

**Analyse der Genregulation in der ATP-Synthase der
mitochondrialen Elektronentransportkette bei
Patienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Maria Brüggemann

aus Winterberg

2019

Angefertigt mit der Genehmigung

der medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: apl. Prof. Dr. med. Jörg Ellinger

2. Gutachter: Prof. Dr. Marieta Toma

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.09.2019

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie

Direktor: Prof. Dr. med. Manuel Ritter

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Deutsche Zusammenfassung	8
1.1 Einleitung	8
1.1.1 Pathogenese und Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms	8
1.1.2 Die Elektronentransportkette	9
1.1.3 Komplex V	10
1.1.4 Zielsetzung der Arbeit	11
1.2 Materialien	11
1.2.1 NextBio Datenbank	11
1.2.2 Gewebeproben	12
1.3 Methoden	14
1.3.1 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion	14
1.3.2 Westernblot	15
1.3.3 Immunohistochemie	16
1.3.4 Statistische Analysen	17
1.4 Ergebnisse	17
1.4.1 Identifizierung deregulierter Untereinheiten von Komplex V	17
1.4.2 qRT-PCR: Validierung der Expressionsprofile	19
1.4.3 Westernblot: Validierung auf Proteinebene	20
1.4.4 Immunohistochemie: Expression in benignem und malignem Nierengewebe	21
1.5 Diskussion	25
1.6 Literaturverzeichnis	29
2. Veröffentlichung	33
3. Danksagung	49

Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Beta-Actin
ATP	Adenosintriphosphat
ATP5A1	ATP synthase F1 subunit alpha
ATP5B	ATP synthase F1 subunit beta
ATP5C1	ATP synthase F1 subunit gamma
ATP5D	ATP synthase F1 subunit delta
ATP5F1	ATP Synthase Fo subunit B1
ATP5G1	ATP synthase membrane subunit c locus 1
ATP5G2	ATP synthase membrane subunit c locus 2
ATP5G3	ATP synthase membrane subunit c locus 3
ATP5I	ATP Synthase Fo subunit E
ATP5O	ATP synthase F1 Oligomycin Sensitivity Conferring Protein
ATP5S	ATP synthase Fo subunit s (factor B)
ATPAF1	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1
ccRCC	klarzelliges Nierenzellkarzinom
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
chRCC	chromophobes Nierenzellkarzinom
CI	Konfidenzintervall
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETK	Elektronentransportkette
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HR	Hazard Ratio
IHC	Immunohistochemie
LK	Lymphknoten
miRNA	microRNA
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure

mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NADH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid
NDUFA4	NDUFA4, Mitochondrial Complex Associated
NDUFA4L2	NDUFA4, mitochondrial complex associated like 2
NDUFS1	NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit S1
PAA	Polyacrylamid
POD	Peroxidase
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
pRCC	papilläres Nierenzellkarzinom
pT-Stadium	pathologisches Tumorstadium
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
RCC	Nierenzellkarzinom
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktiver Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
siRNA	Small interfering RNA
sRCC	sarkomatöses Nierenzellkarzinom
TNM	Tumor (T) Lymphknoten (N) Metastasen (M)
TMA	Tissue-Microarray
UICC	Union internationale contre le cancer
UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1
UQCRFS1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	von Hippel - Lindau

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

1.1.1 Pathogenese und Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom (RCC) bezeichnet eine Tumorerkrankung, die aus dem Nierenepithel entspringt und über 90 % der Krebserkrankungen in der Niere ausmacht. Die Krankheit umfasst über 10 histologische und molekulare Subtypen, von denen das klarzellige (ccRCC), das papilläre (pRCC) und das chromophobe (chRCC) Nierenzellkarzinom die verbreitetsten sind.

Das ccRCC tritt mit 75 – 80 % mit Abstand am häufigsten auf und unter den Fällen mit metastasiertem Nierenzellkarzinom ist sein Anteil sogar noch größer (Hsieh et al., 2017; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013; Ljungberg et al., 2010). Es zeigt eine große inter- und intratumorale Heterogenität. Bei etwa 80 % der ccRCC findet sich eine funktionelle Inaktivierung des von-Hippel-Lindau-Gens (VHL). Diese führt zu einer Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF)-1 α und 2 α und damit zu einer gesteigerten Neoangiogenese und Proliferation. Weitere Mutationen finden sich in geringerer Häufigkeit auch im PBRM1- (40 %), SETD2- (15 %) und im BAP1-Gen (15 %) (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Bei Männern beträgt das mittlere Erkrankungsalter 68 Jahre und bei Frauen 71 Jahre. Die 5-Jahres-Prävalenz wird vom Robert-Koch-Institut für 2014 mit 36.200 erkrankten Männern und 21.900 erkrankten Frauen angegeben (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. (GEKID) und des Zentrums für Krebsregisterdaten, 2014). Als Risikofaktoren werden Rauchen, Übergewicht und erhöhter Blutdruck angesehen (Chow et al., 2000; Hunt et al., 2005). Im Jahr 2012 machte das RCC weltweit etwa 2–3 % aller neuen Krebserkrankungen aus. Für die westlichen Industriestaaten Nordamerika, Australien/ Neuseeland und Europa wurde die Quote auf 3,3 % geschätzt. Dies entspricht geschätzten 75.000 (52 %) von insgesamt 144.000 Todesfällen durch RCC (1,7 % aller Todesfälle) (Ferlay et al., 2015).

Die Inzidenz von RCC nimmt jedes Jahr um 1,5–5,9 % zu (MCLAUGHLIN et al., 2006). Ein Grund könnte die zunehmende Verwendung von bildgebenden Verfahren bei Routineuntersuchungen sein, wodurch heutzutage viele RCC in einem frühen Stadium

entdeckt werden. Dies führt zu einer erhöhten Anzahl an kurativen Operationen, da lokalisierte RCC erfolgreich mit einer Operation behandelt werden können. Es bereitet jedoch weiterhin Schwierigkeiten festzustellen, ob ein Nierentumor malignen oder nichtmalignen Ursprungs ist. Dies führt häufig zu einer schädlichen Überbehandlung. Ein weiteres therapeutisches Problem liegt in der sehr eingeschränkten Wirkung von Radio- oder Chemotherapie bei einem Wegfall der operativen Option (Canda and Kirkali, 2006). Da frühe Stadien der RCC in der Regel keine Symptome verursachen und die relative 5-Jahres-Überlebensrate von 97 % im Stadium I auf nur 14 % im Stadium IV fällt, sind eine eingehendere Untersuchung des pathologischen Prozesses und eine mögliche Entwicklung von Biomarkern oder neuen Therapien von besonderer Bedeutung (Tan et al., 2011).

Bisher ist wenig über die Expression der ATP-Synthase-Untereinheiten beim ccRCC bekannt. Die Studie befasste sich damit ein besseres Verständnis in diesem Bereich zu schaffen um zur etwaigen Entdeckung von potenziellen Biomarkern oder therapeutischen Ansätzen beizutragen.

1.1.2 Die Elektronentransportkette

Die mitochondriale Elektronentransportkette (ETK) ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und besteht aus 5 Komplexen, die Elektronen von den Donatoren wie Nicotinamid Adenin Dinucleotid (NADH) auf Sauerstoff überführen, mit welchem sie sich schlussendlich zu H₂O vereinen. Während des Elektronentransfers wird Energie frei, die die Komplexe I, III und IV nutzen um Protonen in den Intermembranraum zu pumpen und damit einen Protonengradienten aufzubauen. Durch diesen Gradienten ist es der FoF₁-ATPase, auch Komplex V genannt, möglich Adenosintriphosphat (ATP) zu synthetisieren (siehe Abb.1 für eine Übersicht).

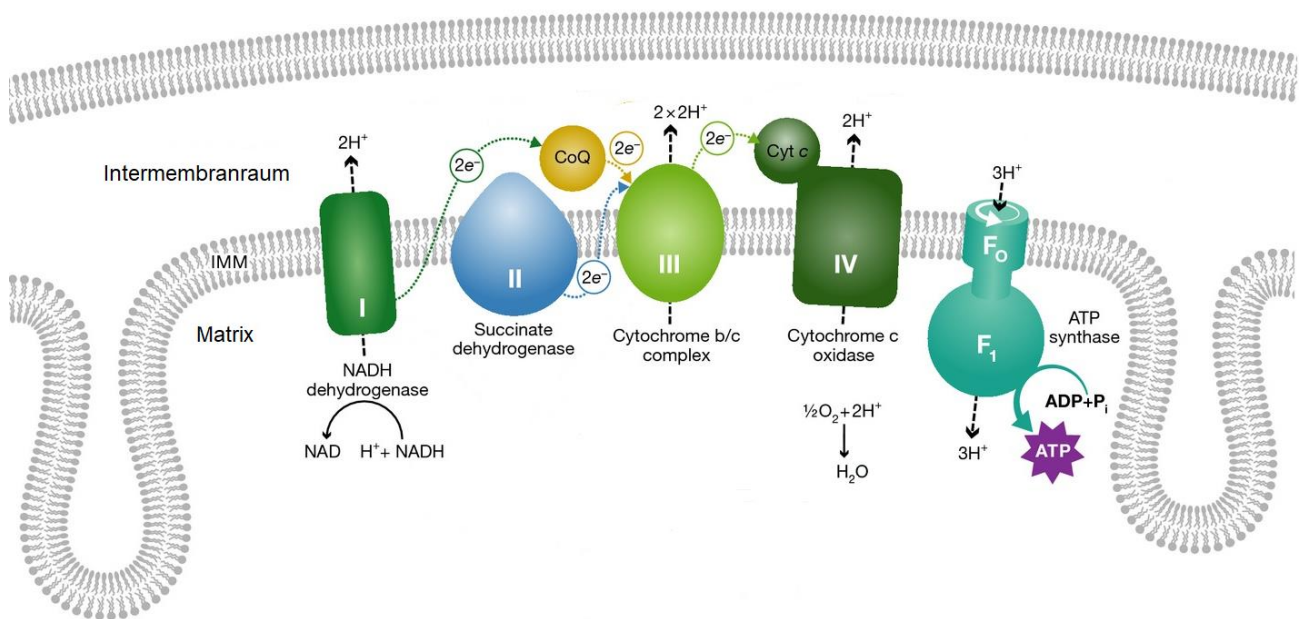


Abb. 1: Eine Übersicht des Aufbaus und Ablaufs der Elektronentransportkette. Dargestellt sind die an der inneren Mitochondrienmembran (IMM) befindlichen 4 Komplexe (I - IV) gemeinsam mit der ATP-Synthase (F1F0), auch Komplex V genannt. Zwischen den Komplexen werden Elektronen (e^-) übertragen (gepunktete Pfeile), wodurch ein Protonentransport (H^+) (gestrichelte Pfeile) von der Matrix in den Intermembranraum ermöglicht wird und somit ein Protonengradient aufgebaut wird. Die Cytochrom-c-Oxidase überträgt 2 Elektronen auf ein halbes O_2 -Molekül, wobei Wasser (H_2O) entsteht, welches die exogenste Reaktion der ETK darstellt. Der Protonengradient fördert den Protonenfluss durch die ATP-Synthase wodurch wiederum ADP in ATP umgewandelt werden kann. (modifiziert nach Dorn, 2015)

1.1.3 Komplex V

Die F1F0-ATP-Synthase repräsentiert den fünften und letzten Komplex der mitochondrialen ETK und besteht aus zwei Untereinheiten. Die FO-Untereinheit überspannt die Membran und bildet einen Protonenkanal. Sie ist aus drei Hauptuntereinheiten (a, b und c) aufgebaut und besitzt je nach Spezies eine variable Anzahl zusätzlicher Einheiten (Menschen sechs: d, e, f, g, F6 und 8). Die wasserlösliche F1-Untereinheit ist für die ATP-Synthase zuständig. Diese bildet mit ihrem katalytischen Kern den größeren Teil der ATP-Synthase und besteht aus 5 verschiedenen Untereinheiten (α , β , γ , δ und ϵ) (Devenish et al., 2000; Greie et al., 2000). Insgesamt baut sich der menschliche Komplex V aus 29 Untereinheiten auf (Walker JE, 2017).

1.1.4 Zielsetzung der Arbeit

Proliferierende Zellen haben einen erhöhten Nährstoffbedarf. Um ausreichend Energie und Biosynthesebausteine wie Nukleotide, Lipide und Aminosäuren für die maligne Zellproliferation zu erzeugen reorganisieren Tumore ihren Stoffwechsel. Morphologisch imponiert das ccRCC mit großen, cytoplasmareichen Zellen, die stark lipid- und glykogenbeladen sind (Gebhard et al., 1987). Dies impliziert einen veränderten Fettsäure- und Glukosemetabolismus bei der Entwicklung von ccRCC.

Ziel der Studie war es, alle 29 Gene der ATP-Synthase auf Fehlregulationen im ccRCC zu untersuchen umso ein besseres Verständnis des dysregulierten Metabolismus zu erlangen. Die Regulierung wurde zunächst auf genetischer Ebene untersucht, um anschließend die signifikanten Dysregulationen auf Proteinebene zu validieren. Um Zusammenhänge zwischen der Transkriptexpression, den klinisch-pathologischen Parametern sowie dem Überleben der Patienten aufzudecken, wurden statistische Analysen wie der Mann-Whitney *U* Test, Kaplan Meier und Cox-Regression Analysen durchgeführt.

1.2 Materialien

1.2.1 NextBio Datenbank

Zur Erstellung eines Expressionsprofils der ATP-Synthase-Untereinheiten wurden bereits publizierte Microarray-Studien ($n = 16$) in der Nextbio-Datenbank (Illumina, San Diego, CA, USA) genutzt (Stickel et al., 2009; Eckel-Passow et al., 2014; Ooi et al., 2011; Wozniak et al., 2013; Gumz et al., 2007; Pena-Llopis et al., 2012; Kort et al., 2008; Roemeling et al., 2014; Beroukhim et al., 2009; Lenburg et al., 2003; Higgins et al., 2003; Jones et al., 2005; Gerlinger et al., 2014; Wang et al., 2009; Deng et al., 2015; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Verglichen wurden benignes Nierengewebe und ccRCC-Gewebe unter Beschränkung der Parameter auf menschlich, mitochondriale Ribonukleinsäure (mRNA) und frisch-gefrorenes Gewebe. Die letzte Datenbank-Abfrage wurde am 20. August 2015 durchgeführt.

1.2.2 Gewebeproben

Die Gewebeprobensammlung wurde im Rahmen der Biobank am Centrum für integrierte Onkologie Köln-Bonn durchgeführt und besteht aus Samples von Patienten, die einer radikalen oder partiellen Nephrektomie an der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Bonn unterzogen wurden. Alle Patienten haben eine schriftliche Einverständniserklärung für die Sammlung von Biomaterialien unterschrieben und die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission (Abstimmung: 280/12) genehmigt.

Die Proben wurden mittels Formalin-Fixierung, Paraffineinbettung oder frisch-gefrorener Lagerung behandelt. Ein Uro-Pathologe führte vor der Verwendung eine erneute Klassifikation der Gewebe gemäß der WHO-Klassifikation von 2009 durch. Die Lagerung der frisch-gefrorenen Gewebe erfolgte bei -80 °C und die Proben wurden für die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) (92 ccRCC und 46 benigne Nierengewebe) und Westernblot genutzt (entsprechende 8 ccRCC und benignes renales Gewebe). Für die Immunohistochemie (IHC) wurde ein Tissue-Microarray (TMA) mit 191 RCC-Proben [darin enthalten: 141 ccRCC, 29 pRCC, 10 chRCC und 11 sarkomatöse RCC (sRCC)], 10 Onkozytome und 30 benigne Nierengewebe verwendet. Das TMA wurde in einer vorherigen Studie erstellt (Ellinger et al., 2010) und im Rahmen der Routineaufarbeitung mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die detaillierten klinisch-pathologischen Parameter der Patienten für die qRT-PCR und die IHC finden sich in Tabelle 1 und 2.

