -3099CC gefunden werden. Sowohl im Gesamtüberleben als auch in der tumorspezifischen Sterblichkeit, beim Progressionsrisiko und bei dem Metastasierungsrisiko konnte ein Vorteil -3099CC gefunden werden. Erkrankte Patienten und Träger des Genotyps -3099GG hatten ein signifikant erhöhtes Risiko einen Progress zu erleiden, zu metastasieren oder an dem Tumor zu versterben.

Die Arbeit konnte eine Risikoerhöhung für Träger des Genotyps -3099GG und die Relevanz der entdeckten Ergebnisse für die Patienten herausarbeiten. Offen ist allerdings noch, wie die gefundenen Resultate Einzug in den klinischen Alltag finden und ob prospektive Studien prognostische oder prädiktive Kriterien für die Therapie hervorbringen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abdallah, J. M., Goffinet, B., Cierco-Ayrolles, C., Pérez-Enciso, M. (2003):
Linkage disequilibrium fine mapping of quantitative trait loci: A simulation study
Genet. Sel. Evol. 35, 513–532
2. Abraham, R. T., Eng, C. H. (2008):
Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in oncology
Expert Opin Ther Targets. 12(2), 209-222
3. Altomare, D. A., Testa, J. R. (2008)
FRAP1 (FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1)
Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.
<http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/FRAP1ID40639ch1p36.html>
4. Bhaskar, P. T., Hay, N. (2007):
The two TORCs and Akt
Dev Cell. 12(4), 487-502
5. Brookes, A. J. (1999):
The essence of SNPs
Gene 234, 177-186
6. Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S.,
Schreiber, S. L. (1994):
A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex
Nature 369, 756-758
7. Brown, T. A. (1999):
Moderne Genetik. 2. Auflage.
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
8. Bühling, K. J. (2008): Niere und ableitende Harnwege
In: Bühling, K. J., Lepenies, J., Witt, K. (Hrsg.): *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage*; S. 336-337
München, Jena: Elsevier Urban & Fischer-Verlag
9. Buroker, N. E. (2014):
Regulatory SNPs and transcriptional factor binding sites in ADRBK1, AKT3,
ATF3, DIO2, TBXA2R and VEGFA
Transcription 5(4), e964559
10. Calladine, C. R., Drew, H. R., Luisi, B. F., Travers, A. A. (2005):
DNA – Das Molekül und seine Funktionsweise, 3. Auflage
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
11. Campbell, N. A. (2000):
Biologie, 2. Auflage
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; bes. S. 252 ff

12. Cao, Q., Ju, X., Li, P., Meng, X., Shao, P., Cai, H., Wang, M., Zhang, Z., Qin, C., Yin, C. (2012):
A functional variant in the MTOR promoter modulates its expression and is associated with renal cell cancer risk
PLoS ONE 7(11), e50302
13. Chen, J., Shao, P., Cao, Q., Li, P., Li, J., Cai, H., Zhu, J., Wang, M., Zhang, Z., Qin, C., Yin, C. (2012):
Genetic variations in a PTEN/AKT/mTOR axis and prostate cancer risk in a chinese population
PLoS ONE 7(7), e40817
14. Cho, E., Adami, H. O., Lindblad, P. (2011):
Epidemiology of renal cell cancer
Hematol Oncol Clin North Am. 25, 651-665
15. Choi, J., Chen, J., Schreiber, S. L., Clardy, J. (1996):
Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP
Science 273(5272), 239-242
16. Chow, L. T., Gelinas, R. E., Broker, T. R., Roberts, R. J. (1977):
An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA
Cell. 12(1), 1-8
17. Cox, L. S. (2009):
Molecular Themes in DNA Replication
Cambridge: The Royal Society of Chemistry
18. Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S. C., Thomas, G. (2001):
Mammalian TOR: A homeostatic ATP sensor
Science 294(5544), 1102-1105
19. Faustino, N. A., Cooper, T. A. (2003):
Pre-mRNA splicing and human disease
Genes Dev. 17(4), 419-437
20. Fiorini, C., Massari, F., Pedron, S., Sanavio, S., Ciccicarese, C., Porcaro, A. B., Artibani, W., Bertoldo, F., Zampini, C., Sava, T., Ficial, M., Calio, A., Chilosi, M., D'Amuri, A., Sanguedolce, F., Tortora, G., Scarpa, A., Delahunt, B., Porta, C., Martignoni, G., Brunelli, M. (2014):
Methods to identify molecular expression of mTOR pathway: a rationale approach to stratify patients affected by clear cell renal cell carcinoma for more likely response to mTOR inhibitors
Am J Cancer Res. 4(6), 907-915