Tab. 1: Klinisch-pathologische Parameter der Patienten für die qRT-PCR

qRT-PCR	Screening Kohorte		Validierungskohorte	
	ccRCC n=18 (%)	normal n=10 (%)	ccRCC n=74 (%)	normal n=36 (%)
Geschlecht				
männlich	11 (61,1)	6 (60,0)	53 (71,6)	26 (72,2)
weiblich	7 (38,8)	4 (40,0)	21 (28,4)	10 (27,7)
Alter				
Mittelwert	64,83	66,4	66,5	64,75
Spannweite	43–83	46–89	38–89	43–86
Staging				
pT1	7 (38,8)	n. a.	42 (56,8)	n. a.
pT2	2 (11,1)	n. a.	7 (9,5)	n. a.
pT3	8 (44,4)	n. a.	24 (32,4)	n. a.
pT4	1 (5,5)	n. a.	1 (1,4)	n. a.
LK Metastasen	0	n. a.	2 (2,7)	n. a.
Fernmetastasen	1 (5,5)	n. a.	14 (18,9)	n. a.
Grading				
Grad 1	1 (5,5)	n. a.	9 (12,2)	n. a.
Grad 2	13 (72,2)	n. a.	47 (63,5)	n. a.
Grad 3	3 (16,6)	n. a.	15 (20,3)	n. a.
Grad 4	1 (5,5)	n. a.	3 (4,1)	n. a.

LK, Lymphknoten; n. a., nicht anwendbar

Tab. 2: Klinisch-pathologische Parameter der Patienten für die Immunohistochemie

	ccRCC n=141 (%)	pRCC n=29 (%)	chRCC n=10 (%)	sRCC n=11 (%)	RO n=10 (%)	normal n=30 (%)
Geschlecht						
männlich	88 (62,4)	26 (89,6)	6 (60,0)	7 (63,6)	0	21 (70,0)
weiblich	53 (37,6)	3 (10,3)	4 (40,0)	3 (27,3)	10 (100)	9 (30,0)
Alter						
Mittelwert	62,11	61,45	63,2	62,1	57,6	57,93
Spannweite	26–85	35–82	27–85	51–75	26–73	28–80
Staging						
pT1	59 (41,8)	19 (65,5)	6 (60,0)	0	n. a.	n. a.
pT2	31 (22,0)	5 (17,2)	4 (40,0)	1 (9,1)	n. a.	n. a.
pT3	49 (34,8)	5 (17,2)	0	8 (72,7)	n. a.	n. a.
pT4	2 (1,4)	0	0	1 (9,1)	n. a.	n. a.
LK-Metastasen	8 (5,7)	1 (3,4)	0	5 (45,5)	n. a.	n. a.
Fernmetastasen	18 (12,8)	3 (10,3)	0	6 (54,5)	n. a.	n. a.
Grading						
Grad 1	44 (31,2)	11 (37,9)	3 (30,0)	0	n. a.	n. a.
Grad 2	94 (66,7)	16 (55,1)	7 (70,0)	1 (9,1)	n. a.	n. a.
Grad 3	3 (2,1)	2 (6,9)	0	7 (63,6)	n. a.	n. a.
Grad 4	0	0	0	2 (18,2)	n. a.	n. a.

LK, Lymphknoten; RO, renales Onkozytom; n. a., nicht anwendbar

1.3 Methoden

1.3.1 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Die Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung wurde bereits von einer vorherigen Studiengruppe durchgeführt und beschrieben (Blondeau et al., 2015). In Kürze zusammengefasst erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA mithilfe des mirVana-miRNA-Isolationskits (Ambion, Foster City, CA, USA). Residuale Desoxyribonukleinsäure (DNA) Fragmente wurden durch DNase-Behandlung (DNA-freies Kit, Ambion) entfernt. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem NanoDrop 2000-Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) und ihre Integrität wurde durch Gelelektrophorese und Auswertung der 28S- und 18S-rRNA-Banden bestätigt.

In einer zunächst durchgeführten Screening-Kohorte mit 18 ccRCC und 10 benignen Nierengewebebeisproben wurde die Expression von 12 differentiell exprimierten Genen (*ATP5A1*, *ATP5B*, *ATPAF1*, *ATP5C1*, *ATP5D*, *ATP5O*, *ATP5F1*, *ATP5G1*, *ATP5G2*, *ATP5G3*, *ATP5I*, *ATP5S*) untersucht. In einer weiteren unabhängigen Validierungskohorte (74 ccRCC und 36 benigne Nierengewebe) wurden die acht am stärksten

herabregulierten Gene (*ATP5A1*, *ATP5B*, *ATPAF1*, *ATP5F1*, *ATP5G1*, *ATP5G2*, *ATP5G3*, *ATP5S*) untersucht. Aus 1 µg Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des PrimeScript RT-Reagenzkits mit gDNA-Eraser (Takara Bio, Saint-Germain-en Laye, Frankreich) komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Für die qRT-PCR wurden 5 ng/µl cDNA-Templates mit dem 1x SYBR Premix Ex Taq II und ROX Plus mit 10 pmol/µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer verwendet. Eine detaillierte Liste der Primer-Sequenzen findet sich in der supplementären Tabelle S1. Die PCR-Experimente wurden an einem ABIPrism 7900-HT-Fast-Real-Time-PCR-System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung von QBase + (Biogazelle) im $2^{-\Delta\Delta T}$ -Algorithmus. Hierfür wurden die Gene Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) und Beta-Actin (ACTB) genutzt, die sich schon in anderen Studien als geeignete Referenz Gene herausgestellt hatten (Jung et al., 2007; Dupasquier et al., 2014).

1.3.2 Westernblot

Um die Genexpression der Validierungs-Kohorte auf Proteinebene nachzuweisen, wurden Westernblot-Analysen für *ATP5A1*, *ATPAF1*, *ATP5G1*, *ATP5G2* und *ATP5G3* angefertigt. Das frischgefrorene Gewebe wurde zunächst (50 mg ccRCC und normales Nierengewebe) von 8 Patienten (4x UICC Stufe I, 4x Stadium III) in einem Precellys 24 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) mit 400 µl Zellysepuffer (Cell Signaling, Cambridge, Vereinigtes Königreich) einschließlich Complete Mini EDTA-freiem Protease-Inhibitor (Roche, Basel, Schweiz) homogenisiert und die Proteinkonzentration bestimmt (BCA Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Ein NuPAGE 4–12 % denaturierendes PAA Gel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) wurde mit 30 ng Protein pro Tasche beladen. Als Molekulargewichtsmarker wurde eine biotinylierte Proteinleiter (Cell Signaling Technology, Cambridge, UK) und PageRuler Prestained (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) aufgetragen. Die Proteine wurden in einem XCell4 SureLock-Elektrophorese-System (Life Technologies) aufgetrennt und dann auf 0,2 µm Nitrocellulose (XCell II, Life Technologies) übertragen. Zur Blockierung der Proteine wurde 5%iges Milchpulver (Merck, Darmstadt) verwendet. Die darauffolgende Immunfärbung wurde mit Antikörpern gegen *ATP5A1* 1:1000 (# ab14748, Abcam, Cambridge, UK), *ATPAF1* 1:1000 (# HPA044950, Sigma-Aldrich, München, Deutschland), einem kombinierten Antikörper gegen *ATP5G1*, *ATP5G2* und *ATP5G3*

1:5000 (# ab180149, Abcam), GAPDH (# 2118, Cell Signaling Technology) und beta-Aktin (# A5316, Sigma-Aldrich) durchgeführt. Durch Applikation von Meerettich-Peroxidase konjugierten sekundären Antikörpern (anti-rabbit-POD, #170-6515, Bio-Rad Laboratories, München, anti-mouse-POD, #170-6516, Bio-Rad, anti-biotin-POD, #7075, Cell Signaling Technology) wurde ein Chemilumineszenz-Signal erzeugt, welches mit SuperSignal West Femto Kit (Thermo Scientific) visualisiert und vom LAS 3000 Image Reader (Fujifilm, Tokio, Japan) aufgenommen wurde.

1.3.3 Immunohistochemie

Das vorher beschriebene TMA wurde für die Bestimmung der Expression von *ATP5A1*, *ATPAF1*, *ATP5G1*, *ATP5G2* und *ATP5G3* in RCC und benignen renalen Gewebeproben verwendet. Die Paraffinblöcke wurden auf 5 µm Dicke zugeschnitten, mit Xylol deparaffiniert und in abgestuftem Ethanol rehydratisiert. Die Objektträger wurden für *ATP5A1* und *ATPAF1* in Citratpuffer (pH 6,0) und für *ATP5G1/G2/G3* in Tris/EDTA-Puffer (pH 9,0) gelegt und für 10 Minuten bei Siedetemperatur (Mikrowelle 600 W) erhitzt. Es erfolgte eine 30-minütige Ruhe- und eine 15-minütige Abkühlzeit und die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit 3 %igem Wasserstoffperoxid für 10 Minuten blockiert. Die Schnitte wurden mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung und Tween 20 (Fa. Merck 8.22184) gewaschen. Die Primärantikörper wurden, gemäß den Herstellerangaben, mit dem Antikörperversdünnungsmittel Antibody diluent (Fa. Dako Nr. S3022) verdünnt (anti-*ATP5A1*, Verdünnung 1:1000; anti-*ATPAF1*, Verdünnung 1:50; anti-*ATP5G1/G2/G3*, Verdünnung 1:100) und mit den Objektträgern über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Signalerfassung mit Dako Envision+ System-HRP Labelled Polymer (Dako, Hamburg) mit sekundären Antikörpern gegen Kaninchen und Mäuse durchgeführt. Schließlich wurde die Färbung mit einer Gegenfärbung mittels Hämatoxylin und Bluing-Reagenz vollendet und die Schnitte dehydratisiert und befestigt.

Um die Interobserver-Variabilität gering zu halten, wurde die Färbung von drei Untersuchern ausgewertet. Im Falle von Unstimmigkeiten wurde die Bewertung an einem multi-headed Mikroskop mit einem Pathologen diskutiert. Die Skala für die Bewertung der Färbeintensitäten reichte von null – keiner Färbung, bis drei – gleichbedeutenden mit einer maximalen Färbung. Für benigne Gewebe wurde die

Expression der Zielproteine außerdem differenziert für die Subkompartimente proximale oder distale Tubuli, Sammelrohr und Henle-Schleife bewertet.

1.3.4 Statistische Analysen

Zur Korrelationsanalyse zwischen klinisch-pathologischen Parametern und dem Genexpressions-Level wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Um des Weiteren das Überleben der Patienten mit der Genexpression zu vergleichen, wurde eine Cox-Regressionsanalyse und eine Kaplan-Meier-Schätzungen durchgeführt. Die statistischen Analysen erfolgten mit der SPSS Statistics v21 Software (IBM, Ehningen, Deutschland).

1.4 Ergebnisse

1.4.1 Identifizierung deregulierter Untereinheiten von Komplex V

In der NextBio-Datenbank wurden 16 Microarray-Studien identifiziert (Stand 20. August 2015), welche die Expression von benignem und ccRCC-Gewebe verglichen. Die Expressionsprofile zeigten eine signifikante Dysregulation in 23 der 29 untersuchten Untereinheiten der ATP-Synthase in mindestens einer Microarray-Studie. 21 davon waren in ccRCC herab- und 2 hochreguliert (siehe Abb. 2). Zur weiteren Untersuchung wurden 12 Gene (*ATP5A1*, *ATP5B*, *ATPAF1*, *ATP5C1*, *ATP5D*, *ATP5O*, *ATP5F1*, *ATP5G1*, *ATP5G2*, *ATP5G3*, *ATP5I*, *ATP5S*) ausgewählt, die in früheren Forschungen noch nicht untersucht wurden. Weitere Kriterien waren eine hohe Anzahl an Studien mit einer gleichzeitig deutlich differentiellen Expression, wobei die Studien mit einer hohen Fallzahl bevorzugt wurden.

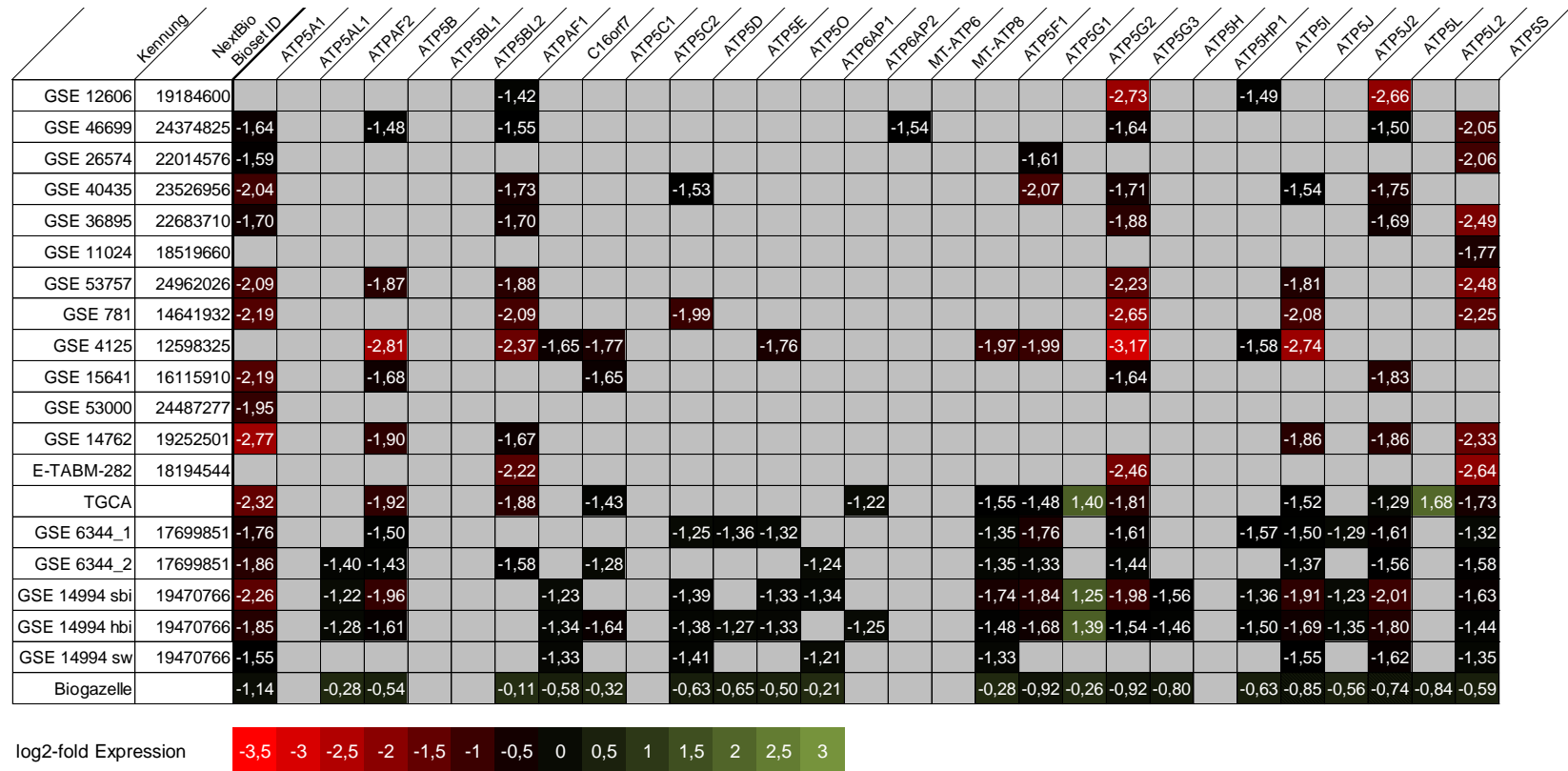


Abb. 2: Expressionsprofil der 29 Untereinheiten der ATP Synthase. Die Expression der Untereinheiten der ATP Synthase wurde unter Verwendung der NextBio Datenbank aus 16 Microarray Studien extrahiert und grafisch dargestellt. Gene mit einem signifikanten Expressionsunterschied in ccRCC und Normalgewebe sind farbig dargestellt. Der Expressionsunterschied im Tumor ist farbkodiert dargestellt (grün: Herabregulation; rot: Überexpression)

1.4.2 qRT-PCR: Validierung der Expressionsprofile

Die mit Hilfe der Expressionsprofile ausgewählten potentiell dysregulierten 12 Gene wurden zur Validierung innerhalb einer Screening-Kohorte von ccRCC (n =18) und normalen (n =10) Nierengewebeproben unter Verwendung von qRT-PCR untersucht (siehe supplementäre Abb. S1). Tabelle 3 zeigt auf, dass alle mRNA-Spiegel in ccRCC im Vergleich zu normalem Nierengewebe eine niedrigere Expression aufwiesen (Mann-Whitney-U $p \leq 0,001$). In einer erweiterten unabhängigen Kohorte von 74 ccRCC und 36 benignem Nierengewebe wurden zur Untermauerung der Ergebnisse 8 vielversprechende Gene (*ATP5A1*, *ATP5B*, *ATPAF1*, *ATP5F1*, *ATP5G1*, *ATP5G2*, *ATP5G3*, *ATP5S*) untersucht.