21. Fischer, J., Palmedo, G., von Knobloch, R., Bugert, P., Prayer-Galetti, T., Paganò, F., Kovacs, G. (1998):
Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours
Oncogene 17, 733-739
22. Frey, U. H., Lümmer, G., Jäger, T., Jöckel, K.-H., Schmid, K. W., Rübber, H., Müller, N., Siffert, W., Eisenhardt, A. (2006):
The GNAS1 T393C polymorphism predicts survival in patients with clear cell renal carcinoma
Clin Cancer Res. 12(3), 759-763
23. Garner, M., Revzin, A. (1981):
A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system
Nuc. Acids. Res. 9, 3047–3060
24. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. (1977):
Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5
J. Gen. Virol. 36(1), 59–74
25. Grant, P. A. (2001):
A tale of histone modifications
Genome Biol. 2(4), REVIEWS0003
26. Hanna, S. C., Heathcote, S. A., Kim, W. Y. (2008):
mTOR pathway in renal cell carcinoma
Expert Rev Anticancer Ther. 8(2), 283-292
27. Hay, N., Sonenberg, N. (2004):
Upstream and downstream of mTOR
Genes Dev. 18, 1926-1945
28. Henig, R. M. (2001):
Der Mönch im Garten. Die Geschichte des Gregor Mendel und die Entdeckung der Genetik.
Berlin: Argon
29. Hildebrandt, M. A., Yang, H., Hung, M. C., Izzo, J. G., Huang, M., Lin, J., Ajani, J. A., Wu, X. (2009):
Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway are associated with clinical outcomes in esophageal cancer patients treated with chemoradiotherapy
J Clin Oncol. 27, 857-871
30. Hudes, G. R. (2009):
Targeting mTOR in renal cell carcinoma
Cancer 115, 2313–2320

31. Husseinzadeh, H. D., Garcia, J. A. (2011):
Therapeutic rationale for mTOR inhibition in advanced renal cell carcinoma
Curr Clin Pharmacol. 6(3), 214-221
32. Jones, K. A., Tjian R. (1985):
Sp1 binds to promoter sequences and activates herpes simplex virus 'immediate-early' gene transcription in vitro
Nature 317, 179-182
33. Jullien, N., Herman, J.-P. (2011):
LUEGO: a cost and time saving gel shift procedure
BioTechniques 51, 267-269
34. Kay, L. E. (2000):
Who wrote the book of life? A history of the genetic code.
Stanford, Californien: Stanford University Press
35. Kim, D.-H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D. M. (2002):
mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery
Cell 110(2), 163–175
36. Lefrancois-Martinez, A.-M., Martinez, A., Antoine, B., Raymondjean, M., Kahn, A. (1995):
Upstream stimulatory factor proteins are major components of the glucose response complex of the L-type pyruvate kinase gene promoter
J. Biol. Chem. 270, 2640-2643
37. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Gesellschaft für Urologie, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, AWMF) (2017):
S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms
Langversion 1.2, AWMF Registernummer: 043/017OL
<http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Nierenzellkarzinom.85.0.html>
(zuletzt abgerufen am 01.11.2018)
38. Lewontin, R. C. (1964a):
The interaction of selection and linkage. I. General considerations: heterotic models
Genetics. 49, 49–67
39. Lewontin, R. C. (1964b):
The Interaction of Selection and Linkage. II. Optimum Models
Genetics. 50(4), 757–782
40. Lewontin, R. C. (1988):
On measures of gametic disequilibrium
Genetics. 120, 849–852