Es konnte eine, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Microarraystudien, signifikante Herabregulation aller Komplex-V-Untereinheiten im ccRCC-Gewebe (alle $p < 0,001$, siehe Tab. 3 und supplementäre Abb. S2) nachgewiesen werden.

In der statistischen Analyse zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expression von *ATP5G2* und dem Gesamtüberleben nach Nephrektomie (log rank $p = 0,024$, siehe supplementäre Abb. S3) sowie der *ATP5S*-Expression mit der Anwesenheit von Metastasen ($p = 0,013$). Eine weitere Korrelation des mRNA-Expressionsniveaus mit klinisch-pathologischen Parametern konnte nicht nachgewiesen werden (d.h. pT-Stadium, Metastase oder Grading, alle $p > 0,05$).

Tab. 3: Zusammenfassung der differentiell exprimierten mRNA in der Screening - und Validierungskohorte bei Real-Time PCR

	Screening Kohorte	Validierungs-Kohorte
Gene	fold change	fold change
ATP5A1	-3,31	-3,65
ATP5B	-3,04	-2,37
ATPAF1	-2,91	-2,80
ATP5C1	-1,81	-
ATP5D	-2,12	-
ATP5O	-1,98	-
ATP5F1	-1,93	-1,62
ATP5G1	-8,09	-5,88
ATP5G2	-2,69	-2,11
ATP5G3	-3,10	-2,37
ATP5I	-1,72	-
ATP5S	-1,95	-1,67

1.4.3 Westernblot: Validierung auf Proteinebene

Zur bestätigen der bisherigen Ergebnisse auf Proteinebene, wurden Westernblotts mit 8 korrespondierenden benignen renalen und ccRCC-Geweben verwendet. In Übereinstimmung mit den mRNA-Expressionsstudien zeigten alle untersuchten Proteine (*ATP5A1*, *ATPAF1* und *ATP5G1/G2/G3*) eine Herabregulation im ccRCC im Vergleich zum benignen Nierengewebe, welche in Abbildung 3 dargestellt ist. Eine detaillierte Darstellung der Westernblot-Abbildungen finden sich in der supplementären Abb. S4.

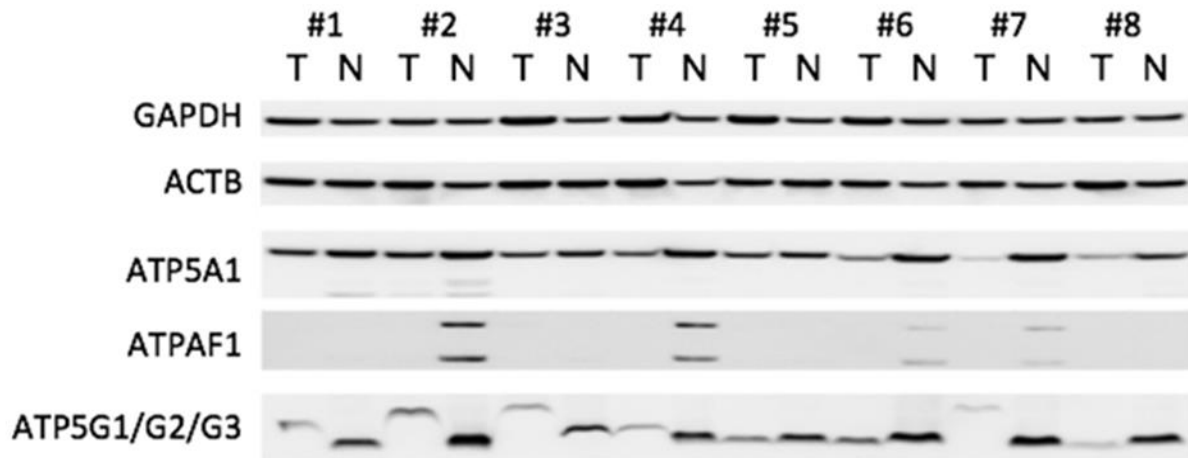


Abb. 3: Westernblot Untersuchung von ATP5A1, ATPAF1 und ATP5G1/G2/G3. Die Westernblot-Experimente wurden durchgeführt, um die Proteinexpression in 8 entsprechenden normalen (N) und klarzelligem Nierenzellkarzinom (T) Geweben (# 1- # 4 UICC Grad 1; # 5- # 8 UICC Grad 3) vergleichend zu untersuchen. Alle Proteine waren im Tumor im Vergleich zum normalen Nierengewebe geringer exprimiert. GAPDH und ACTB wurden als Ladekontroll-Antikörper genutzt.

1.4.4 Immunohistochemie: Expression in benignem und malignem Nierengewebe

Zur weiteren Validierung auf Proteinebene wurde eine IHC an einem TMA mit ccRCC (n = 141), pRCC (n = 29), chRCC (n = 10), sRCC (n = 11), Onkozytom (n = 10) sowie normalen Nierengeweben (n = 30) (Ellinger et al., 2010) durchgeführt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der Westernblot-Analyse zeigte sich eine verminderte Expression von *ATP5A1*, *ATPAF1* und *ATP5G1/G2/G3* im Zytoplasma von ccRCC, verglichen mit benignem Nierengewebe ($p < 0,001$, siehe Abb. 4 und supplementäre Abb. S5).

Bei genauerer Analyse des benignen Gewebes zeigte sich eine deutlich höhere Expression der Proteine in den proximalen und distalen Tubuli im Vergleich zur Henle-Schleife und dem Sammelrohr. Da *ATPAF1* neben der Zytoplasmafärbung auch eine Membranfärbung aufwies, wurde die Membran- und Cytoplasma-Färbung getrennt analysiert. Hierbei fiel auf, dass die Membran in normalem Nierengewebe intensiver gefärbt war als das Zytoplasma, obwohl *ATPAF1* Teil der Mitochondrien ist, die sich im Zytoplasma befinden.

Der Vergleich von ccRCC mit anderen RCC-Subtypen zeigt, dass die *ATP5A1*- und *ATP5G1/G2/G3*-Expression in pRCC ($p < 0,001$ und $p = 0,002$) und chRCC (beide $p <$

0,001) vergleichsweise hoch waren. Die Expression von *ATP5A1* ($p = 0,001$) und *ATP5G1/G2/G3* ($p = 0,008$) und des zytoplasmatischen *ATPAF1* ($p < 0,001$) war im Onkozytom höher als im ccRCC-Gewebe.

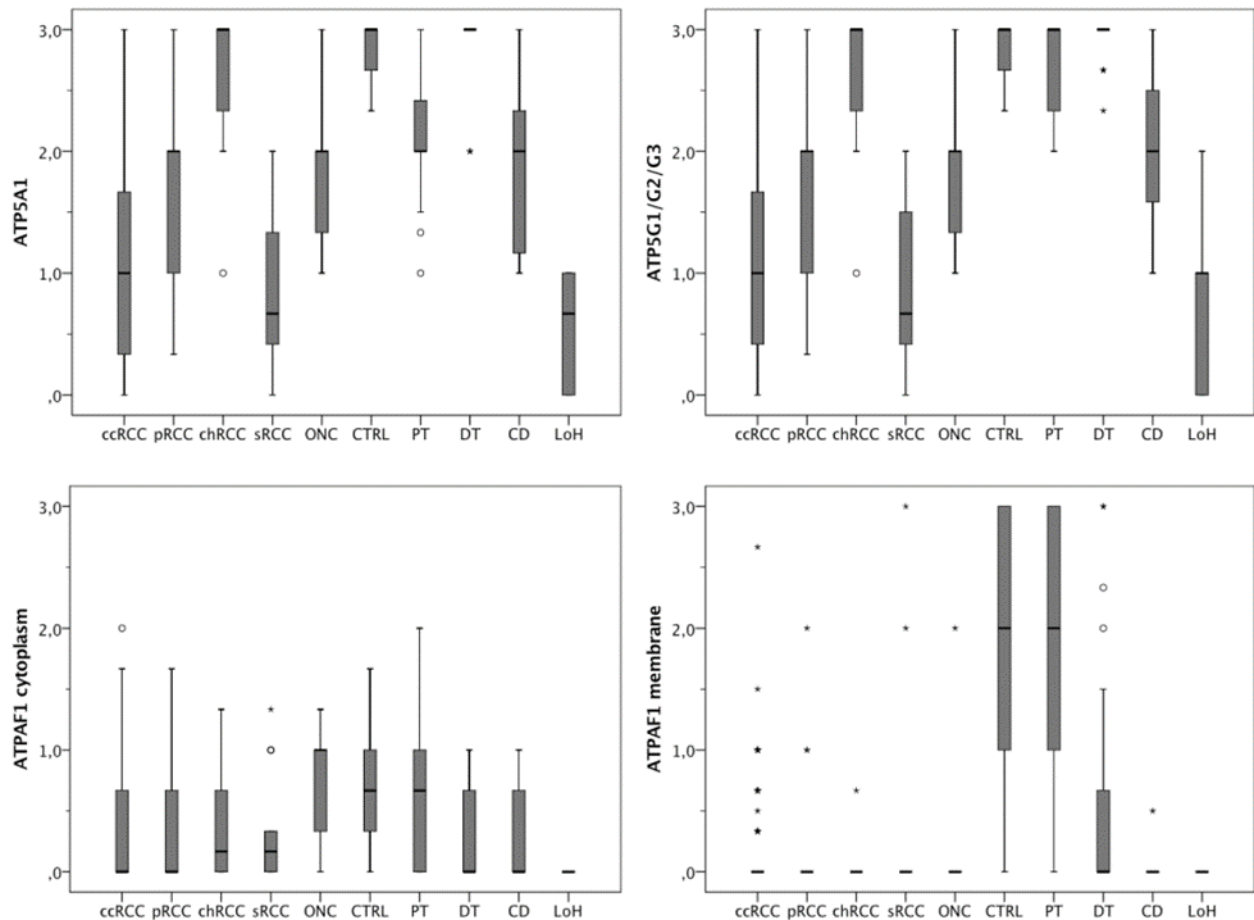


Abb. 4: Vergleich der Expression von ATP5A1, ATP5G1 / G2 / G3 und ATPAF1 im benignen und malignen Nierengewebe. Die Expression der o.g. Protein wurde mittels IHC auf einem TMA bestimmt, welches klarzelliges (ccRCC), papilläres (pRCC) und sarkomatöses (sRCC) Nierenzellkarzinomgewebe sowie Onkozytome (ONC) und normales Nierengewebe (proximale Tubuli, PT; distale Tubuli, DT; Schleife von Henle, LoH; Sammelkanal, CD) enthält. Das ccRCC-Gewebe zeichnet sich durch signifikant niedrigere Expression von ATP5A1, ATP5G1 / G2 / G3 und ATPAF1 im Vergleich zu anderen RCC-Subtypen bzw. normalem Nierengewebe aus.

Eine Korrelation zwischen den untersuchten Proteinen und klinischen Parametern (d.h. pT-Stadium, Metastasen, Grading, alle $p > 0,15$) bei Patienten mit ccRCC konnte nicht

festgestellt werden. Es lagen für 86 Patienten Follow-up-Daten vor. Die Kaplan Meier-Schätzungen zeigten bei deren Analyse eine Korrelation zwischen der *ATPAF1*- (zytoplasmatische und Membranfärbung) und *ATP5G1/G2/G3*-Expression und dem Gesamtüberleben von ccRCC-Patienten (Log-Rank $p < 0,05$; siehe Abb. 5). Die univariate Cox-Regressionsanalyse zeigte ebenfalls anhand der Follow-up-Daten, dass eine stärkere Immunfärbung von *ATPAF1* und *ATP5G1/G2/G3* mit einer schlechteren Gesamtüberlebensrate korrelierte (*ATPAF1*-Zytoplasma: $p = 0,036$, Hazard Ratio (HR) = 2,23, 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) 1,06–4,74; *ATPAF1*-Membran: $p = 0,039$, HR = 2,85, 95 % CI 1,05–7,72; *ATP5G1/G2/G3*: $p = 0,032$, HR = 2,38, 95 % CI 1,07–5,07). Der prädiktive Wert verlor sich jedoch im multivariaten Modell mit TNM-Stadium und Grading. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Anzahl der Fälle ($n = 86$) die statistische Aussagekraft begrenzt und die geringe Anzahl von Patienten mit Lymphknotenmetastasen ($n = 6$, univariate Analyse HR 10.22) die Bedeutung einer multivariaten Analyse einschränkt (siehe Tab. 4).

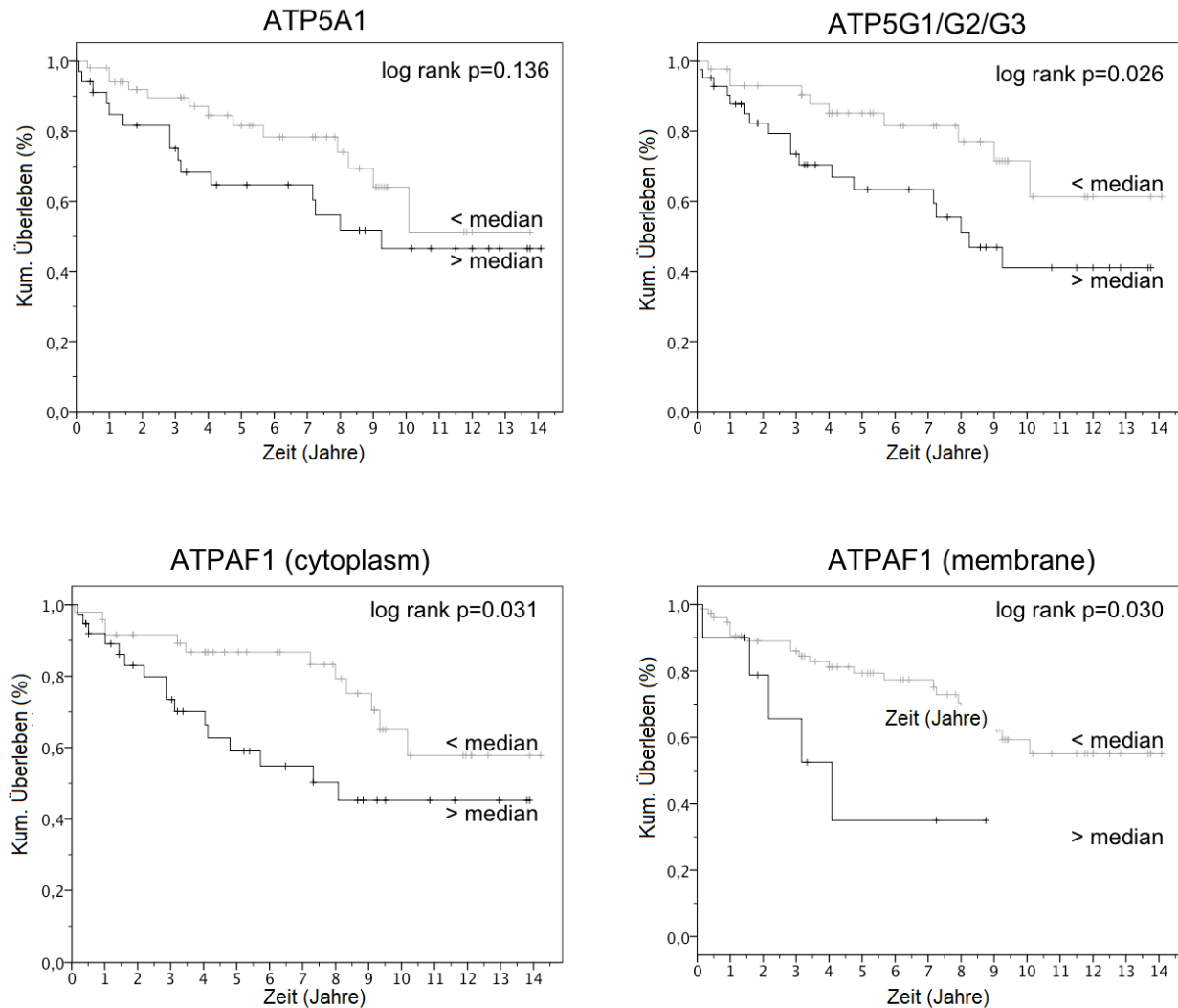


Abb. 5: Kaplan Meier Analyse für das Gesamtüberleben nach Nephrektomie in Abhängigkeit vom Expressionsstatus von ATP5A1, ATPG1/G2/G3 und ATPAF1 bei IHC. Die Kaplan Meier Analyse zeigt, dass eine erhöhte Expression von ATPAF1 und ATP5G1/G2/G3 mit einem verkürzten Gesamtüberleben nach radikaler/partieller Nephrektomie assoziiert ist.

Tab. 4: Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse zur Vorhersage des Gesamtüberlebens von Patienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom

	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	p-Wert	HR	(95 % CI)	p-Wert	HR	(95 % CI)
pT-Stadium	0,432	1,19	(0,77–1,85)			
LK-Metastasen	<0,001	10,22	(3,53–29,58)	0,001	7,59	(2,31–24,98)
Fernmetastasen	0,129	1,28	(0,93–1,75)			
Grading	0,005	3,81	(1,51–9,66)	0,051	3,82	(0,99–6,88)
ATPAF1 Zytoplasma	0,036	2,23	(1,06–4,74)	0,595	1,29	(0,50–3,29)
ATPAF1 Membran	0,039	2,85	(1,05–7,72)	0,751	1,21	(0,37–3,94)
ATP5G1/G2/G3	0,032	2,38	(1,07–5,07)	0,238	1,78	(0,67–4,29)
ATP5A1	0,143	1,75	(0,83–3,69)			

HR, Hazard Ratio; 95 % CI, 95 % Konfidenzintervall.

1.5 Diskussion

Otto Warburg entdeckte bereits 1924 einen für Tumorzellen typischen Metabolismus, den heute so genannten „Warburg-Effekt“. Dieser beschreibt eine tumortypische Energiegewinnung durch eine hohe Aktivität der anaeroben Glykolyse, selbst in Gegenwart von ausreichend Sauerstoff. Er stellte daraufhin die Hypothese auf, dass eine fehlerhafte mitochondriale Funktion in Tumorzellen eine Hauptursache für die Karzinogenese darstellt (Warburg et al., 1927; Warburg, 1956). Bei den meisten Tumorarten bleiben dabei jedoch andere Stoffwechselwege wie die ETK neben der erhöhten Glykolyse erhalten (Meierhofer, 2004). In einigen Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied beim ccRCC darin besteht, dass die meisten Signalwege neben der Glykolyse herunterreguliert sind (Gatto et al., 2014; Unwin et al., 2003; Perroud et al., 2006; Meierhofer, 2004). Es wird angenommen, dass ein Funktionsverlust des Tumorsuppressorproteins von VHL in 90 % der Fälle das auslösende genetische Ereignis ist. Aufgrund dieses Verlustes führt eine Stabilisierung von Hypoxie-induzierbaren Faktoren wie HIF-1 α und HIF-2 α zu einer massiven Angiogenese (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Das gesteigerte Level von HIF und seine Zielgenaktivierung machen beim RCC einen Großteil seiner einzigartigen Attribute aus, wie z.B. das adipose

differentiation related peptide, Akkumulation neutraler Lipide und Klarzell-Histologie; Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und andere Angiokine, Vaskularität; Erythropoietin und paraneoplastische Polyzythämie (Rathmell and Chen, 2008). Dieses verbesserte Verständnis der molekularen Stoffwechselwege in ccRCC ermöglichte den Einsatz von Zieltherapien mit VEGF-Inhibitoren wie dem Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib, der 2006 auf dem Markt zugelassen wurde, und mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)-Inhibitoren wie Temsirolimus. Im metastasierten Stadium gelingt es mit diesen beiden Substanzklassen das Gesamt- und progressionsfreie Überleben zu verlängern (Doehn et al., 2016). Trotz dieser Entwicklung ist die Therapie des metastasierten RCC noch immer palliativ. Es steht kein Biomarker zur Verfügung um ccRCC zu identifizieren oder die Behandlungsreaktion zu beobachten.

In den letzten Jahren haben der Warburg-Effekt und die Erforschung des Krebsstoffwechsels wieder eine Renaissance erfahren und ein besonderes Interesse auf die Mitochondrien und ihre Rolle bei der Apoptose (Green and Reed, 1998; Ferri and Kroemer, 2001; Wang, 2001) und der Karzinogenese (Thompson, 1995; Reed, 1999) gelenkt.

Die deutliche Selektion der Energiegewinnung im ccRCC hin zur Glykolyse könnte, neben der Möglichkeit zur Überwachung, die Option eröffnen glykolytische Inhibitoren für die Behandlung von ccRCC zu entwickeln.

In einer vorangegangenen Arbeitsgruppe wurden bereits Gene der mitochondrialen ETK untersucht und eine signifikante Herunterregulation von UQCRC1, UQCRFS1, NDUFS1 und *NDUFA4* (Schrödter et al., 2016; Ellinger et al., 2016b; Ellinger et al., 2016a) und eine Hochregulation des Paralogs *NDUFA4L2* (Müller et al., 2015) nachgewiesen.

Mithilfe von publizierten Microarray-Expressionsprofilen haben wir daraufhin die Expression der verschiedenen Untereinheiten der mitochondrialen ATP-Synthase in ccRCC untersucht. Es zeigte sich, dass es bei 80 % der 29 Untereinheiten eine Dysregulation (meistens Herabregulation) in mindestens einer, teils auch mehreren Microarray-Studien kam.

Durch qRT-PCR bei der ATP5A1-, ATP5B-, ATPAF1-, ATP5G1-, ATP5G2-, ATP5G3- und ATP5S-mRNA konnte eine Herabregulation in ccRCC im Vergleich zu normalem

Nierengewebe nachgewiesen werden. Die Gültigkeit der Methode wurde durch eine zweite qRT-PCR in einer vergrößerten Kohorte (74 ccRCC und 36 normale Nierengewebe) bestätigt. Die Proteinexpression ausgewählter Gene (ATPAF1, ATP5G1, ATP5G2, ATP5G3 und ATP5A1) im ccRCC wurde mittels Westernblot und IHC bestimmt und erwies sich ebenfalls als herabreguliert.

Diese Ergebnisse unterstützen unsere Hypothese, dass die Aktivität der mitochondrialen ETK durch Herabregulation ihrer Untereinheiten reduziert wird, was zu einer verminderten oxidativen Phosphorylierung führt.

Trotz zahlreicher, besonders die Proteomik betreffende Studien, gibt es bis heute keine Biomarker für das RCC. Diese Studie zeigt mehrere - bisher unbekannte Biomarker-Kandidaten - in ccRCC.

Bei der Expression der ATP-Synthase-Untereinheit ATP5G1 konnte eine 6-fache Herabregulation auf mRNA-Ebene beobachtet werden und auch auf Proteinebene war das Kombinations-Protein aus *ATP5G1/G2/G3* im ccRCC-Gewebe stark herab reguliert. Die ebenfalls veränderte Expression von ATP5G2 korrelierte mit dem Gesamtüberleben von Patienten mit ccRCC. Es muss angemerkt werden, dass für die Immunohistochemie und die Westernblot-Analyse kein hochspezifischer Antikörper für das *ATP5G1* Protein verfügbar war und der verwendete Antikörper auch *ATP5G2*- und *ATP5G3*-Untereinheiten, gemäß Hersteller-Angaben, erkannte. Nach bestem Wissen ist dies die erste Studie, die eine Dysregulation von *ATP5G1* bei Tumorerkrankungen zeigt. Natera-Naranjo et al. beschrieb 2012 die signifikante Reduktion des axonalen ATP5G1-Proteins und der ATP-Spiegel durch siRNA vermittelten Knock-down der ATP5G1-mRNA. Als Reaktion auf die Stummschaltung verstärkte sich die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Natera-Naranjo et al., 2012).

Eine weitere Rolle für die Pathogenese von ccRCC scheint das Gen *ATP5A1* zu spielen. Es zeigte sich sowohl eine 3,5-fache Herabregulation der mRNA als auch eine signifikante Verringerung des Proteingehalts von *ATP5A1* im ccRCC im Vergleich zum normalen Nierengewebe. Das *ATP5A1*-Transkript deutete in der Westernblot-Analyse eine Korrelation mit der Tumorabstufung an, zeigte aber keine Korrelation zwischen der Gen-

Expression und den klinisch-pathologischen Parametern. In einer späteren unabhängigen Studie von Yuan et al. konnte jedoch anhand einer Cox-Regressionsanalyse eine Assoziation zwischen *ATP5A1* und der Progression von ccRCC gezeigt werden (Yuan et al., 2018). Eine pathogene Rolle der Untereinheit *ATP5A1* wurde bereits von anderen Forschern mit Malignomen in Zusammenhang gebracht. So wurde es, gemeinsam mit *ATP5B*, als ein modifizierendes Gen in der Pathogenese von Glioblastomen beschrieben, welches in Glioblastomzellen und Endothelzellen der mikrovaskulären Proliferation stark exprimiert wird (Xu and Li, 2016). Umgekehrt beschrieben Seth et al., dass niedrige *ATP5A1*-Konzentrationen die Entwicklung von kolorektalen Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität erleichtern (Seth et al., 2009).

Ein weiteres im ccRCC deutlich herunterreguliertes Gen stellte *ATPAF1* dar, welches wie *ATP5G2* eine Korrelation zwischen der Genexpression und dem Gesamtüberleben bei Patienten mit ccRCC zeigte. Es wurde bereits in einer anderen Studie festgestellt, dass ein RNAi-vermittelter Knockdown von *ATPAF1* das Zellwachstum von Prostatakarzinomzellen in Androgenmangelzuständen signifikant ($p < 0,05$) reduziert (Schinke et al., 2014). In dieser Studie zeigte sich interessanterweise in der Immunohistochemie, dass *ATPAF1* nicht nur im Zytoplasma des normalen Nierengewebes nachgewiesen werden konnte, sondern auch eine Membranfärbung der proximalen Tubuli zu beobachten war. Die Relevanz der *ATPAF1*-Lokalisierung bleibt jedoch unbekannt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass mehrere Gene der mitochondrialen ATP-Synthase eine Herunterregulierung in ccRCC aufweisen. Dies verbessert das Verständnis der Dysregulation in RCC mit ihrer reduzierten Aktivität der mitochondrialen ETK und könnte gleichzeitig als Grundlage für zukünftige Studien in Bezug auf gezielte therapeutische Maßnahmen, als auch auf der Suche nach Biomarkern in RCC dienen. Um diese Ergebnisse zu untermauern und die funktionelle Relevanz der veränderten Expression der Komplex-V-Untereinheiten nachzuweisen sind weitere Analysen wie ROS oder die extrazelluläre Flussanalyse in vitro nötig.

1.6 Literaturverzeichnis

- Beroukchim R, Brunet J-P, Di Napoli A, Mertz KD, Seeley A, Pires MM, et al. Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippel lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* 2009; 69: 4674–4681.
- Blondeau J, Deng M, Syring I, Schrödter S, Schmidt D, Perner S, et al. Identification of novel long non-coding RNAs in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Epigenetics* 2015; 7: 10.
- Canda AE, Kirkali Z. Current management of renal cell carcinoma and targeted therapy. *Urol J* 2006; 3: 1–14.
- Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF, Järholm B. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med* 2000; 343: 1305–1311.
- Deng M, Blondeau JJ, Schmidt D, Perner S, Müller SC, Ellinger J. Identification of novel differentially expressed lncRNA and mRNA transcripts in clear cell renal cell carcinoma by expression profiling. *Genomics Data* 2015; 5: 173–175.
- Devenish RJ, Prescott M, Roucou X, Nagley P. Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2000; 1458: 428–442.
- Doehn C, Grünwald V, Steiner T, Follmann M, Rexer H, Krege S. The Diagnosis, Treatment, and Follow-up of Renal Cell Carcinoma. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113: 590–596.
- Dorn GW. Mitochondrial dynamism and heart disease. *EMBO Mol Med* 2015; 7: 865–77.
- Dupasquier S, Delmarcelle A-S, Marbaix E, Cosyns J-P, Courtoy PJ, Pierreux CE. Validation of housekeeping gene and impact on normalized gene expression in clear cell renal cell carcinoma: critical reassessment of YBX3/ZONAB/CSDA expression. *BMC Mol Biol* 2014; 15: 9.
- Eckel-Passow JE, Serie DJ, Bot BM, Joseph RW, Hart SN, Cheville JC, et al. Somatic expression of ENRAGE is associated with obesity status among patients with clear cell renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2014; 35: 822–827.
- Ellinger J, Gromes A, Poss M, Brüggemann M, Schmidt D, Ellinger N, et al. Systematic expression analysis of the mitochondrial complex III subunits identifies UQCRC1 as biomarker in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2016a; 7: 86490–86499.
- Ellinger J, Kahl P, Mertens C, Rogenhofer S, Hauser S, Hartmann W, et al. Prognostic relevance of global histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 2010; 127: 2360–2366.
- Ellinger J, Poss M, Brüggemann M, Gromes A, Schmidt D, Ellinger N, et al. Systematic Expression Analysis of Mitochondrial Complex I Identifies NDUFS1 as a Biomarker in Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. *Clinical Genitourinary Cancer* 2016b.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide. *Int. J. Cancer* 2015; 136: E359-E386.
- Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E255-E263.

- Gatto F, Nookaew I, Nielsen J. Chromosome 3p loss of heterozygosity is associated with a unique metabolic network in clear cell renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: E866-E875.
- Gebhard RL, Clayman RV, Prigge WF, Figenschau R, Staley NA, Reese C, et al. Abnormal cholesterol metabolism in renal clear cell carcinoma. *J Lipid Res* 1987; 28: 1177–1184.
- Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet* 2014; 46: 225–233.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. (GEKID) und des Zentrums für Krebsregisterdaten. Krebs in Deutschland für 2013/2014, https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Nierenkrebs/nierenkrebs_node.html; 2014.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309–12.
- Greie J-C, Deckers-Hebestreit G, Altendorf K. Secondary structure composition of reconstituted subunit b of the Escherichia coli ATP synthase. *European Journal of Biochemistry* 2000; 267: 3040–3048.
- Gumz ML, Zou H, Kreinest PA, Childs AC, Belmonte LS, LeGrand SN, et al. Secreted frizzled-related protein 1 loss contributes to tumor phenotype of clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4740–4749.
- Higgins JPT, Shinghal R, Gill H, Reese JH, Terris M, Cohen RJ, et al. Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray. *Am J Pathol* 2003; 162: 925–932.
- Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers* 2017; 3: 17009.
- Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking. *Int J Cancer* 2005; 114: 101–108.
- Jones J, Otu H, Spentzos D, Kolia S, Inan M, Beecken WD, et al. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5730–5739.
- Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Kristiansen G, et al. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 47.
- Kort EJ, Farber L, Tretiakova M, Petillo D, Furge KA, Yang XJ, et al. The E2F3-Oncomir-1 axis is activated in Wilms' tumor. *Cancer Res* 2008; 68: 4034–4038.
- Lenburg ME, Liou LS, Gerry NP, Frampton GM, Cohen HT, Christman MF. Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer* 2003; 3: 31.
- Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma. *European Urology* 2010; 58: 398–406.

- MCLAUGHLIN J, LIPWORTH L, TARONE R. Epidemiologic Aspects of Renal Cell Carcinoma. *Seminars in Oncology* 2006; 33: 527–533.
- Meierhofer D. Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1005–1010.
- Müller FE, Braun M, Syring I, Klümper N, Schmidt D, Perner S, et al. NDUFA4 expression in clear cell renal cell carcinoma is predictive for cancer-specific survival. *Am J Cancer Res* 2015; 5: 2816–2822.
- Natera-Naranjo O, Kar AN, Aschrafi A, Gervasi NM, Macgibeny MA, Gioio AE, et al. Local translation of ATP synthase subunit 9 mRNA alters ATP levels and the production of ROS in the axon. *Mol Cell Neurosci* 2012; 49: 263–270.
- Ooi A, Wong J-C, Petillo D, Roossien D, Perrier-Trudova V, Whitten D, et al. An antioxidant response phenotype shared between hereditary and sporadic type 2 papillary renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2011; 20: 511–523.
- Pena-Llopis S, Vega-Rubin-de-Celis S, Liao A, Leng N, Pavia-Jimenez A, Wang S, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2012; 44: 751–759.
- Perroud B, Lee J, Valkova N, Dhirapong A, Lin P-Y, Fiehn O, et al. Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. *Mol Cancer* 2006; 5: 64.
- Rathmell WK, Chen S. VHL inactivation in renal cell carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8: 63–73.
- Reed JC. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Current Opinion in Oncology* 1999; 11.
- Roemeling CA von, Radisky DC, Marlow LA, Cooper SJ, Grebe SK, Anastasiadis PZ, et al. Neuronal pentraxin 2 supports clear cell renal cell carcinoma by activating the AMPA-selective glutamate receptor-4. *Cancer Res* 2014; 74: 4796–4810.
- Schinke EN, Bii V, Nalla A, Rae DT, Tedrick L, Meadows GG, et al. A novel approach to identify driver genes involved in androgen-independent prostate cancer. *Mol Cancer* 2014; 13: 120.
- Schrödter S, Braun M, Syring I, Klümper N, Deng M, Schmidt D, et al. Identification of the dopamine transporter SLC6A3 as a biomarker for patients with renal cell carcinoma. *Molecular Cancer* 2016; 15: 1–10.
- Seth R, Keeley J, Abu-Ali G, Crook S, Jackson D, Ilyas M. The putative tumour modifier gene ATP5A1 is not mutated in human colorectal cancer cell lines but expression levels correlate with TP53 mutations and chromosomal instability. *J Clin Pathol* 2009; 62: 598–603.
- Stickel JS, Weinzierl AO, Hillen N, Drews O, Schuler MM, Hennenlotter J, et al. HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 1407–1417.
- Tan M-H, Li H, Choong CV, Chia KS, Toh CK, Tang T, et al. The Karakiewicz nomogram is the most useful clinical predictor for survival outcomes in patients with localized renal cell carcinoma. *Cancer* 2011; 117: 5314–5324.