41. Ljungberg, B., Campbell, S. C., Choi, H. Y., Jacqmin, D., Lee, J. E., Weikert, S., Kiemeny, L. A. (2011):
The epidemiology of renal cell carcinoma
Eur Urol. 60, 615-621
42. Ljungberg, B., Bensalah, K., Bex, A., Canfield, S., Giles, R. H., Hora, M., Kuczyk, M. A., Lam, T., Merseburger, A. S., Powles, T., Staehler, M., Volpe, A. (2015):
Guidelines on renal cell carcinoma
Online-Publikation: <http://www.uroweb.org/guidelines/online-guidelines/>
43. LoPiccolo, J., Blumenthal, G. M., Bernstein, W. B., Dennis, P. A. (2008):
Cytoplasmic–nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation
Drug Resist Updat. 11(1-2), 32–50
44. Moss, T. (2001):
DNA-Protein interactions: Principles and protocols (Methods in molecular biology),
2. Auflage
New Jersey: Humana
45. Motzer, R. J., Bander, N. H., Nanus, D. M. (1996):
Renal-cell carcinoma
N Engl J Med. 335(12), 865-875
46. Motzer, R. J., Barrios, C. H., Kim, T. M., Falcon, S., Cosgriff, T., Harker, W. G., Srimuninimit, V., Pittman, K., Sabbatini, R., Rha, S. Y., Flaig, T. W., Page, R., Bavbek, S., Beck, J. T., Patel, P., Cheung, F. Y., Yadav, S., Schiff, E. M., Wang, X., Niolat, J., Sellami, D., Anak, O., Knox, J. J. (2014):
Phase II randomized trial comparing sequential first-line everolimus and second-line sunitinib versus first-line sunitinib and second-line everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma
J Clin Oncol. 32(25), 2765-2772
47. Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986):
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 51(1), 263-273
48. Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K., Yamanaka, S. (2004):
mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells
Mol Cel Biol. 24(15), 6710–6718
49. Powles, T., Staehler, M., Ljungberg, B., Bensalah, K., Canfield, S. E., Dabestani, S., Giles, R., Hofmann, F., Hora, M., Kuczyk, M. A., Lam, T., Marconi, L., Merseburger, A. S., Volpe, A., Bex, A. (2016):
Updated EAU guidelines for clear cell renal cancer patients who fail VEGF targeted therapy
Eur Urol. 69(1), 4-6