- The Cancer Genome Atlas Research Network, Creighton CJ, Morgan M, Gunaratne PH, Wheeler DA, Gibbs RA, et al. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013; 499: 43–49.
- Thompson C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456–1462.
- Unwin RD, Craven RA, Harnden P, Hanrahan S, Totty N, Knowles M, et al. Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics* 2003; 3: 1620–1632.
- Walker JE, Wikström M: *Mechanisms of Primary Energy Transduction in Biology*. London, 2017. 338–373.
- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 2001; 15: 2922–2933.
- Wang Y, Roche O, Yan MS, Finak G, Evans AJ, Metcalf JL, et al. Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway. *Nat Med* 2009; 15: 319–324.
- Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956; 123: 309–314.
- Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol* 1927; 8: 519–530.
- Wozniak MB, Le Calvez-Kelm F, Abedi-Ardekani B, Byrnes G, Durand G, Carreira C, et al. Integrative genome-wide gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma in Czech Republic and in the United States. *PLoS One* 2013; 8: e57886.
- Xu G, Li JY. ATP5A1 and ATP5B are highly expressed in glioblastoma tumor cells and endothelial cells of microvascular proliferation. *J Neurooncol* 2016; 126: 405–413.
- Yuan L, Chen L, Qian K, Wang G, Lu M, Qian G, et al. A novel correlation between ATP5A1 gene expression and progression of human clear cell renal cell carcinoma identified by co-expression analysis. *Oncol Rep* 2018; 39: 525–536.

2. Veröffentlichung

Systematic Analysis of the Expression of the Mitochondrial ATP Synthase (Complex V) Subunits in Clear Cell Renal Cell Carcinoma

Maria Brüggemann^{*}, Arabella Gromes^{*}, Mirjam Poss^{*}, Doris Schmidt^{*}, Niklas Klümper^{*}, Yuri Tolkach[†], Dimo Dietrich^{†,‡}, Glen Kristiansen[†], Stefan C Müller^{*} and Jörg Ellinger^{*}

^{*}University Hospital Bonn, Department of Urology, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53105 Bonn, Germany;

[†]University Hospital Bonn, Institute of Pathology, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53105 Bonn, Germany; [‡]University Hospital Bonn, Department of Otorhinolaryngology/Head and Neck Surgery, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53105 Bonn, Germany

Abstract

Mitochondrial dysfunction is common in cancer and the mitochondrial electron transport chain is often affected in carcinogenesis. To date, little is known about the expression of the ATP synthase subunits in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). The NextBio database was used to determine an expression profile of the ATP synthase subunits based on published microarray studies. We observed down-regulation of 23 out of 29 subunits of the ATP synthase. Differential expression was validated exemplarily for 12 genes (*ATP5A1*, *ATP5B*, *ATPAF1*, *ATP5C1*, *ATP5D*, *ATP5O*, *ATP5F1*, *ATP5G1*, *ATP5G2*, *ATP5G3*, *ATP5I*, *ATP5S*; screening cohort ccRCC n = 18 and normal renal tissue n = 10) using real-time PCR. Additional eight genes (*ATP5A1*, *ATP5B*, *ATPAF1*, *ATP5F1*, *ATP5G1*, *ATP5G2*, *ATP5G3*, *ATP5S*) were internally validated within an enlarged cohort (ccRCC n = 74; normal renal tissue n = 36). Furthermore, down-regulation of *ATP5A1*, *ATPAF1*, *ATP5G1/G2/G3* was confirmed on the protein level using Western Blot and immunohistochemistry. We observed that altered expression of *ATPAF1* and *ATP5G1/G2/G3* was correlated with overall survival in patients with ccRCC. In conclusion, down-regulation of many ATP Synthase subunits occurs in ccRCC and is the basis for the reduced activity of the mitochondrial electron chain. Alteration of the expression of *ATP5A1*, *ATPAF1*, and *ATP5G1/G2/G3* is characteristic for ccRCC and may be prognostic for ccRCC patients' outcome.

Translational Oncology (2017) 10, 661–668

Introduction

In 2012, renal tumors accounted for approximately 2% to 3% of all new cancer cases in the world, with cases occurring more frequently in developed regions [1]. The incidence of renal cell carcinoma (RCC) is increasing by 1.5% to 5.9% each year [1]. RCC with the predominant clear cell subtype is the most common renal tumor entity. Despite many efforts, there are no biomarkers available for patients with renal tumors; the identification of a suitable biomarker could aid the clinician in identifying patients needing treatment of a renal tumor.

In recent years, there has been an increasing interest in mitochondria because of their role as sensors and executioners of apoptosis [2–4] and their involvement in carcinogenesis [5,6]. In 1924, Otto Warburg discovered that tumor cells receive energy from

glycolysis rather than the mitochondrial oxidative phosphorylation. He established the hypothesis that faulty mitochondrial functions in tumor cells are major causes of carcinogenesis [7].

Usually, other metabolic pathways such as the mitochondrial electron transport chain are maintained along with the increased

Address all correspondence to: Jörg Ellinger, Universitätsklinikum Bonn, Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53105 Bonn, Germany.

E-mail: joerg.ellinger@ukbonn.de

Received 2 May 2017; Revised 31 May 2017; Accepted 5 June 2017

© 2017 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Neoplasia Press, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), 1936-5233

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2017.06.002>

aerobic glycolysis [8]. However, some studies showed that, as opposed to other tumor types, most alternative pathways besides increased aerobic glycolysis are down-regulated in clear cell renal cell carcinomas (ccRCC) [9–12]. Nevertheless, it is still not completely understood why ccRCC seems to knock down all other ways to earn energy except glycolysis.

The F1F0 ATP synthase represents the fifth complex of the mitochondrial electron transport chain and contains 29 subunits. It consists of two sub complexes, the membrane-spanning component (F0) and the water-soluble complex (F1). While the larger F1 particle, with its catalytic core, is composed by five different subunits (α , β , γ , δ and ϵ), the F0 particle embodies three main subunits (a, b and c) and, depending on the species, a various amount of additional ones (humans six: d, e, f, g, F6 and 8) [13].

The aim of this study was to develop a better understanding of the expression of ATP synthase in ccRCC and the determination of potential new ccRCC biomarkers.

Materials and Methods

NextBio Database

The NextBio database (Illumina, San Diego, CA, USA) was used to review published gene expression profiling studies ($n = 17$) [14–29]. The last database query was performed on 20 August 2015. The retrieval for the comparison of normal renal and ccRCC tissue was restricted to the parameters of human, mRNA and fresh frozen tissue.

Patients

The prospective collection of tissue samples was performed within the framework of the Biobank at the CIO Cologne-Bonn. All patients underwent radical or partial nephrectomy at the Department of Urology at the University Hospital Bonn. Written informed consent for the collection of biomaterials was obtained from all patients and the study was approved by the local ethic committee (vote: 280/12).

The specimens were split for formalin fixation, paraffin embedding and fresh-frozen storage. Before use, the tissues were re-evaluated by an uropathologist and classified according the World Health Organization (WHO) classification from 2009. Fresh-frozen tissues were stored at -80°C , and used for qPCR (92 ccRCC and 46 normal renal tissues) and Western Blot (corresponding 8 ccRCC and normal renal tissues) experiments. Formalin-fixed, paraffin embedded tissues were used for the construction of a tissue microarray with 191 RCC specimens [comprising 141 clear-cells, 29 papillary (pRCC), 10 chromophobe (chRCC) and 11 sarcomatoid (sRCC) RCC], 10 oncocytoma and 30 normal renal tissue samples were used for immunochemistry experiments [30]. The detailed clinical-pathological parameters are shown in Tables 1 and 2.

Quantitative Real-Time PCR

RNA isolation was performed as described before [31]. In brief, total RNA was isolated with the mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Foster City, CA, USA) and afterwards treated with DNase (DNA-free Kit, Ambion). RNA quantity was determined using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). RNA integrity was confirmed by evaluation of the 28S and 18S rRNA bands in a gel electrophoresis.

The expression of 12 differentially expressed genes (*ATP5A1*, *ATP5B*, *ATPAF1*, *ATP5C1*, *ATP5D*, *ATP5O*, *ATP5F1*, *ATP5G1*,

ATP5G2, *ATP5G3*, *ATP5I*, *ATP5S*) was investigated in a screening cohort of 18 ccRCC and 10 normal renal tissue samples. Subsequently, the eight most down-regulated genes (*ATP5A1*, *ATP5B*, *ATPAF1*, *ATP5F1*, *ATP5G1*, *ATP5G2*, *ATP5G3*, *ATP5S*) were analyzed in a validation cohort (74 ccRCC and 36 normal renal tissues). cDNA was synthesized from 1 μg total RNA using the PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Takara Bio, Saint-Germain-en Laye, France). For qPCR, we used 5 ng/ μl cDNA templates with the 1 \times SYBR Premix Ex Taq II and ROX Plus with 10 pmol/ μl forward/reverse primer (see Supplementary Table S1). PCR experiments were performed on an ABIPrism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Data analysis was accomplished using QBase + (Biogazelle) with PPIA and ACTB [32,33], earlier shown to be suitable reference genes, in the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ algorithm.

Western Blot

In order to validate gene expression at the protein level, we performed Western blot analyses for ATP5A1, ATPAF1, ATP5G1, ATP5G2 and ATP5G3; the experimental procedure was performed as described earlier [34]: Corresponding fresh-frozen tissues (50 mg ccRCC and normal renal tissue) from 8 patients (4 \times UICC stage I; 4 \times stage III) were homogenized in a Precellys 24 (Peqlab, Erlangen, Germany) with 400 μl Cell lysis Buffer (Cell Signaling, Cambridge, United Kingdom) including Complete Mini EDTA-free protease inhibitor (Roche, Basel, Switzerland). The protein concentration was determined (BCA Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), 30 ng protein per well loaded into a NuPAGE 4–12% denaturing PAA Gel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and separated in a XCell4 SureLock electrophoresis system (Life Technologies). As molecular weight marker a biotinylated protein ladder (Cell Signaling Technology, Cambridge, UK) and PageRuler Prestained (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was used. The specimens were transmitted on 0.2 μm nitrocellulose (XCell II, Life Technologies) and the proteins were blocked by 5% milk powder (Merck, Darmstadt, Germany). Subsequently, immunostaining was performed with antibodies against ATP5A1 1:1000 (#ab14748,

Table 1. Clinical-Pathological Parameters of the Study Cohorts for PCR

	Screening Cohort		Validation Cohort	
	ccRCC n = 18 (%)	Normal n = 10 (%)	ccRCC n = 74 (%)	Normal n = 36 (%)
Sex				
Male	11 (61.1)	6 (60.0)	53 (71.6)	26 (72.2)
Female	7 (38.8)	4 (40.0)	21 (28.4)	10 (27.7)
Age				
Mean	64.83	66.4	66.5	64.75
Min-max	43–83	46–89	38–89	43–86
Pathological stage				
pT1	7 (38.8)	n.a.	42 (56.8)	n.a.
pT2	2 (11.1)	n.a.	7 (9.5)	n.a.
pT3	8 (44.4)	n.a.	24 (32.4)	n.a.
pT4	1 (5.5)	n.a.	1 (1.4)	n.a.
Vascular invasion	7 (38.8)	n.a.	24 (32.4)	n.a.
LN metastasis	0	n.a.	2 (2.7)	n.a.
Distant metastasis	1 (5.5)	n.a.	14 (18.9)	n.a.
Grading				
Grade 1	1 (5.5)	n.a.	9 (12.2)	n.a.
Grade 2	13 (72.2)	n.a.	47 (63.5)	n.a.
Grade 3	3 (16.6)	n.a.	15 (20.3)	n.a.
Grade 4	1 (5.5)	n.a.	3 (4.1)	n.a.

Table 2. Clinical-Pathological Parameters of the Study Cohorts for Immunohistochemistry

	ccRCC n = 141 (%)	pRCC n = 29 (%)	chRCC n = 10 (%)	sRCC n = 11 (%)	RO n = 10 (%)	normal n = 30 (%)
Sex						
Male	88 (62.4)	26 (89.6)	6 (60.0)	7 (63.6)	0	21 (70.0)
Female	53 (37.6)	3 (10.3)	4 (40.0)	3 (27.3)	10 (100)	9 (30.0)
Age						
Mean	62.11	61.45	63.2	62.1	57.6	57.93
Min-max	26–85	35–82	27–85	51–75	26–73	28–80
Pathological stage						
pT1	59 (41.8)	19 (65.5)	6 (60.0)	0	n.a.	n.a.
pT2	31 (22.0)	5 (17.2)	4 (40.0)	1 (9.1)	n.a.	n.a.
pT3	49 (34.8)	5 (17.2)	0	8 (72.7)	n.a.	n.a.
pT4	2 (1.4)	0	0	1 (9.1)	n.a.	n.a.
Vascular invasion	43 (30.5)	0	0	8 (72.7)	n.a.	n.a.
LN metastasis	8 (5.7)	1 (3.4)	0	5 (45.5)	n.a.	n.a.
Distant metastasis	18 (12.8)	3 (10.3)	0	6 (54.5)	n.a.	n.a.
Grading						
Grade 1	44 (31.2)	11 (37.9)	3 (30.0)	0	n.a.	n.a.
Grade 2	94 (66.7)	16 (55.1)	7 (70.0)	1 (9.1)	n.a.	n.a.
Grade 3	3 (2.1)	2 (6.9)	0	7 (63.6)	n.a.	n.a.
Grade 4	0	0	0	2 (18.2)	n.a.	n.a.

RO, renal oncocytoma; LN, Lymph node; n.a., not applicable.

Abcam, Cambridge, UK), ATPAF1 1:1000 (#HPA044950, Sigma-Aldrich, Munich, Germany), a combined antibody against ATP5G1, ATP5G2 and ATP5G3 1:5000 (#ab180149, Abcam), GAPDH (#2118, Cell Signaling Technology), and beta-actin (#A5316, Sigma-Aldrich). The detection was carried out with horseradish peroxidase conjugated to secondary antibodies (anti-rabbit-POD, #170–6515, Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany; anti-mouse-POD, #170–6516, Bio-Rad; anti-biotin-POD, #7075, Cell Signaling Technology). The chemiluminescent signal was visualized using SuperSignal West Femto Kit (Thermo Scientific) and recorded by the LAS 3000 Image Reader (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Immunohistochemistry

A tissue microarray was used to determine the expression of ATP5A1, ATPAF1, ATP5G1, ATP5G2, and ATP5G3 in RCC and benign renal tissue specimens. Paraffin sections were cut at 5 μ m thickness, deparaffinized using xylene and rehydrated in graded ethanol. Slides were placed in citrate buffer (pH 6.0) for ATP5A1 and ATPAF1 and Tris/EDTA buffer (pH 9.0) for ATP5G1/G2/G3 and heated for 10 min at boiling temperature (microwave 600 W). After 30 min resting time and 15 min for cooling, the endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide for 10 minutes. The sections were washed with Tris-buffered saline and Tween 20 (Fa. Merck 8.22184). The primary antibodies diluted with Antibody diluent (Fa. Dako No. S3022) (anti-ATP5A1, dilution 1:1000; anti-ATPAF1, dilution 1:50; anti-ATP5G1/G2/G3, dilution 1:100) were applied according to the manufacturer's instructions. The slides were incubated at 4 °C overnight and signal detection was performed with Dako Envision + System-HRP Labeled Polymer (Dako, Hamburg, Germany) with secondary antibodies against rabbit and mouse. Finally, the slides were counterstained using hematoxylin and Bluing Reagent, dehydrated and mounted.

The staining was evaluated by three investigators and, in the case of disagreement, the scoring was discussed at a multi-headed microscope. The staining intensities were scored from 0 to 3, 0 being no staining to 3 being maximum staining. The expression of the target

proteins was recorded for the sub-compartments (proximal/distal tubules, collecting duct, loop of Henle) in the normal tissues.

Statistical Analyses

The Mann–Whitney *U* test was used to correlate clinicopathological parameters and gene expression levels. Cox regression analyses and Kaplan Meier estimates were applied to correlate patient survival and gene expression. All statistical analyses were performed with SPSS Statistics v21 (IBM, Ehningen, Germany).

Results

Identification of Deregulated Subunits of Complex V

Using the NextBio database, we identified 16 microarray studies comparing the expression of normal and ccRCC tissue. Among the 29 analyzed subunits of the ATP synthase, 23 were significantly dysregulated in at least one microarray study: 21 were down- and 2 were up-regulated in ccRCC (see Figure 1).

Validation of Gene Expression Profiling

Among the potentially dysregulated genes, we chose 12 ATP synthase subunits (ATP5A1, ATP5B, ATPAF1, ATP5C1, ATP5D, ATP5O, ATP5F1, ATP5G1, ATP5G2, ATP5G3, ATP5I, ATP5S) for validation within a cohort of ccRCC (n = 18) and normal (n = 10) renal tissue samples using qPCR. As expected, all studied mRNAs were expressed at lower levels in ccRCC compared to normal renal tissue ($P \leq .001$; see Table 3 and Supplementary Figure S1).

In order to provide a substantiated validation, we further investigated 8 genes (ATP5A1, ATP5B, ATPAF1, ATP5F1, ATP5G1, ATP5G2, ATP5G3, ATP5S) in an enlarged independent cohort of 74 ccRCC and 36 normal renal tissues. Consistent with the microarray and qPCR expression results, we confirmed significant down-regulation of all Complex V subunits in ccRCC tissue (all $P < .001$; see Table 3 and Supplementary Figure S2).

ATP5S expression was correlated with presence of metastases ($P = .013$). There was no other correlation of mRNA expression levels with clinical-pathological parameters (i.e. pT-stage, metastasis or grading; all $P > .05$). ATP5G2 expression was correlated with

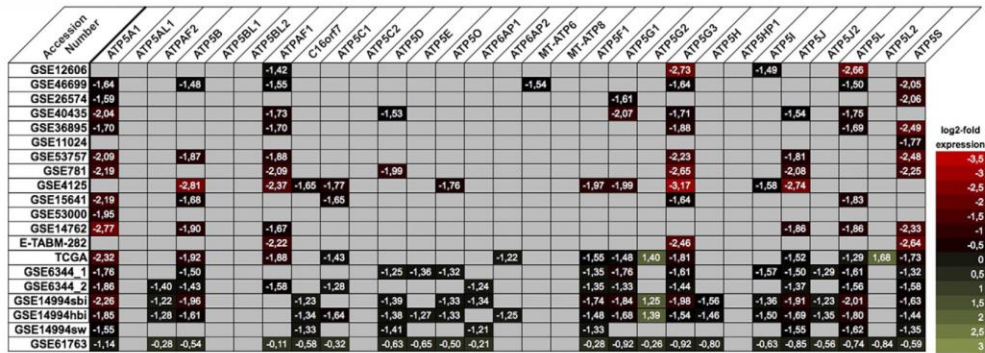


Figure 1. The expression profile of 29 subunits of the ATP synthase (complex V) was retrieved from NextBio database: 12 genes (ATP5A1, ATP5B, ATPAF1, ATP5C1, ATP5D, ATP5O, ATP5F1, ATP5G1, ATP5G2, ATP5G3, ATP5I, and ATP5S) had distinct expression differences of normal and clear cell renal cell carcinoma tissue in several microarray gene expression studies.

overall survival following nephrectomy (log rank $P = .024$; see Supplementary Figure S3).

Western Blot: Validation on Protein Level

In order to confirm the findings on the protein level, we performed a Western blot for ATP5A1, ATPAF1, ATP5G1/G2/G3 with 8 corresponding normal renal and ccRCC tissues. Consistent with the mRNA expression studies, all studied proteins were down-regulated in ccRCC. The blots are summarized in Figure 2, and whole blot images are provided in Supplementary Figure S4.

Immunohistochemistry: Expression in RCC and Normal Renal Tissue

We next performed immunohistochemistry with a tissue microarray including ccRCC (n = 141), pRCC (n = 29), chRCC (n = 10), sRCC (n = 11), oncocytoma (n = 10) as well as normal renal tissues (n = 30). A representative staining of ATP5A1, ATPAF1, and ATP5G1/G2/G3 is shown in Supplementary Figure S5. Consistent with the western blot analysis, we observed decreased expression of ATP5A1, ATPAF1, and ATP5G1/G2/G3 in the cytoplasm of ccRCC compared to normal renal tissue ($P < .001$; see Figure 3). The more detailed analysis of normal tissue indicated that all proteins were expressed at a low level in the Loop of Henle and the collecting duct, whereas its expression was higher in

the proximal and distal tubules. Interestingly, ATPAF1 also showed a membrane staining which was also decreased in ccRCC compared to normal renal tissue. ATPAF1 membrane staining was more intense than cytoplasmic staining in normal tissue. The comparison of ccRCC with other RCC subtypes showed that ATP5A1, and ATP5G1/G2/G3 expression was increased in pRCC ($P < .001$ and $P = .002$) and chRCC (both $P < .001$) compared to ccRCC. Furthermore, the expression of ATP5A1 ($P = .001$) and ATP5G1/G2/G3 ($P = .008$) as well as cytoplasmic ATPAF1 ($P < .001$) was higher in oncocytoma than in ccRCC tissue.

We did not observe a correlation between the investigated proteins and clinical parameters (i.e. pT-stage, metastasis, grading; all >0.15) in patients with ccRCC. Follow-up information was available for 86 patients. Kaplan Meier estimates revealed a correlation of ATPAF1 (cytoplasmic and membrane staining) and ATP5G1/G2/G3 expression and overall survival of ccRCC patients (log rank $P < .05$; see Figure 3). The univariate Cox regression analysis also showed that an increased immunostaining of ATPAF1 and ATP5G1/G2/G3 was correlated with poor overall survival in a subset of 86 patients with available follow-up data (ATPAF1 cytoplasm: $P = .036$, hazard ratio (HR) = 2.23, 95% confidence interval (95% CI) 1.06–4.74; ATPAF1 membrane: $P = .039$, HR = 2.85, 95% CI 1.05–7.72; ATP5G1/G2/G3: $P = .032$, HR = 2.38, 95% CI 1.07–5.07). The prognostic value was lost in the multivariate model including

Table 3. Summary of Differentially Expressed mRNA in the Screening and Validation Cohort of Real-Time PCR

Samples	Screening Cohort		Validation Cohort	
	Fold Change		Fold Change	
ATP5A1	-3.31		-3.65	
ATP5B	-3.04		-2.37	
ATPAF1	-2.91		-2.80	
ATP5C1	-1.81		n.d.	
ATP5D	-2.12		n.d.	
ATP5O	-1.98		n.d.	
ATP5F1	-1.93		-1.62	
ATP5G1	-8.09		-5.88	
ATP5G2	-2.69		-2.11	
ATP5G3	-3.10		-2.37	
ATP5I	-1.72		n.d.	
ATP5S	-1.95		-1.67	

n.d., not determined.

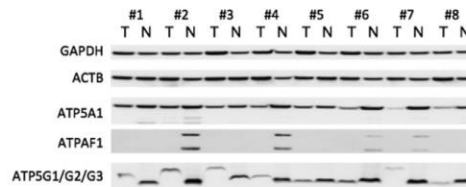


Figure 2. Western blot experiments were performed to determine the protein expression in 8 corresponding normal (N) and clear cell renal cell carcinoma (T) tissues (#1–#4 UICC grade 1; #5–#8 UICC grade 3). All protein levels were decreased in tumor compared to normal renal tissue.

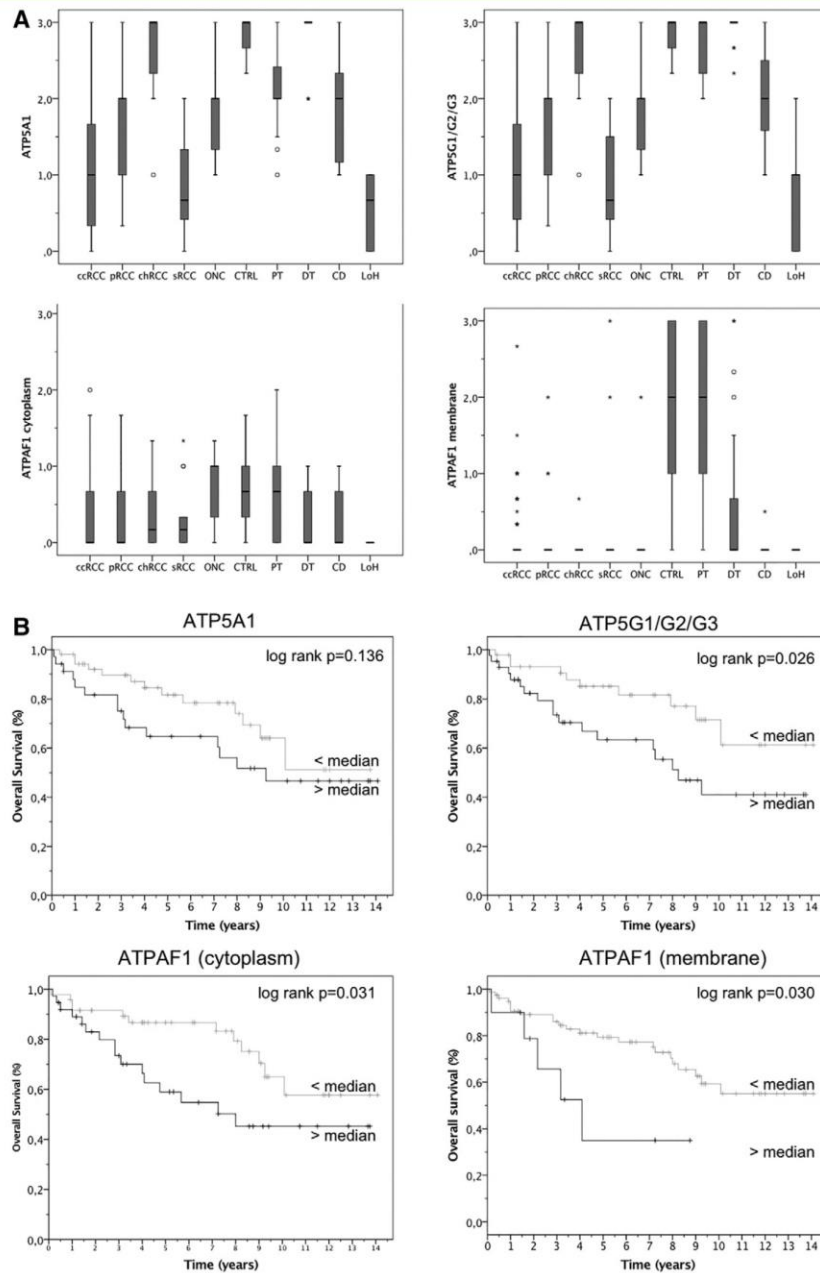


Figure 3. (A) The expression of ATP5A1, ATP5G1/G2/G3 and ATPAF1 was determined using immunohistochemistry in a tissue microarray which included clear cell (ccRCC), papillary (pRCC) and sarcomatoid (srRCC) renal cell carcinoma as well as oncocytoma (ONC) and normal renal (proximal tubules, PT; distal tubules, DT; loop of Henle, LoH; collecting duct, CD) tissue. ccRCC tissues were characterized by lower levels of ATP5A1, ATP5G1/G2/G3, and ATPAF1 compared to other RCC subtypes and normal renal tissue. (B) Kaplan Meier estimates demonstrated significant shorter overall survival in ccRCC patients with high levels of ATPAF1 and ATP5G1/G2/G3.

Table 4. Uni- and Multivariate Cox Regression Analysis for the Prediction of Overall Survival in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma

	Univariate Analysis			Multivariate Analysis		
	P value	HR	(95% CI)	P value	HR	(95% CI)
pT-stage	0.432	1.19	(0.77–1.85)			
LN-metastasis	<0.001	10.22	(3.53–29.58)	0.001	7.59	(2.31–24.98)
Distant metastasis	0.129	1.28	(0.93–1.75)			
Grading	0.005	3.81	(1.51–9.66)	0.051	3.82	(0.99–6.88)
ATPAF1 cytoplasm	0.036	2.23	(1.06–4.74)	0.595	1.29	(0.50–3.29)
ATPAF1 membrane	0.039	2.85	(1.05–7.72)	0.751	1.21	(0.37–3.94)
ATP5G1/G2/G3	0.032	2.38	(1.07–5.07)	0.238	1.78	(0.67–4.29)
ATP5A1	0.143	1.75	(0.83–3.69)			

HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

TNM-stage and grading, but it should be noted that the number of cases (n = 86) limits the statistical power, and that the number of few patients with lymph node metastasis (n = 6; univariate analysis HR 10.22) limits the meaning of a multivariate analysis. See Table 4.

Discussion

Renal cell carcinoma is termed as metabolic disease that is characterized by: dysregulation of metabolic pathways involved in oxygen sensing (VHL/HIF pathway alterations); energy sensing (Warburg shift augmented lipogenesis; and reduced AMPK and Krebs cycle activity) and/or nutrient sensing cascade (deregulation of AMPK-TSC1/2-mTOR and PI3K-Akt-mTOR pathways) [35]. Otto Warburg has already described that cancer cells unlike normal cells metabolize glucose mostly via glycolysis even in the presence of sufficient oxygen [36]. It is assumed that impaired VHL function is the initiating genetic event for many of the dysregulated pathways in ccRCC [29]. In brief, the VHL protein binds under conditions of normal oxygen tension to the hypoxia-inducible factor subunit α (HIF- α) and directs it to proteosomal degradation. Thus, in the absence of functional VHL, even under normoxic conditions, HIF- α is not degraded and translocates to the nucleus to form a dimer with HIF- β to generate HIF-1. HIF-1, as a transcription factor, is involved in the regulation of many biological processes such as glucose uptake and energy metabolism, angiogenesis, erythropoiesis, cell proliferation and apoptosis, cell-cell and cell-matrix interactions, and barrier function [37,38]. In RCC, the increased levels of HIF and its target gene activation accounts for much of its unique attributes such as ADRP, neutral lipid accumulation and clear cell histology; VEGF and other angiokines, vascularity; erythropoietin, paraneoplastic polycythemia [39].

So far, little information is available about the detailed expression of the subunits of the electron transport chain proteins. We earlier demonstrated down-regulation of UQCRC1, UQCRFS1, NDUFS1 and NDUFA4 [34,40,41] and up-regulation of its paralogue NDUFA4L2 [42]. We subsequently reviewed the expression profile of the mitochondrial ATP synthase (Complex V) subunits in ccRCC by retrieval of published microarray expression profiling studies. 80% of the 29 subunits showed dysregulation (mostly down-regulation) in at least one microarray study, and several genes were dysregulated in several studies. We were able to validate the former microarray gene expression profiling studies on the mRNA (ATP5A1, ATP5B, ATPAF1, ATP5C1, ATP5D, ATP5O, ATP5F1, ATP5G1, ATP5G2, ATP5G3, ATP5I, ATP5S) and protein (ATP5A1, ATPAF1, ATP5G1/G2/G3) level. These findings support the idea

that the activity of the mitochondrial electron chain is reduced by down-regulation of its members, and that this leads to reduced oxidative phosphorylation.