50. Raught, B., Gingras, A.-C., Sonenberg, N. (2001):
The target of rapamycin (TOR) proteins
PNAS 98(13), 7037–7044
51. Ritzenthaler, J. D., Goldstein, R. H., Fine, A., Lichtler, A., Rowe, D. W., Smith, B. D. (1991):
Transforming-growth-factor-beta activation elements in the distal promoter regions of the rat alpha1 type I collagen gene
Biochem. J. 280, 157-162
52. Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Hutchison III, C. A., Slocombe, P. M., Smith, M. (1977a):
Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA
Nature 265, 687–695
53. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977b):
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74(12), 5463–5467
54. Schweiger, M. R., Kerick, M., Timmermann, B., Albrecht, M. W., Borodina, T., Parkhomchuk, D., Zatloukal, K., Lehrach, H. (2009):
Genome-wide massively parallel sequencing of formaldehyd fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues für copy-number- and mutation-analysis
PLoS ONE 4(5), e5548
55. Sidhar, S. K., Clark, J., Gill, S., Hamoudi, R., Crew, A. J., Gwilliam, R., Ross, M., Linehan, W. M., Birdsall, S., Shipley, J., Cooper, C. S. (1996):
The t(X;1)(p11.2;q21.2) translocation in papillary renal cell carcinoma fuses a novel gene PRCC to the TFE3 transcription factor gene
Hum Mol Genet. 5(9), 1333-1338
56. Siffert, W., Forster, P., Jöckel, K.-H., Mvere, D. A., Brinkmann, B., Naber, C., Crookes, R., Heyns, A. d. P., Epplen, J. T., Fridey, J., Freedman, B. I., Müller, N., Stolke, D., Sharma, A. M., al Moutaery, K., Grosse-Wilde, H., Buerbaum, B., Ehrlich, T., Ahmad, H. R., Horsthemke, B., du Toit, E. D., Tilikainen, A., Ge, J., Wang, Y., Yang, D., Hüsing, D., Roskopf, D. (1999):
Worldwide ethnic distribution of the G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its association with obesity in caucasians, chinese, and black african individuals
J Am Soc Nephrol. 10, 1921–1930
57. Stringer, C. B., Andrews, P. (1988):
Genetic and fossil evidence for the origin of modern humans
Science 239(4845), 1263-1268
58. Villanueva, A., Chiang, D. Y., Newell, P., Peix, J., Thung, S., Alsinet, C., Toivar, V., Roayaie, S., Minguez, B., Sole, M., Battiston, C., Van Laarhoven, S., Fiel, M. I., Di Feo, A., Hoshida, Y., Yea, S., Toffanin, S., Ramos, A., Martignetti, J. A., Mazzaferro, V., Bruix, J., Waxman, S., Schwartz, M., Meyerson, M., Friedman, S. L., Llovet, J. M. (2008):
Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma
Gastroenterology 135(6), 1972–1984

59. Watson, J. D. (2003):
Am Anfang war die Doppelhelix
Berlin: Ullstein
60. Weterman, M. A., Wilbrink, M., Geurts van Kessel, A. (1996):
Fusion of the transcription factor TFE3 gene to a novel gene, PRCC, in
t(X;1)(p11;q21)-positive papillary renal cell carcinomas
Proc Natl Acad Sci U S A. 93(26), 15294-15298
61. Zining, J., Lu, X., Caiyun, H., Yuan, Y. (2016):
Genetic polymorphisms of mTOR and cancer risk: a systematic review and updated
meta-analysis
Oncotarget. 7(35), 57464–57480

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
° C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA (=komplementäre DNA, die aus der mRNA mittels reverser Transkriptase geschrieben wurde)
CI	confidence interval (=Konfidenzintervall)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
dNTP	desoxynucleic tri phosphate (=Desoxyribonucleotid)
ddNTP	didesoxynucleic tri phosphate (=Didesoxyribonucleotid)
DNA	desoxyribonucleic acid (= Desoxyribunucleinsäure)
DNS	Desoxyribunucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (= Ethylendiamintetraessigsäure)
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
g	Gewichtskraft
G	Guanin
G-Stadium	Stadium des Gradings des Tumors (der Abweichung der Zellbeschaffenheit vom Normalgewebe)
HR	hazard ratio (=Auftrittswahrscheinlichkeit)
kb	Kilobasenpaare (=1000 Basenpaare)
mRNA	messenger ribonucleic acid (=Boten-RNA)
M-Stadium	Stadium der Tumormetastasierung
mTOR	mechanistic target of Rapamycine (= mechanistische Zielstruktur für Rapamycin)
<i>MTOR</i>	mechanistic target of Rapamycine-Gen
nm	Nanometer
N-Stadium	Stadium des Lymphknotenbefalls
PCR	polymerase chain reaction (=Polymerase-Ketten-Reaktion)
rpm	rounds per minute (=Umdrehungen pro Minute)
RNA	ribonucleic acid (=Ribonucleinsäure)
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzel-Basen-Polymorphismus)
T	Thyrosin

<i>Taq</i>	Thermus aquaticus
T-Stadium	Stadium der Tumortiefe
UTR	untranslated region (nicht übersetzte Region der mRNA)

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.