Biomarkers are available for many malignancies, but unfortunately this is not the case for RCC. Our study revealed several - so far unknown biomarker candidates - in ccRCC: among the in detail validated ATP-synthase subunits, we observed 6-fold down-regulation of ATP5G1 on the mRNA level, and also the ATP5G1/G2/G3 protein was highly down-regulated in ccRCC tissue. It should be noted that the antibody for ATP5G1 was not highly specific and ATP5G2 and ATP5G3 subunits are also recognized according to the manufacturer's information, but a more specific antibody was not available for immunohistochemistry and Western blot analysis. To the best of our knowledge, this is the first study showing dysregulation of ATP5G1 in cancer. Earlier studies demonstrated that siRNA knockdown of ATP5G1 resulted in reduced ATP levels as a consequence of reduced oxidative phosphorylation activity, and increased the amount of reactive oxygen species (ROS) [43].

We also highlighted a role for ATP5A1 in the pathogenesis of ccRCC: its mRNA was down-regulated 3.5-fold in ccRCC compared to normal renal tissue, and also protein levels were significantly decreased in ccRCC tissue. The subunit ATP5A1 was linked to cancer by other researchers: ATP5A1 expression facilitated the development of colorectal tumors with microsatellite instability [44], and its expression was up-regulated in glioblastoma and endothelial cells of tumor microenvironment [45].

Another distinctly down-regulated gene in ccRCC was ATPAF1. Interestingly, ATPAF1 was not only detected in the cytoplasm of normal renal tissue, but we also observed regular immunohistochemical membrane staining of the proximal tubules. The relevance of ATPAF1 localization remains unknown. The functional consequence of altered ATPAF1 expression remains largely unknown, but it was shown that RNAi-mediated knockdown of ATPAF1 reduces cell growth of prostate cancer cells in androgen-deficient conditions [46].

This study enhanced our understanding of the dysregulation in RCC. Specific genes involved in the tumor-forced glycolysis may represent potential therapeutic targets of agents that specifically interact with the key factors of tumor phenotype. Furthermore our findings could serve as a basis for future studies in search for biomarkers in RCC. To substantiate our findings further analysis like reactive-oxygen-species analysis (ROS) or extracellular flux analysis (ECAR) *in vitro* are warranted to demonstrate the functional relevance of altered expression of the complex V subunits.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2017.06.002>.

Funding Source

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

None.

Acknowledgements

The tissue samples were collected within the framework of the Biobank of the Center for Integrated Oncology Cologne Bonn at the University Hospital Bonn.

References

- [1] McLaughlin J, Lipworth L, and Tarone R (2006). Epidemiologic Aspects of Renal Cell Carcinoma. *Semin Oncol* **33**, 527–533.
- [2] Green DR and Reed JC (1998). Mitochondria and Apoptosis. *Science* **281**, 1309–1312.
- [3] Ferri KF and Kroemer G (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* **3**, E255–263.
- [4] Wang X (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**, 2922–2933.
- [5] Thompson C (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456–1462.
- [6] Reed JC (1999). Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol* **11**.
- [7] Warburg O (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science* **123**, 309–314.
- [8] Ward PS and Thompson CB (2012). Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* **21**, 297–308.
- [9] Gatto F, Nookaew I, and Nielsen J (2014). Chromosome 3p loss of heterozygosity is associated with a unique metabolic network in clear cell renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E866–875.
- [10] Unwin RD, Craven RA, Harnden P, Hanrahan S, Torry N, Knowles M, Eardley I, Selby PJ, and Banks RE (2003). Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics* **3**, 1620–1632.
- [11] Perroud B, Lee J, Valkova N, Dhirapong A, Lin P, Fiehn O, Kültz D, and Weiss RH (2006). Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. *Mol Cancer* **5**, 64.
- [12] Meierhofer D (2004). Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* **25**, 1005–1010.
- [13] Bonora M, Bononi A, Marchi E de, Giorgi C, Lebedzinska M, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Suski JM, and Wojtala A, et al (2014). Role of the c subunit of the F₀ ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle* **12**, 674–683.
- [14] Stickle JS, Weinzierl AO, Hillen N, Drews O, Schuler MM, Hennenlotter J, Werner D, Muller CA, Stenzl A, and Rammensee H, et al (2009). HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 1407–1417.
- [15] Eckel-Passow JE, Serie DJ, Bot BM, Joseph RW, Hart SN, Cheville JC, and Parker AS (2014). Somatic expression of ENRAGE is associated with obesity status among patients with clear cell renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* **35**, 822–827.
- [16] Ooi A, Wong J, Petillo D, Roossien D, Perrier-Trudova V, Whitten D, Min BWH, Tan M, Zhang Z, and Yang XJ, et al (2011). An antioxidant response phenotype shared between hereditary and sporadic type 2 papillary renal cell carcinoma. *Cancer Cell* **20**, 511–523.
- [17] Wozniak MB, Le Calvez-Kelm F, Abedi-Ardekani B, Byrnes G, Durand G, Carreira C, Michelon J, Janout V, Holcatova I, and Foretova L, et al (2013). Integrative genome-wide gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma in Czech Republic and in the United States. *PLoS One* **8**, e57886.
- [18] Gumz ML, Zou H, Kreinest PA, Childs AC, Belmonte LS, LeGrand SN, Wu KJ, Luxon BA, Sinha M, and Parker AS, et al (2007). Secreted frizzled-related protein 1 loss contributes to tumor phenotype of clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**, 4740–4749.
- [19] Pena-Llopis S, Vega-Rubin-de-Celis S, Liao A, Leng N, Pavia-Jimenez A, Wang S, Yamasaki T, Zhrebker L, Sivanand S, and Spence P, et al (2012). BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet* **44**, 751–759.
- [20] Kort EJ, Farber L, Tretiakova M, Petillo D, Furge KA, Yang XJ, Cornelius A, and Teh BT (2008). The E2F3-Oncomir-1 axis is activated in Wilms' tumor. *Cancer Res* **68**, 4034–4038.
- [21] Roemeling CA von, Radisky DC, Marlow LA, Cooper SJ, Grebe SK, Anastasiadis PZ, Tun HW, and Copland JA (2014). Neuronal pentraxin 2 supports clear cell renal cell carcinoma by activating the AMPA-selective glutamate receptor-4. *Cancer Res* **74**, 4796–4810.
- [22] Beroukhi R, Brunet J, Di Napoli A, Mertz KD, Seeley A, Pires MM, Linhart D, Worrell RA, Moch H, and Rubin MA, et al (2009). Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippel lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* **69**, 4674–4681.
- [23] Lenburg ME, Liou LS, Gerry NP, Frampton GM, Cohen HT, and Christman MF (2003). Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer* **3**, 31.
- [24] Higgins JPT, Shinghal R, Gill H, Reese JH, Terris M, Cohen RJ, Fero M, Pollack JR, van de Rijn M, and Brooks JD (2003). Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray. *Am J Pathol* **162**, 925–932.
- [25] Jones J, Otu H, Spentzos D, Kolia S, Inan M, Beecken WD, Fellbaum C, Gu X, Joseph M, and Pantuck AJ, et al (2005). Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 5730–5739.
- [26] Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, Fisher R, McGranahan N, Matthews N, and Santos CR, et al (2014). Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet* **46**, 225–233.
- [27] Wang Y, Roche O, Yan MS, Finak G, Evans AJ, Metcalf JL, Hast BE, Hanna SC, Wondergem B, and Furge KA, et al (2009). Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway. *Nat Med* **15**, 319–324.
- [28] Deng M, Blondeau JJ, Schmidt D, Perner S, Müller SC, and Ellinger J (2015). Identification of novel differentially expressed lncRNA and mRNA transcripts in clear cell renal cell carcinoma by expression profiling. *Genom Data* **5**, 173–175.
- [29] *Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma* Nature **499**, 43–49.
- [30] Ellinger J, Kahl P, Mertens C, Rogenhofer S, Hauser S, Hartmann W, Bastian PJ, Büttner R, Müller SC, and Ruecker A von (2010). Prognostic relevance of global histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in renal cell carcinoma. *Int J Cancer* **127**, 2360–2366.
- [31] Blondeau J, Deng M, Syring I, Schrödter S, Schmidt D, Perner S, Müller SC, and Ellinger J (2015). Identification of novel long non-coding RNAs in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Epigenetics* **7**, 10.
- [32] Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Kristiansen G, and Jung K (2007). In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol* **8**, 47.
- [33] Dupasquier S, Delmarcelle A, Marbaix E, Cosyns J, Courtoy PJ, and Pierreux CE (2014). Validation of housekeeping gene and impact on normalized gene expression in clear cell renal cell carcinoma: critical reassessment of YBX3/ZO-NAB/CSDA expression. *BMC Mol Biol* **15**, 9.
- [34] Schrödter S, Braun M, Syring I, Klümper N, Deng M, Schmidt D, Perner S, Müller SC, and Ellinger J (2016). Identification of the dopamine transporter SLC6A3 as a biomarker for patients with renal cell carcinoma. *Mol Cancer* **15**, 1–10.
- [35] Massari F, Ciccarese C, Santoni M, Brunelli M, Piva F, Modena A, Bimbatti D, Fantinel E, Santini D, and Cheng L, et al (2015). Metabolic alterations in renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev* **41**, 767–776.
- [36] Warburg O (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270.
- [37] Haase VH (2006). The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney Int* **69**, 1302–1307.
- [38] Pinthus JH, Whelan KF, Gallino D, Lu J, and Rothschild N (2011). Metabolic features of clear-cell renal cell carcinoma: mechanisms and clinical implications. *Can Urol Assoc J* **5**, 274–282.
- [39] Rathmell WK and Chen S (2008). VHL inactivation in renal cell carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* **8**, 63–73.
- [40] Ellinger J, Poss M, Brüggemann M, Gromes A, Schmidt D, Ellinger N, Tolkach Y, Dietrich D, Kristiansen G, and Müller SC (2016). Systematic Expression Analysis of Mitochondrial Complex I Identifies NDUFS1 as a Biomarker in Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* [1558–7673(16)30346–9].
- [41] Ellinger J, Gromes A, Poss M, Brüggemann M, Schmidt D, Ellinger N, Tolkach Y, Dietrich D, Kristiansen G, and Müller SC (2016). Systematic expression analysis of the mitochondrial complex III subunits identifies UQCRC1 as biomarker in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* **7**, 86490–86499.
- [42] Müller FE, Braun M, Syring I, Klümper N, Schmidt D, Perner S, Hauser S, Müller SC, and Ellinger J (2015). NDUFA4 expression in clear cell renal cell carcinoma is predictive for cancer-specific survival. *Am J Cancer Res* **5**, 2816–2822.
- [43] Natera-Naranjo O, Kar AN, Aschrafi A, Gervasi NM, Macgibeny MA, Gioio AE, and Kaplan BB (2012). Local translation of ATP synthase subunit 9 mRNA alters ATP levels and the production of ROS in the axon. *Mol Cell Neurosci* **49**, 263–270.
- [44] Seth R, Keeley J, Abu-Ali G, Crook S, Jackson D, and Ilyas M (2009). The putative tumour modifier gene ATP5A1 is not mutated in human colorectal cancer cell lines but expression levels correlate with TP53 mutations and chromosomal instability. *J Clin Pathol* **62**, 598–603.

- [45] Xu G and Li JY (2016). ATP5A1 and ATP5B are highly expressed in glioblastoma tumor cells and endothelial cells of microvascular proliferation. *J Neurooncol* **126**, 405–413.
- [46] Schinke EN, Bii V, Nalla A, Rae DT, Tedrick L, Meadows GG, and Trobridge GD (2014). A novel approach to identify driver genes involved in androgen-independent prostate cancer. *Mol Cancer* **13**, 120.

Supplementäre Informationen und Abbildungen

Supplementäre Tabelle

Tabelle S1: PCR Primer Sequenzen

Gene	Forwärts Primer	Rückwärts Primer
PPIA	ATGCTGGACCCAACACAAAT	TCTTTCACITTTGCCAAACACC
ACTB	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG
ATP5A1	TGCTATTGGTCAAAAGAGATCCA	GTAGCCGACACCACAATGG
ATP5B	CAGCAGATTTTGGCAGGTGAA	ACCCCTCACGATGAATGCTC
ATPAF1	GGCTCAGTCCTGTCCAACAT	AGTTCAGTACCTGTCCATTGTCC
ATP5C1	AGCCGCAATGGATTCAAGTT	TCTCTCTCAGCTCGGGCATA
ATP5D	GTCGTGGTGCATGCAGAG	GAAGAGTCGGCGTTCACTG
ATP5O	GGTACCTTGACAGTGACCT	CGGATCAGTCTTAGCCTCCAA
ATPG5F1	CCTTCCTAGGTCCAGGGGTA	CCTCAGGGATCAGTCCATAACG
ATP5G1	GGGTAGTAGGAGTGCAGACTGA	GGGCTATTCAAGAAGGAGGCA
ATP5G2	CTGAGCTGATCCTCTCTCCTGC	TTCAGCACCACTGCAGATAGC
ATP5G3	TCAGACCAGTGCAATCAGCA	GCGAAGGGTTTCTGGCATAAC

Supplementäre Abbildungen

Abb. S1: Validierung der Genexpression mittels PCR in einer Kohorte von 18 ccRCC und 10 benignen Nierengewebeproben (CTRL). Es zeigt sich eine Herabregulation aller ausgewählten 12 Komplex-V-Untereinheiten im ccRCC-Gewebe.

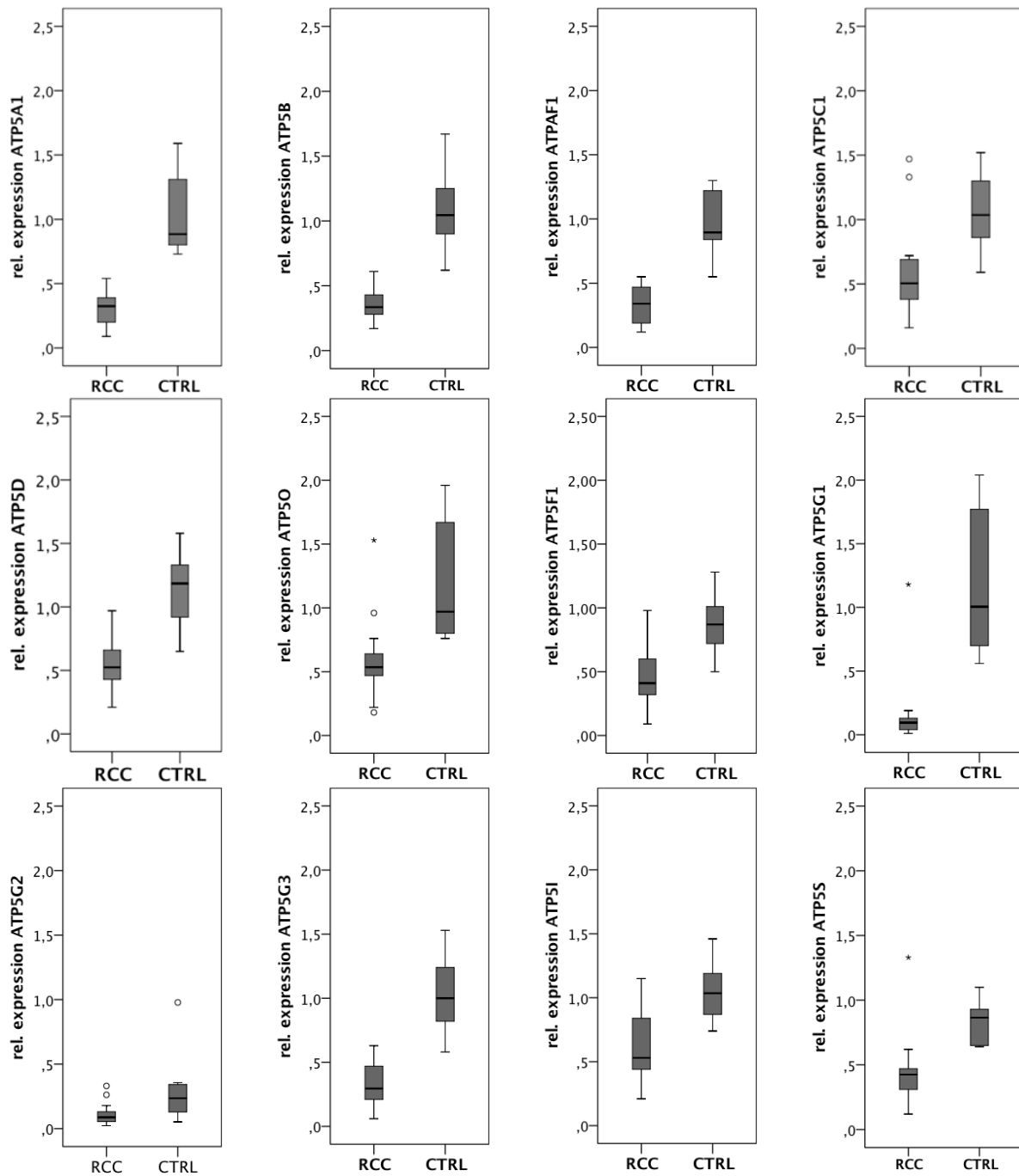


Abb. S2: Validierung der Genexpression 8 ausgewählter Komplex-V-Untereinheiten mittels PCR in einer erweiterten Kohorte von 74 ccRCC und 36 benignen Nierengeweben (CTRL). Es zeigt sich eine Herabregulation aller Untereinheiten im ccRCC-Gewebe.

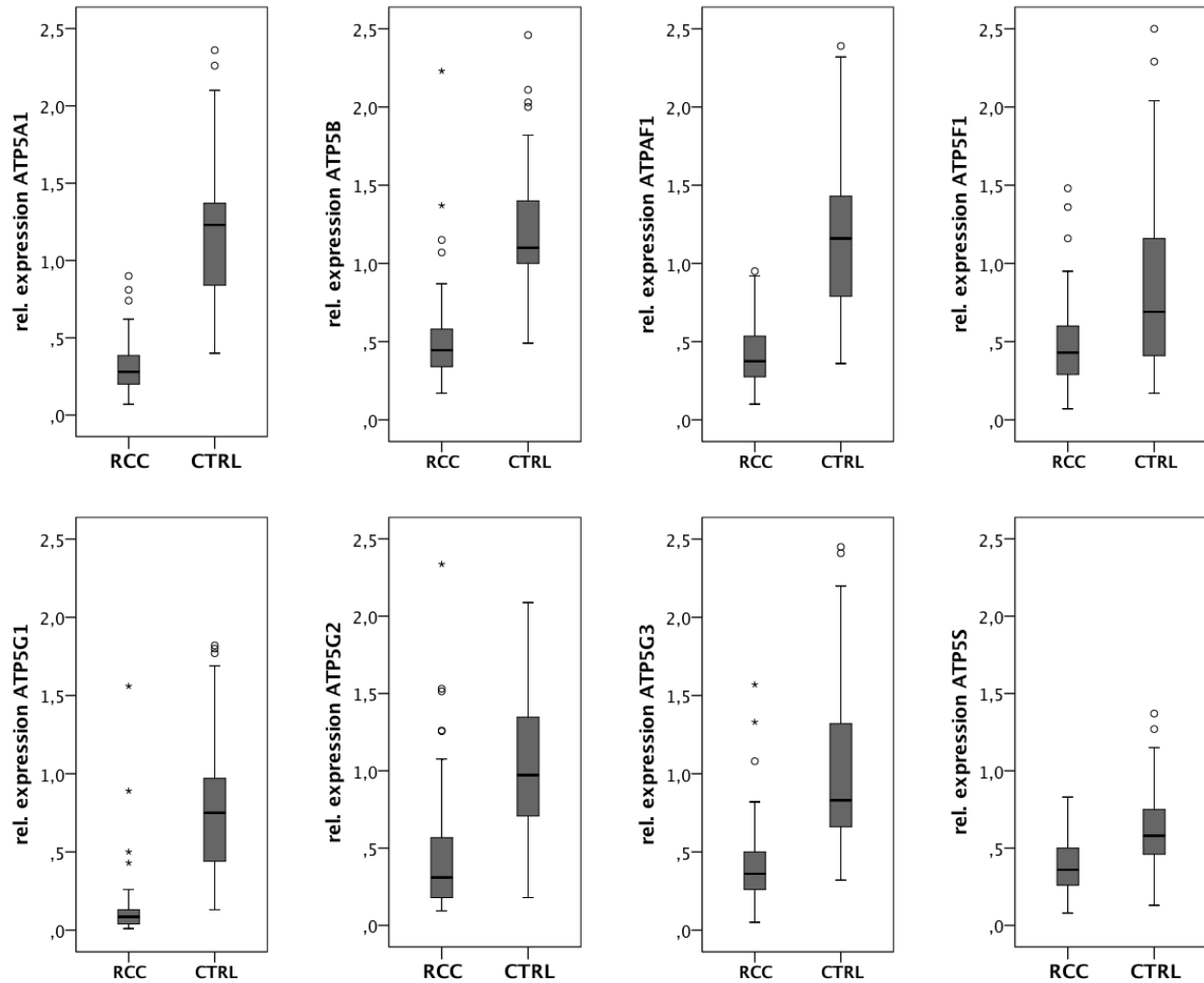


Abb. S3: Kaplan-Meier-Analyse als Nachweis der ATP5G2-mRNA-Expression (dichotomisiert nach dem mittleren Expressionsniveau) als Prädiktor für das Gesamtüberleben bei Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom nach Nephrektomie.

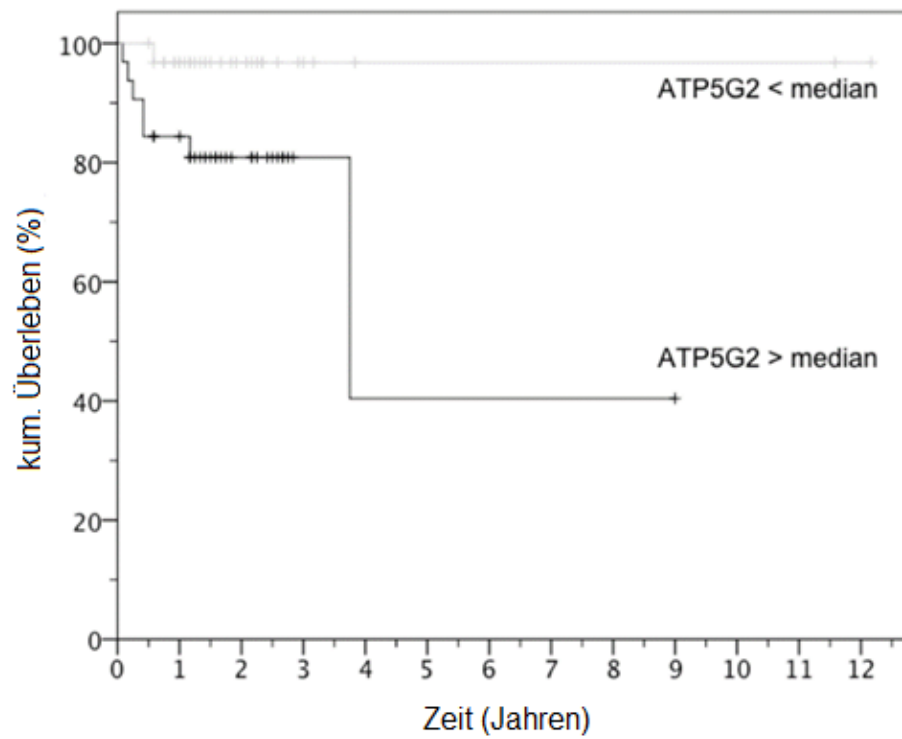
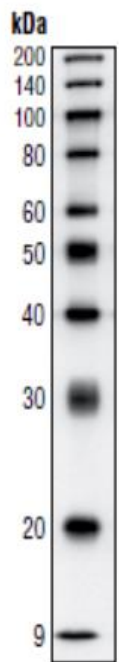
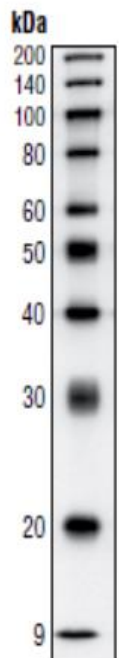


Abb. S4: Western-Blot-Experimente wurden durchgeführt, um die Proteinexpression in 8 entsprechenden normalen (N) und klarzelligem Nierenzellkarzinom - (T) Geweben zu bestimmen. Alle Proteine waren erniedrigt in höhergradigem Tumorgewebe. ATP5G1 / G2 / G3 zeigte in einigen Tumorgeweben und auch benignen Proben Banden unterschiedlicher Größe. GAPDH und Actin wurden als Ladekontroll-Antikörper genutzt.

GAPDH:



Actin:**ATP5A1**

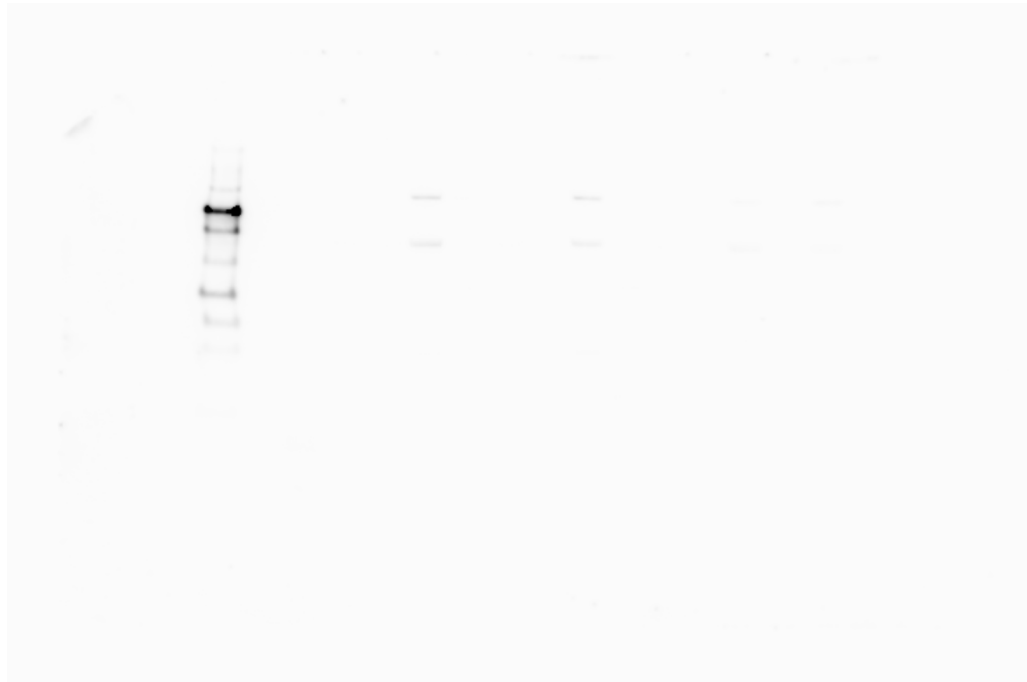
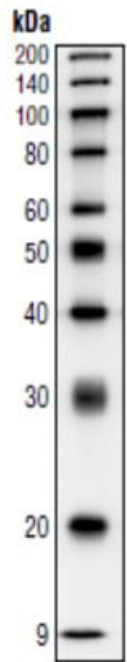
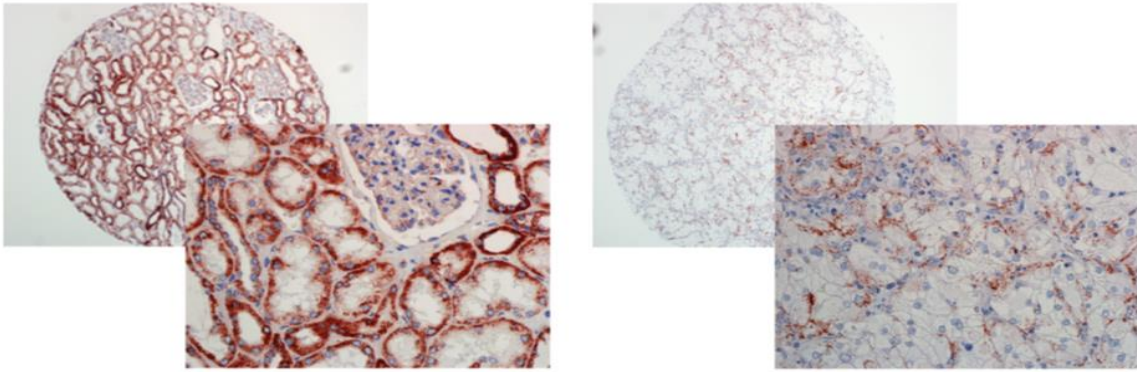
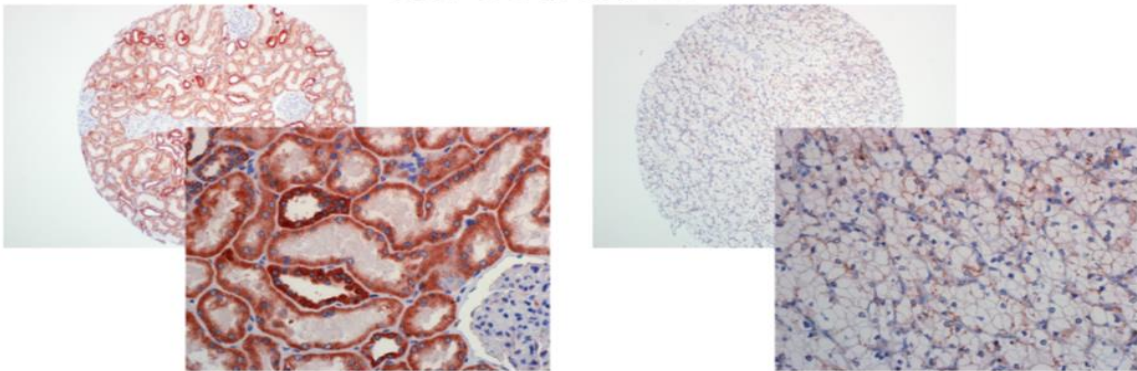
ATPAF1**ATP5G1/G2/G3:**

Abb. S5: Immunhistochemische Färbung von ATP5A1, ATP5G1 / G2 / G3 und ATPAF1 in normalem Nierengewebe (links) und klarzelligem Nierenzellkarzinom (rechts). Es zeigt sich eine verminderte Expression von *ATP5A1*, *ATPAF1* und *ATP5G1/G2/G3* im Zytoplasma von ccRCC, verglichen mit benignem Nierengewebe.

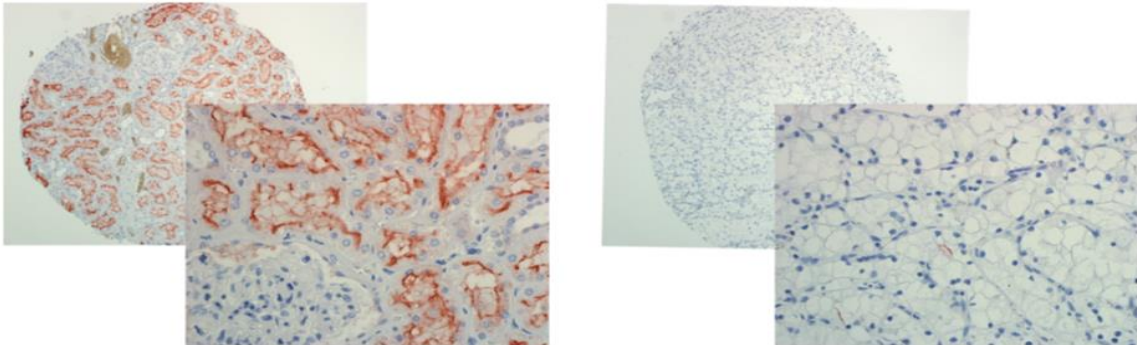
ATP5A1



ATP5G1/G2/G3



ATPAF1



3. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Allen herzlich bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. med. Jörg Ellinger für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung, die geduldige und zügige Problemlösung und die permanente Ansprechbarkeit. Ich hätte mir keinen besseren Doktorvater und Betreuer vorstellen können.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Stefan C. Müller möchte ich mich für das zur Verfügung gestellte Labor seiner Klinik und die Bereitstellung der Materialien bedanken.

Doris Schmidt möchte ich für die geduldige und intensive Einweisung in die Handlungsabläufe und praktischen Fertigkeiten im Labor und für die Unterstützung bei jeglichen Problemen danken.

Bei meinen beiden Mitdoktorandinnen Mirjam Poss und Arabella Gromes möchte ich mich für die schöne Zeit im Labor bedanken. Ohne euch hätte das pipettieren bestimmt nur halb so viel Spaß gemacht.

Herrn Prof. Dr. med. Glen Kristiansen sowie Herrn Yuri Tolkach danke ich für die Hilfe bei histologischen Fragen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern Theresia und Friedel Brüggemann und meinen beiden Schwestern Eva Brüggemann und Sarah Adams und meinem Freund Roman Zägel für die immerwährende Unterstützung, nicht nur während dieser Arbeit, herzlich bedanken!